



**IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I
CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS**
Marta Tomas Marginet

ISBN: 978-84-693-8856-3
Dipòsit Legal: T.1949-2010

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

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

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

TESI DOCTORAL

**IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES
EN EL DESENVOLUPAMENT
I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS**

Marta Tomàs Marginet



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

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Marta Tomàs Marginet

**IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL
DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS
NEUROMUSCULARS**

TESI DOCTORAL

dirigida pel Dr. Manel Santafé Martínez, la Dra. Neus Garcia Sancho i
el Dr. Josep M. Tomàs Ferré

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Aquesta tesi doctoral 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 direcció del Dr. Manel Santafé Martínez, la Dra. Neus Garcia Sancho i el Dr. Josep M. Tomàs Ferré.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat Rovira i Virgili

Manel Santafé Martínez, professor titular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

Neus Garcia Sancho, professora titular del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

Josep M. Tomàs Ferré, catedràtic d'universitat del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat Rovira i Virgili.

CERTIFIQUEN:

Que el present treball titulat "Implicació de les neurotrofines en el desenvolupament i consolidació de les sinapsis neuromusculars", que presenta Marta Tomàs Marginet per l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat i que compleix els requeriments per poder optar a aquest títol.

Reus, 2 de juliol de 2010

Dr. Manel Santafé Martínez

Dra. Neus Garcia Sancho

Dr. Josep M. Tomàs Ferré

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Als pares i a l'àvia

A l'Òscar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

No se massa bé com començar. Sempre que he hagut de donar les gràcies, ho he dit en comptes d'escriure-ho. Hi ha moltes persones que m'han ajudat en algun moment, a qui els hi ho voldria agrair. A tots vosaltres, moltes gràcies.

Gràcies al Prof. Josep Tomàs, co-director d'aquesta tesi, pare, amic i confident. Gràcies per haver-me donat l'oportunitat de formar part del teu món. Gràcies pel teu suport des del primer dia, per acceptar el risc i per confiar en mi i en les meves possibilitats. Gràcies per estar-hi sempre i respondre les mil preguntes sorgides, sobretot aquests últims mesos. Gràcies per les teves paraules tranquil·litzadores. M'ha fet molt feliç poder treballar al teu costat.

Gràcies al Dr. Santafé, Manel, co-director d'aquesta tesi. Gràcies per ensenyar-me tot el que sé i introduir-me al món de l'electrofisiologia. Per dedicar-me el teu temps, per acompanyar-me a Salamanca, per preocupar-te per mi. Gràcies pels cafès matiners, les converses de la vida i les mil coses que m'has ensenyat. Gràcies per donar-me consells i per guiar-me fins aquí.

Gràcies a la Dra. Garcia, carinyosament *Neusita*, co-directora d'aquesta tesi. Gràcies Neus per haver-me ensenyat el que sé sobre les *Immunos* i els *blots*, per la teva paciència i ajuda dins el laboratori. Gràcies per la teva comprensió en tot moment i per escoltar les meves inquietuds en els bons i mals moments. Gràcies per fer-me sentir acollida des del primer dia, per les rialles, pels moments divertits del gimnàs, però sobretot, gràcies per veure'm com una més i fer-m'ho sentir.

Gràcies a la Dra. Lanuza, M. Angel, moltes gràcies per ajudar-me sempre amb tot. Gràcies per compartir amb mi les pors per agafar els animals, va haver-hi un abans i un després d'aquell dia a l'estabulari! Gràcies per confiar en mi, per escoltar-me, pels consells, per les estones compartides. Gràcies també per deixar-me viure l'arribada de la Maria.

Gràcies a la Dra. Besalduch, Nurieta! Què vols que et digui que no sàpigues... Van ser inicis difícils però tots els inicis ho són... fins i tot aquells que acaben amb final feliç, i que per això s'assaboregen molt més. Gràcies per la teva ajuda dins al laboratori, per contestar a totes les meves preguntes, per revisar tots els càlculs del món i intentar ensenyar-me de la manera més fàcil possible... gràcies per tot. Gràcies per les estones compartides, per les confidències, pels consells, per les situacions diverties, pels cafès matiners, per deixar-me formar part de la teva història i sobretot, gràcies per acceptar-me i veure'm com la Marta.

Gràcies Dra. Sabaté, Mar, va ser breu però intens. Gràcies per ajudar-me i respondre'm totes les preguntes en els meus inicis. Gràcies per escoltar-me i fer-me sentir millor. Gràcies per compartir amb mi troçets de la teva vida. Gràcies per ser com ets.

Gràcies a la resta de membres de la Unitat, a la Dra. Fenoll, per endolcir-me aquests quatre anys a base de bombons i galetes bones i temptadores! Al Dr. Ortiz per ser atent amb mi i permetre'm conèixer altres tècniques. A la Dra. Morlà, per les converses de la vida i algun que altre dinar compartit! A la Sílvia, gràcies per estar sempre tan disposada a ajudar-me en tot, en els inicis i en el durant.

Gràcies a tots els alumnes interns que han passat pel laboratori aquests quatre anys. En especial al Jonathan, per escoltar-me en tot moment, per preocupar-te per mi, per fer-me riure tant.

Gràcies a la Mònica pels dinars compartits, pels acudits dolents... i per les rialles i bogeries per falta de sang al cervell després de dinar!

Gràcies a tota la gent de Microbiologia, per compartir amb tanta gràcia el passadís de la segona planta. En especial gràcies a la Carolina i a l'Alberto, per haver-me donat l'oportunitat de conèixer-los una miqueta. Gràcies per les paraules en cada trobada a les portes de l'ascensor i del lavabo!

Gràcies a la gent de Farmacologia. Al Dr. Sureda i a la Laura per les paraules simpàtiques i les mil respostes a la pregunta: *On és la Marta?* Gràcies Martona per compartir amb mi petites estones i els estressants moments amb un cigarro en mà, ens trobem a Amsterdam!

Gràcies a l'Amparo, a l'Esperanza, al Juan i a la Joana per la vostra ajuda en tot moment i sobretot amb els animals, per les converses de la vida i per les rialles a la tercera planta. Estic convençuda que sense vosaltres, tot hagués estat molt complicat. Gràcies per ser tant atents amb mi.

Gràcies al José Luís i al Joan, per un somriure a primera hora del matí, per facilitar sempre les coses i sobretot per les ràpides solucions en els moments de crisi com quan les claus no obrien les portes, o les TVs no emetien senyal, o el projector de transparències s'havia esfumat o no volia funcionar. Sou una ajuda important.

Gràcies a la Montse i a la Imma per estar sempre disposades a ajudar-me en tot, des de les gestions de totes les factures complicades del món, fins als processos burocràtics sempre tan pesats, i com no pels piropus a les meves faldilles!

Gràcies a la Blanca i a la Carmen, les dues dones més simpàtiques i risueñas de la Facultat. Gràcies pels somriures de bon matí i per les paraules boniques que sempre teniu per mi.

Gràcies a la Dolors i la Núria, per les converses, els ànims i per l'ajuda prestada.

Gràcies a l'Astrid i a l'Andrea per l'època de les classes a Bcn. Merci pels bons moments.

Gràcies al Dr. Yajeya, Javier, gracias por haberme dado la oportunidad de aprender en tu laboratorio y dedicarme tu tiempo, transmitirme tus conocimientos y darme la oportunidad de conocer los cultivos celulares i el patch. Gracias también por abrirme las puertas de tu casa, de tu familia y hacer de mi paso por Salamanca una bonita y emotiva experiencia. Gracias Amelia por tu cariño, por las visitas turísticas por Salamanca, por los vinillos y por las comidas de los domingos. Y a Elena también gracias.

Gràcies al Prof. Merchán. Le agradezco la acogida que me brindó en Salamanca. Por preocuparse de que mi estancia fuera agradable y por prestarse en todo momento por lo que pudiera necesitar.

També vull donar les gràcies a tots aquells que no formen part de la meva història a la Facultat, però sí de la història de la meva vida.

Gràcies Òscar, per estar amb mi en tot això. Gràcies per escoltar-me i aconsellar-me, per creure en mi, per ajudar-me tant aquests últims mesos i per posar-me sempre les coses fàcils. Gràcies per ser com ets i sobretot, pels bons moments arribats i pels que sé que arribaran.

Gràcies mare, pel teu recolzament incondicional en tot moment. Per les teves paraules de consol en els moments difícils, però també per celebrar les bones notícies. Gràcies per les injeccions d'optimisme i pels ànims que sempre m'has donat. Gràcies per intentar sempre que sigui feliç amb el que faig.

Gràcies àvia, què t'haig de dir que no sàpigues? Gràcies per preocupar-te per mi i per preguntar-me per la tesi des de l'altre costat del telèfon. Gràcies per les paraules d'ànim i confort que sempre has tingut.

Gràcies Josep i Lupe per preguntar quan cal, per interessar-vos pel que faig i per intentar entendre una mica de què va tot això...

Gràcies tiets, Alba i Laura per preguntar-me sempre: *Com va la tesi?* I per intentar entendre també de què va aquesta història...

Gràcies Rosa, Agustí i Cristi per recolzar-me i per preocupar-vos per mi en tot moment.

Gràcies Anna i Mireia. L'amistat és una de les millors coses d'aquesta vida. Gràcies pel vostre recolzament aquests quatre anys, per escoltar els meus neguits i les meves històries i aconsellar-me de tot cor. Gràcies per fer-me agafar ganes i forces en els moments difícils! Gràcies també a l'Álvaro, a la Xus, al Ricard i al Víctor per preocupar-vos de que em vagin bé les coses, per fer-me riure a *carcajada limpia* i en definitiva, per estimar-me.

ÍNDEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Índex

	Pàgina
i- Índex de figures	i
ii- Índex de taules	v
iii- Abreviacions	vi
I- Introducció	1
1. La sinapsi neuromuscular	6
1.1 Elements de la sinapsi neuromuscular	8
1.1.1 Element presinàptic	8
1.1.2 Element postsinàptic	10
1.1.3 Element glial	12
1.2 Funcionament de la sinapsi neuromuscular	13
1.2.1 Transmissió neuromuscular	13
1.2.2 Diferències entre la neurotransmissió neonatal i adulta	15
1.2.3 Molècules implicades en la neurotransmissió neuromuscular	17
1.2.3.1 Canals de calci dependents de voltatge	18
1.2.3.2 Proteïna cinasa C	22
2. Eliminació sinàptica	24
2.1 Concepte de la poli-innervació en el neonat	24
2.2 El procés d'eliminació sinàptica	26
2.2.1 El component presinàptic	27
2.2.2 El component postsinàptic	28
2.2.3 Paper de l'activitat sinàptica	30
3. Les neurotrofines i els seus receptors	31
3.1 Les neurotrofines	34
3.1.1 Tipus de neurotrofines	34

	Pàgina
3.1.2 Expressió i localització de les neurotrofines	35
3.1.3 Funcions de les neurotrofines	37
3.2 Els receptors de les neurotrofines	39
3.2.1 Tipus de receptors	39
3.2.2 Expressió i localització dels receptors	41
3.2.3 Vies de senyalització	42
II- Hipòtesi i Objectius	45
1. Hipòtesi	47
1.1 Hipòtesi general	47
1.2 Hipòtesi específica	47
2. Objectius	48
2.1 Objectiu general	48
2.2 Objectius específics	48
III- Material i Mètodes	49
1. Animals d'experimentació	51
2. La sinapsi neuromuscular com a model muscular	52
3. Obtenció de les diferents mostres	54
3.1 Dissecció del múscul esquelètic LAL	54
3.2 Dissecció del cervell i la medul·la espinal	55
4. Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot	56
4.1 Fonament de la tècnica	56
4.1.1 Electroforesi SDS-PAGE	56
4.1.2 Transferència de proteïnes o Western blot	57
4.1.3 Immunodetecció	57
4.2. Procediment per a la detecció de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75 ^{NTR})	58

	Pàgina
4.3 Tampons i reactius utilitzats	61
5. Tècnica d'immunohistoquímica convencional per fluorescència	63
5.1 Fonament de la tècnica	63
5.2 Aplicació de la immunohistoquímica convencional en el model neuromuscular	64
5.3 Procediment per a la localització de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75 ^{NTR})	67
5.4 Tampons i solucions utilitzats	69
6. Seccions semifines per a la immunofluorescència d'alta resolució	70
6.1 Fonament de la tècnica	70
6.2 Aplicació de la tècnica de talls semifins en el model neuromuscular	70
6.3 Procediment per a la localització de les neurotrofines i els seus receptors	72
6.4 Solucions i reactius utilitzats	75
7. Microscòpia làser confocal	75
8. Metodologia electrofisiològica	76
8.1 Preparació del múscul LAL	76
8.2 Equip d'electrofisiologia	78
8.3 Registre de l'activitat sinàptica	80
8.3.1 Neurotransmissió evocada	80
8.3.1.1 Sinapsi neuromuscular neonatal	81
8.3.1.2 Sinapsi neuromuscular adulta	84
8.3.2 Neurotransmissió espontània	85
8.3.2.1 Sinapsi neuromuscular neonatal	86
8.3.2.2 Sinapsi neuromuscular adulta	86
8.4 Paràmetres avaluats en els experiments funcionals	87
8.4.1 Amplada dels potencials de placa evocats	87
8.4.2 Amplada dels potencials de placa espontanis	89
8.4.3 Freqüència dels potencials de placa espontanis	89

	Pàgina
8.4.4 Contingut quàntic	89
8.4.5 Índex de poli-innervació	90
8.4.6 Percentatges de les plaques motores segons el número d'axons per fibra muscular	90
8.4.7 Potencial de membrana	91
8.5 Substàncies utilitzades en la metodologia electrofisiològica	91
9. Estadística	92
IV- Resultats	93
1. Expressió de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75 ^{NTR}) en la sinapsi neuromuscular del múscul esquelètic LAL	95
1.1 Expressió de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3	95
1.1.1 Expressió del BDNF	95
1.1.2 Expressió de l'NT-4	96
1.1.3 Expressió de l'NT-3	96
1.2 Expressió dels receptors de les neurotrofines TrkB, TrkC i p75 ^{NTR}	96
1.2.1 Expressió del receptor TrkB	96
1.2.2 Expressió del receptor TrkC	97
1.2.3 Expressió del receptor p75 ^{NTR}	97
2. Localització de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75 ^{NTR}) en la sinapsi neuromuscular del múscul esquelètic LAL	99
2.1 Localització de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3	100
2.1.1 Localització del BDNF	100
2.1.2 Localització de l'NT-4	105
2.1.3 Localització de l'NT-3	108
2.2 Localització dels receptors de les neurotrofines (TrkB, TrkC i p75 ^{NTR})	112
2.2.1 Localització del TrkB	112
2.2.2 Localització del TrkC	116

	Pàgina
2.2.3 Localització del p75 ^{NTR}	120
3. Experiments funcionals	124
3.1 Efecte de les neurotrofines a la sinapsi neuromuscular	125
3.1.1 Efecte del BDNF a la sinapsi neuromuscular	125
3.1.1.1 Corba dosidependent	125
3.1.1.2 Corba temps dependent	126
3.1.1.3 Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada de la sinapsi doble i simple	129
3.1.2 Efecte de l'NT-4 a la sinapsi neuromuscular	133
3.1.2.1 Corba dosidependent i efecte en la neurotransmissió de la sinapsi doble i simple	133
3.1.2.2 Corba temps dependent	134
3.1.3 Efecte de l'NT-3 a la sinapsi neuromuscular	137
3.1.3.1 Corba dosidependent	137
3.1.3.2 Corba temps dependent	138
3.1.3.3 Efecte de l'NT-3 en la neurotransmissió de la sinapsi doble i simple	139
3.2 Implicació del BDNF en el procés d'eliminació sinàptica	141
3.2.1 Efecte del BDNF en l'índex de poli-innervació	142
3.2.2 Efecte del BDNF en la distribució de les plaques motores segons el número de contactes sinàptics	143
3.2.3 Relació entre el BDNF, la PKC i el VDCC tipus L	146
3.2.4 Efecte del BDNF endogen en la neurotransmissió neonatal	150
V- Discussió	153
1. Expressió i localització de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i els receptors TrkB, TrkC i p75 ^{NTR} en la sinapsi neuromuscular	155

	Pàgina
2. Efecte de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 en la transmissió sinàptica de la NMJ	161
3. Efecte del BDNF en el procés d'eliminació sinàptica de la NMJ	168
4. Exploració del possible mecanisme d'acció del BDNF	170
5. Activitat del BDNF endogen en la neurotransmissió de les NMJ en desenvolupament	176
VI- Conclusions	183
VII- Bibliografia	187
VIII- Aportacions científiques	217

i- Índex de figures

	Pàgina
Figura 1. Esquema de la sinapsi neuromuscular	7
Figura 2. Esquema dels diferents terminals nerviosos estudiats i les implicacions dels VDCCs i la PKC	17
Figura 3. Les neurotrofines i els seus receptors	34
Figura 4. Estructura dels receptors Trk i p75 ^{NTR}	40
Figura 5. Localització del múscul LAL. Impregnació argèntica i tinció amb blau de metilè	53
Figura 6. Exemples d'immunohistoquímiques convencionals en músculs adult i neonatal	66
Figura 7. Controls negatius amb la tècnica d'IHQ convencional realitzats en múscul P6	69
Figura 8. La unió neuromuscular. Exemples de seccions semifines transversals de sinapsi adulta i neonatal	72
Figura 9. Controls negatius amb la tècnica de talls semifins realitzats en múscul P30	74
Figura 10. Camareta de registre	77
Figura 11. Equip bàsic d'electrofisiologia de registre intracel·lular	79
Figura 12. Potencial de placa evocat	80
Figura 13. Exemple d'una fibra muscular innervada per cinc axons	82
Figura 14. Exemples de registres electrofisiològics en músculs P6	84
Figura 15. Exemples de potencials de placa miniatures espontanis	85
Figura 16. Càlcul de les amplades de la sinapsi doblement innervada	87

	Pàgina
Figura 17. Western Blots de les diferents neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i dels receptors TrkB, TrkC i p75 ^{NTR}	98
Figura 18. Triple marcatge del BDNF amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	101
Figura 19. Triple marcatge del BDNF amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P30	104
Figura 20. Triple marcatge de l'NT-4 amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	106
Figura 21. Triple marcatge de l'NT-4 amb la syntaxina i els nAChRs en músculs P30	107
Figura 22. Triple marcatge de l'NT-3 amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	109
Figura 23. Triple marcatge de l'NT-3 amb l'S-100 i els nAChRs en músculs P30	111
Figura 24. Triple marcatge del receptor TrkB amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	113
Figura 25. Triple marcatge del receptor TrkB amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P30	115
Figura 26. Triple marcatge del receptor TrkC amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	117
Figura 27. Triple marcatge del receptor TrkC amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P30	119
Figura 28. Triple marcatge del receptor p75 ^{NTR} amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P6	121
Figura 29. Triple marcatge del receptor p75 ^{NTR} amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs en músculs P30	123
Figura 30. Corba dosis dependent del BDNF en músculs neonatals	125
Figura 31. Corba dosidependent del BDNF en músculs adults	126

	Pàgina
Figura 32. Corba temps dependent del BDNF en músculs neonatals	127
Figura 33. Corba temps dependent del BDNF en músculs adults	128
Figura 34. Estudi de l'efecte del BDNF en la neurotransmissió espontània (mEPP) en músculs neonatals	129
Figura 35. Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada en nadó	130
Figura 36. Bloqueig dels receptors del BDNF	131
Figura 37. Exemples de registres d'EPPs en sinapsis immadures	132
Figura 38. Corba dosidependent de l'NT-4 en músculs neonatals i adults	134
Figura 39. Corba temps dependent de l'NT-4 en músculs neonatals i adults	135
Figura 40. Representació de l'efecte creixent de l'NT-4	135
Figura 41. Exemples del canvi en l'amplada dels EPPs per l'NT-4	136
Figura 42. Corba dosidependent de l'NT-3 en músculs adults	137
Figura 43. Corba temps dependent de l'NT-3 en músculs adults	138
Figura 44. Efecte del l'NT-3 en la neurotransmissió evocada dels terminals immadurs i adults	138
Figura 45. Exemples del canvi en l'amplada dels EPPs per l'NT-3	139
Figura 46. Histograma dels efectes del BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 en les amplades dels EPPs de les sinapsis immadures i adultes	140
Figura 47. Efecte del BDNF en l'índex de poli-innervació	142
Figura 48. Distribució dels percentatges del número d'axons per fibra muscular en diferents tractaments de BDNF	144
Figura 49. Efecte del BDNF en les distribucions, després de la manipulació de l'activitat de la PKC, la reducció de l'entrada de Ca^{2+} intracel·lular i el bloqueig del canal de calci tipus L	148
Figura 50. Efecte del BDNF endogen en la transmissió neuromuscular	150
Figura 51. Efectes de les neurotrofines en els diferents terminals immadurs i madurs	167

Figura 52. Comparativa dels canvis en el PI i en l'amplada de l's-EPP per efecte del BDNF, del bloqueig de la PKC i del canal de calci tipus L	175
---	-----

ii- Índex de taules

	Pàgina
Taula 1. Correspondències de les diferents nomenclatures dels VDCCs	19
Taula 2. Taula d'anticossos primaris utilitzats en la tècnica de detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot	60
Taula 3. Reactius utilitzats en la tècnica de detecció de proteïnes per Western blot	63
Taula 4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en la IHQ convencional i en les seccions semifines per a la localització de les neurotrofines i els seus receptors	67
Taula 5. Reactius utilitzats en la tècnica de localització de proteïnes per IHQ convencional	70
Taula 6. Reactius utilitzats en la tècnica de localització de proteïnes per seccions semifines	75
Taula 7. Llistat de substàncies utilitzades en els experiments funcionals	91

iii- Abreviacions

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ATP	Trifosfat d'adenosina (de l'anglès <i>Adenosin triphosphate</i>)
BDNF	Factor neurotròfic derivat del cervell (de l'anglès <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	Albúmina sèrica bovina (de l'anglès <i>bovine serum albumin</i>)
CaC	Calfosteïna C
ChAT	Colin-acetiltransferasa
CM_{es}	Cèl·lula muscular extrasinàptica
CM_s	Cèl·lula muscular sinàptica
CN_p	Cèl·lula nerviosa preterminal
CN_t	Cèl·lula nerviosa terminal
CNTF	Factor neurotròfic ciliar (de l'anglès <i>ciliary neurotrophic factor</i>)
CS	Cèl·lula de Schwann
CS_m	Cèl·lula de Schwann mielinogènica
CS_t	Cèl·lula de Schwann telogial/terminal
D/UGC	Complex glicoproteic utrofina/distrofina
DMSO	Dimetil sulfòxid (de l'anglès <i>dimethyl sulfoxide</i>)
ECL	De l'anglès <i>enhancer luminiscent</i>
EDTA	Àcid etilè diamino tetraacètic (de l'anglès <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGTA	Àcid etilè glico tetraacètic (de l'anglès <i>ethyleneglycoltetraacetic acid</i>)
ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
EPP	Potencial de placa evocat (de l'anglès <i>endaplate potential</i>)
FGF	Factor de creixement dels fibroblasts (de l'anglès <i>fibroblast growth factor</i>)
FS	Fenedura sinàptica

g	Unitats de força centrífuga relativa
Gab-1	Proteïna adaptadora Gab-1
GDNF	Factor neurotròfic derivat de la glia (de l'anglès <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>)
HRP	Peroxidasa de rave (de l'anglès <i>horseradish peroxidase</i>)
HVA	Canals d'activació ràpida o activats per alt voltatge (de l'anglès <i>high-voltage-activated</i>)
IGF	Factor de creixement insulínic (de l'anglès <i>insulin-like growth factor</i>)
IHQ	Immunohistoquímica convencional
JNK	JUN cinasa
kDa	Quilo Dalton
LAL	Múscul elevador de les orelles o Levator auris longus
I-EPP	EPP gran (de l'anglès <i>large-EPP</i>)
LIF	Factor inhibidor dels leucòcits (de l'anglès <i>leukemia-inhibitory factor</i>)
LTP	Potenciació a llarg termini (de l'anglès <i>long-term potentiation</i>)
LVA	Canals d'activació lenta o activats per baix voltatge (de l'anglès <i>low-voltage-activated</i>)
m	Contingut quàntic
mAChR	Receptor d'acetilcolina muscarínic
mEPP	Potencials de placa miniatura (de l'anglès <i>miniature endplate potencial</i>)
MP-3	Mini-Protean 3
mRNA	RNA missatger
nAChR	Receptor nicotínic d'acetilcolina
NGF	Factor nerviós de creixement (de l'anglès <i>nerve growth factor</i>)
NMJ	Sinapsi neuromuscular (de l'anglès <i>neuromuscular junction</i>)
NRG	Neuregulina
NT	Neurotrofina
NT-3	Neurotrofina-3

NT-4	Neurotrofina-4
NT-6	Neurotrofina-6
NT-7	Neurotrofina-7
P	Dia postnatal
p75^{NTR}	Receptor de les neurotrofines p75
PBS	Tampó salí fosfat (de l'anglès <i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Índex de poli-innervació (de l'anglès <i>polyinnervation index</i>)
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKA	Proteïna cinasa A
PKC	Proteïna cinasa C
PLCγ	Fosfolipassa C gamma
PM	Potencial de membrana
PMA	Forbol èster
PS	Plecs sinàptics
PSA	Persulfat d'amoni
PSP	Persefina
PVDF	Membrana de transferència sintètica (de l'anglès <i>polyvinylidene difluoride</i>)
SDS	De l'anglès sodium dodecil sulfat
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
s-EPP	EPP petit (de l'anglès <i>small-EPP</i>)
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Sistema nerviós perifèric
TBE	Tribromoetanol
TEMED	De l'anglès N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRICT	Isotiocianat tetrametil de rodamina (de l'anglès <i>tetramethylrhodamine</i>)
Trk	Receptor tirosina cinasa relacionat amb la tropomiosina
TrkA	Receptor Trk tipus A
TrkB	Receptor Trk tipus B

TrkC	Receptor Trk tipus C
TrkB-FI	Isoforma complerta del receptor TrkB (de l'anglès <i>TrkB-full-length</i>)
TrkB-TI	Isoforma segmentada del receptor TrkB (de l'anglès <i>TrkB-truncated-length</i>)
TS	Tall semifi
v/v	Volum/volum
VDCC	Canals de calci voltatge dependents (de l'anglès <i>voltatge-dependent calcium channels</i>)
w/ v	Pes/volum
ZA	Zones actives
α-BTX	Alfa-bungarotoxina
μ-CgTx-GIIIB	μ -conotoxina GIIIB
ω-Aga-IVA	ω -agatoxina IVA
ω-CgTx-GVIA	ω -conotoxina GVIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

I- INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

La pèrdua de contactes sinàptics és un fenomen que té lloc en tot el sistema nerviós durant la histogènesi dels circuits neuronals. La superproducció sinàptica inicial que promou una àmplia connectivitat, ve seguida d'una reducció activitat-dependent del número de sinapsis, incrementant així, l'especificitat i refinant els circuits neurals. Aquesta pèrdua de contactes sinàptics és el que s'anomena procés d'eliminació sinàptica i es dona en el període de desenvolupament de manera adaptativa, i també en l'envelliment i en algunes malalties com per exemple la malaltia d'Alzheimer (Coleman i cols., 2004; Nelson, 2005). Així, per exemple durant el desenvolupament de la sinapsi neuromuscular (NMJ de l'anglès *neuromuscular junction*), una cèl·lula muscular és inicialment innervada per un número múltiple d'axons que provenen de motoneurons diferents (unes 5 de mitjana), motoneurons que al mateix temps poden innervar de centenars a milers de cèl·lules musculars diferents. Cap al final de l'eliminació sinàptica, les cèl·lules musculars reben dos axons diferents (el que coneixem com la doble-innervació) i entre ells s'estableix un procés de competició axonal per a consolidar-se. Al final d'aquest procés competitiu en l'edat adulta les sinapsis neuromusculars també anomenades plaques motores, resten innervades per un sol axó. Durant aquest procés gradual d'eliminació de sinapsis redundants en el període neonatal, es manifesten una sèrie de mecanismes moleculars pre- i postsinàptics que estableixen el patró de connectivitat neural (Jansen i Fladby, 1990).

Com ja s'ha apuntat, una mateixa motoneurona forma contactes sinàptics amb diverses cèl·lules musculars que amb el transcurs de l'eliminació sinàptica, es veuen reduïts. Es pensa en l'existència de diversos fenòmens locals que provoquen que terminals nerviosos procedents d'un mateix axó, segueixin camins diferents: l'eliminació o la consolidació (Keller-Peck i cols., 2001). Un dels possibles participants en aquests fenòmens locals, són els factors neurotròfics, que són alliberats per la fibra muscular postsinàptica i la cèl·lula de Schwann i que són essencials per la supervivència de la motoneurona. Aquests factors són captats pel terminal nerviós motor presinàptic, a través d'un receptor específic, i poden ser transportats retrògradament al cos cel·lular de la neurona motora per influenciar la seva expressió gènica (Henderson i cols., 1993; Gonzalez i cols., 1999; Pitts i cols., 2006) o produir

canvis a nivell local, en el terminal nerviós. Entre els factors neurotròfics hi ha la família de les neurotrofines (NTs) que són factors de creixement neuronals expressats en el cervell (Dalton i cols., 2009), per la micròglia (Tonchev i cols., 2008), l'oligodendròcit (Dai i cols., 2003) entre d'altres i en el sistema nerviós perifèric, en el soma de les motoneurons, en els axons (Pitts i cols., 2006) i en les cèl·lules musculars (Funakoshi i cols., 1993; Oppenheim i cols., 1992). Entre les NTs s'inclouen el *nerve growth factor* (NGF), el *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3), la neurotrofina-4 (NT-4), la neurotrofina-6 (NT-6) i la neurotrofina-7 (NT-7). Les quatre primeres s'han descrit en vertebrats i l'NT-6 i l'NT-7 en amfibis i peixos (Li i cols., 1997; Nilsson i cols., 1998). Tot i que inicialment, les NTs es van caracteritzar pels seus rols en la supervivència i diferenciació neuronal, també participen en aspectes del desenvolupament i funcionament local de la sinapsi, modulant l'eficàcia sinàptica i controlant altres aspectes de la sinaptogènesi (Poo, 2001; Huang i Reichardt, 2001; Schlessinger, 2000). Els factors tròfics i entre ells les NTs, han emergit com a senyals claus (retrògrades quan influencien les neurones presinàptiques i anterògrades que actuen sobre les cèl·lules postsinàptiques) mediadores en la plasticitat activitat-dependent tant estructural com funcional (Tarabal i cols., 1996; Lessmann, 1998; Gómez-Pinilla i cols., 2004). També s'han relacionat amb processos de regeneració, com per exemple en nervi perifèric (Meyer i cols., 1992; Lewin i cols., 1997; Novikov i cols., 1997; Yin i cols., 1998; Gordon, 2009) o en les neurones de la retina (Aguayo i cols., 1996).

Hi ha treballs que estudien la tasca que tenen les NTs en la formació i manteniment de les NMJ. Per exemple, s'ha descrit que l'activitat elèctrica modula l'expressió i alliberament de les NTs i l'expressió dels seus receptors durant el desenvolupament i en el període adult. L'activitat també pot modular l'activació i translocació a membrana dels receptors Trk tant pre- com postsinàpticament (Gall i Isackson, 1989; Funakoshi i cols., 1995). Precisament, alteracions *in vivo* en la senyalització del receptor muscular TrkB, provoca el desensamblatge de l'especialització postsinàptica durant el desenvolupament (Gonzalez i cols., 1999), suggerint que el BDNF o l'NT-4 estan implicats en el manteniment de la sinapsi. També

se sap que les NTs modulen l'expressió de la neuregulina, un factor de creixement secretat per la neurona, que estimula la síntesi dels receptors d'acetilcolina nicotínics postsinàptics (nAChRs de l'anglès *nicotinic acetylcholine receptors*) en les fibres musculars (Loeb i Fischbach, 1997; Loeb i cols., 2002). També s'ha relacionat les NTs amb la plasticitat sinàptica, alguns treballs demostren que el BDNF i l'NT-3, potencien la transmissió sinàptica en la NMJ en desenvolupament en cultius de *Xenopus laevis* (Lohof i cols., 1993; Kleiman i cols., 2000; Poo, 2001).

Per tant, aquestes evidències suggereixen que les NTs podrien estar implicades en el desenvolupament de la NMJ i en el manteniment d'aquesta en el període adult. Per això, aquesta tesi es centrarà en estudiar primerament la localització precisa de les NTs BDNF, NT-4 i NT-3 i els seus receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} en la sinapsi neuromuscular i avaluar la seva participació en el procés de desconexió i eliminació sinàptiques durant el desenvolupament, i en el control de la neurotransmissió en l'edat adulta.

1. LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

La unió neuromuscular o sinapsi neuromuscular (NMJ) és una estructura funcional, concretament, és el punt d'unió entre la regió més terminal d'una motoneurona i una cèl·lula del teixit muscular esquelètic. La finalitat d'aquesta estructura és la transmissió de l'impuls motor nerviós a la fibra muscular, que acaba amb la contracció inicial de la fibra muscular adjacent i finalment de la totalitat del múscul.

La NMJ és una sinapsi química colinèrgica i nicotínica, ideal per l'estudi de diferents aspectes de l'estructura i funció sinàptiques. Aspectes que després es podran extrapolar a altres tipus de sinapsis químiques, tenint en compte les diferències existents entre elles, i les limitacions que això comporta.

La NMJ està formada per tres elements: l'element presinàptic, l'element postsinàptic i l'element glial o cèl·lula de Schwann (Figura 1). El primer d'ells està constituït per la terminació nerviosa motora i el segon per l'àrea de la cèl·lula o fibra muscular amb la qual realitza el contacte sinàptic (Courteaux, 1973; Ogata, 1988; Engel, 1994; Sanes i Lichtman, 1999). El tercer element, és la cèl·lula de Schwann anomenada també cèl·lula preterminal/mielinogènica o terminal/teloglial, segons l'altura on es troba de l'axó. La CS terminal està estretament associada als components pre- i postsinàptics envoltant el terminal nerviós i precintant l'espai sinàptic amb les seves projeccions. En un principi, es va descriure que la seva funció era merament estructural, però cada vegada hi ha més estudis que li atorguen més rols (Feng i Ko., 2008). Les regions sinàptiques dels tres elements cel·lulars estan molt especialitzades. Contenen molècules i orgànuls específics en concentracions altes, que són menys presents o inexistents en l'espai extrasinàptic.

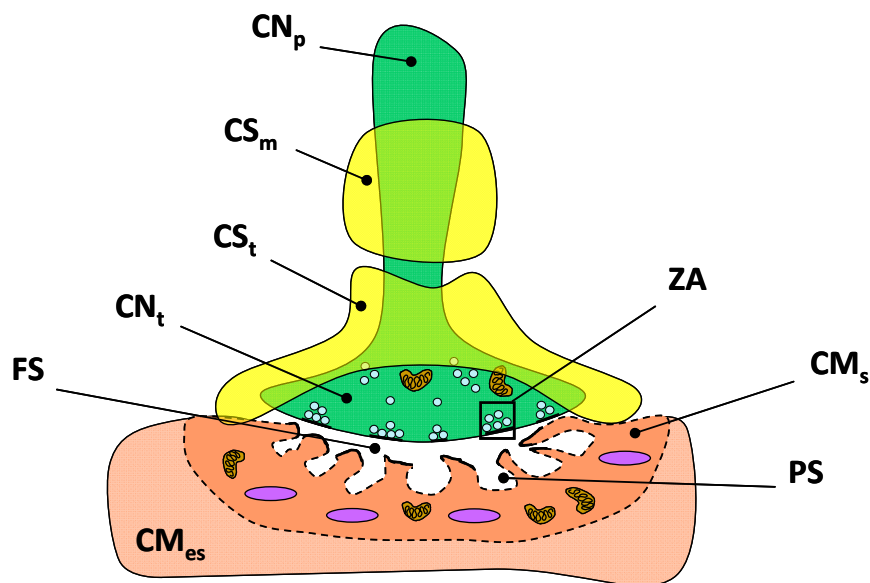


Figura 1. Esquema de la sinapsi neuromuscular. En verd la cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**), on s'hi troben les zones actives (**ZA**). Prop d'aquestes ZA s'observen les diferents vesícules sinàptiques en blau. En groc la cèl·lula de Schwann mielinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). La fenestra sinàptica (**FS**) entre el terminal nerviós i la cèl·lula muscular en carabassa. Aquesta es divideix per un costat en l'àrea sinàptica (**CM_s**) que conté els plecs sinàptics (**PS**) i l'àrea extrasinàptica (**CM_{es}**). En la **CM_s** s'observa en lila els nuclis sinàptics i en marró els mitocondris.

A més a més d'aquests tres components, també cal mencionar la fenestra sinàptica (veure **FS** Figura 1) que és l'espai comprès entre el terminal nerviós i la membrana postsinàptica de la fibra muscular. És aproximadament de 50 nm, i és el lloc on el terminal nerviós allibera l'acetilcolina (ACh, de l'anglès *acetylcholine*) que després serà captada pels nAChRs de la membrana postsinàptica. La difusió de l'ACh a través de la fenestra sinàptica és molt ràpida (50 μ s) degut a la curta distància que ha de travessar i a l'elevada constant de difusió que té l'ACh a la làmina basal sinàptica (Salpeter, 1987). La làmina basal, és un conjunt de glicoproteïnes filoses que envolta cada fibra muscular. Hi ha dos tipus de làmina basal, la sinàptica que és pròpia de l'àrea sinàptica de la cèl·lula muscular, que presenta proteïnes com ara el col·lagen tipus IV, la laminina i la integrina entre d'altres i l'extrasinàptica que envolta la resta de

la fibra. La làmina basal sinàptica es troba dins la fenedura sinàptica i s'estenen dins dels plecs sinàptics primaris i secundaris (Salpeter, 1987), que com es tractarà més endavant, són les invaginacions de la membrana sinàptica de la cèl·lula muscular, espacialment oposades al terminal nerviós.

En la investigació, s'utilitzen diferents models de NMJ, però el més comú és el model neuromuscular de mamífer com el de rata o el ratolí entre d'altres. De fet, el primer estudi amb rigor científic en el que es va demostrar la transmissió sinàptica química, es va fer amb NMJ adulta de vertebrat (Dale i cols., 1936). També va ser el model per a la determinació de l'alliberació vesicular quàntica (Katz, 1966). Per altra banda, també hi ha treballs realitzats amb NMJ d'amfibi (granota, *Xenopus laevis*) i fins i tot d'insecte (mosca, *Drosophila melanogaster*). La NMJ també s'ha utilitzat en estudis de recerca clínica ja que és clau en diferents malalties del sistema nerviós, com per exemple la miastenia gravis, la síndrome miastènica de *Lambert-Eaton* o la distròfia muscular de *Duchenne*.

1.1 Elements de la sinapsi neuromuscular

1.1.1 Element presinàptic

Les fibres musculars esquelètiques es troben innervades per les motoneurons amb el soma ubicat a la medul·la espinal. L'axó d'aquestes motoneurons es ramifica a mesura que es va aproximant al múscul, i a nivell intramuscular dona lloc als anomenats preterminals nerviosos (veure **CN_p** Figura 1), que acaben amb els terminals nerviosos (veure **CN_t** Figura 1), la porció final especialitzada de l'axó de la motoneurona que conforma l'element presinàptic de la NMJ. La seva finalitat és l'alliberació de l'ACh per un procés que s'explicarà més endavant, que desencadena la contracció de la fibra muscular. A causa de la ramificació intramuscular, una

motoneurona acostuma a innervar un sol múscul, però un mateix axó pot arribar a innervar milers de fibres musculars.

El terminal nerviós conté un gran nombre de vesícules sinàptiques, d'uns 50 nm de diàmetre aproximadament, que són plenes del neurotransmissor, l'ACh. Cada vesícula conté a més de les molècules d'ACh, adenil trifostat (ATP de l'anglès Adenosin triphosphate) i proteoglicans que s'alliberen juntament amb el neurotransmissor (Salpeter, 1987). Per tal de poder sintetitzar i alliberar el neurotransmissor, es necessita molta energia, pel que el terminal nerviós també conté molts mitocondris. El terminal nerviós es troba polaritzat, ja que la majoria de vesícules sinàptiques es troben agrupades en àrees (zones actives, veure **ZA** Figura 1) de major densitat en regions de la membrana presinàptica més distal; mentre que els mitocondris s'ubiquen més pròxims a la cèl·lula de Schwann (CS). Les zones actives són llocs de fusió de les vesícules amb la membrana del terminal nerviós, per alliberar el seu contingut a la fenedura sinàptica.

A l'axoplasma, s'hi han identificat diferents orgànuls com el reticle endoplasmàtic llis i els endosomes, on es dona el reciclatge de les vesícules creant-ne de noves que després s'ompliran amb ACh i s'utilitzaran de nou. En l'axoplasma també s'hi troben molècules com l'ACh de les vesícules sinàptiques, el transportador vesicular d'ACh, l'enzim colin-acetiltransferasa (ChAT, de l'anglès *choline acetyltransferase*) que sintetitza l'ACh a partir de la colina recuperada de la fenedura (alliberada per l'acetilcolinesterasa) i de l'acetil-CoA procedent dels mitocondris (Sudhof, 1995; Colakos i Scheller, 1996). Altres proteïnes formen un complex macromolecular anomenat SNARE que desenvolupa un paper essencial en la fusió de les membranes (Broadie, 1995; Sanes i Lichtman, 1999; Jena, 2009). Les vesícules es distribueixen en diferents grups tenint en compte la proximitat a les zones actives i la disponibilitat per ser excitades. El primer d'ells i més pròxim a la zona activa de la membrana presinàptica, és el dipòsit ancorat, corresponent a les vesícules que estan preparades per a fusionar-se i alliberar l'ACh. Immediatament per damunt d'aquestes, apareix el dipòsit proximal de vesícules alliberables, preparat per a ser utilitzat si es requerís. El tercer grup, i més llunyà de les zones actives, és el dipòsit de reserva (Lima i cols.,

2010). En la porció més preterminal no hi ha tantes vesícules ni mitocondris, i el més abundant són components del citoesquelet com els microtúbuls i neurofilaments (Yee i cols., 1988; Gotow, 1992). Les vesícules sinàptiques es fixen als neurofilaments de tipus actomiosínic que estan a la vegada adherits a les zones actives, fent que les vesícules sinàptiques s'agrupin i es disposin en doble filera al voltant dels llocs d'alliberament del neurotransmissor (Heuser i cols., 1974).

S'han identificat moltes molècules a l'axolema del terminal nerviós associades a les zones actives, com els canals de K^+ i Ca^{2+} dependents de voltatge que gràcies a la seva localització específica, magnifiquen l'eficàcia de la secreció dependent de Ca^{2+} (Robitaille i cols., 1993; Sugiura i cols., 1995; Day i cols., 1997). Els autoreceptors muscarínics (mAChRs), també es situen en el terminal presinàptic i exerceixen funcions de control de la neurotransmissió i eficàcia sinàptiques (Ganguly i Das, 1979; Abbs i Joseph, 1981; Wessler i cols., 1987; Arenson, 1989).

1.1.2 Element postsinàptic

El terminal nerviós realitza el contacte sinàptic amb una cèl·lula muscular. Aquesta cèl·lula muscular es divideix en dues zones diferents, la part oposada a la regió presinàptica de la NMJ que es denomina element postsinàptic (veure **CM_s**, Figura 1) i la resta de la cèl·lula muscular anomenada extrasinàptica (veure **CM_{es}**, Figura 1). L'element postsinàptic està format per la membrana de la fibra muscular i la làmina basal d'aquesta, que en aquest punt estan especialitzades per tal de poder respondre de forma ràpida i eficaç a l'arribada de l'ACh. La fibra muscular és cilíndrica i aproximadament en el terç mig, presenta la unió amb el terminal nerviós, formant la placa motora. Les branques nervioses terminals entren en contacte amb la membrana postsinàptica en unes depressions de la membrana anomenades plecs sinàptics primaris. La regió de la membrana plasmàtica a aquest nivell, pateix unes invaginacions amb la finalitat d'incrementar la superfície de contacte, formant els plecs sinàptics secundaris (veure **PS** Figura 1). Aquests són paral·lels entre sí, perpendiculars al plec

primari, i penetren dins del miòcit a una profunditat d'1 μm en els mamífers (Salpeter, 1987). En les crestes d'aquests plecs secundaris, hi ha una concentració molt alta d'nAChRs, que formen part de la superfamília de canals iònics activats per lligands i que conformen un canal iònic. Concretament n'hi ha més de $10.000/\mu\text{m}^2$ a la regió sinàptica, que disminueixen a $10/\mu\text{m}^2$ a les regions extrasinàptiques (Salpeter i cols., 1988). Els nAChRs estan en continu reciclatge, i quan arriben a un determinat temps en que es poden considerar vells, s'internalitzen i degraden. La vida mitjana dels nAChRs durant el desenvolupament és de menys de 24 hores i en l'adult de 8 a 11 dies. La síntesi dels nous nAChRs és regulada pels nuclis sinàptics.

L'nAChR té una estructura pentaèdrica, compost per una combinatòria de quatre subunitats diferents: α , β , δ , ϵ , que es converteixen en cinc en els mamífers, on segons el moment evolutiu de l'individu presenta una subunitat γ en comptes de la ϵ . D'aquesta manera existeixen dues isoformes de nAChRs, per un costat la pròpia de l'edat adulta: $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ i per l'altre la del desenvolupament: $\alpha_2\beta\delta\gamma$, on la subunitat ϵ es troba substituïda per una γ . Amb la maduració, decreix l'expressió de la subunitat γ i incrementa la de la ϵ , tot i que amb la inactivitat, la denervació o la inflamació en l'edat adulta, es dona la re-expressió de la subunitat γ (Fagerlund i Eriksson, 2009). Cadascuna d'aquestes cinc subunitats finals, està formada per quatre dominis transmembrana: M1-M4 (Le Novère i Changeux, 1995), un domini extracel·lular N-terminal i un intracel·lular C-terminal (Kalamida i cols., 2007). Dues molècules d'ACh s'enganxen als dos llocs d'unió situats en el domini d'unió al lligand, que està format per la regió N-terminal de les dues subunitats α i exposat a la superfície extracel·lular (Montal i Opella, 2002). Quan s'hi uneix, el receptor pateix un canvi conformacional que obre el canal iònic, permetent el pas dels ions (entrada de Na^+ a l'interior de la fibra muscular i sortida de K^+) durant un temps aproximadament d'1-2 ms. Aquest trànsit iònic desencadena una despolarització de la membrana postsinàptica que finalitzarà amb la contracció de la fibra muscular.

A la regió subsinàptica de la fibra muscular, hi ha un seguit d'òrgànuls i estructures com els nuclis subsinàptics, encarregats de la transcripció gènica dels nAChRs i altres proteïnes. També s'hi troben mitocondris, que proporcionaran

l'energia necessària, aparells de Golgi i ribosomes entre d'altres. En el fons dels plecs és on hi ha els canals de Na^+ postsinàptics (Flucher i Daniels, 1989). S'hi localitzen també el citoesquelet, microtúbuls i microfilaments, responsables de mantenir l'estructura dels plecs primaris i secundaris i d'ancorar els nAChRs a la superfície de les crestes. Aquest ancoratge es dona per l'associació del segment citoplasmàtic del receptor a un complex proteic anomenat *dystrophin/utrophin glycoprotein complex* (D/UGC). Aquest té la funció de generar i mantenir la distribució espacial dels nAChRs a dominis restringits, així com unir el citoesquelet muscular a la matriu extracel·lular (Straub i Campbell, 1997).

1.1.3 Element glial

La cèl·lula de Schwann (CS) és una cèl·lula glial perifèrica. Vàries d'elles, acompanyen als axons i terminals nerviosos de les motoneurons i cal distingir-ne dos tipus segons la porció de l'axó on es troben i si formen o no mielina. El primer tipus, que es pot anomenar cèl·lula mielinogènica o preterminal, es localitza al voltant de l'axó i és la formadora d'una beina aïllant de mielina (veure **CS_m** Figura 1). El segon tipus, és la CS terminal o telogial, situada a la part més distal del soma de la motoneurona i recobrint les terminacions nervioses que fan contacte amb la fibra muscular (veure **CS_t** Figura 1). Aquest segon tipus no forma mielina i és l'encarregada d'aïllar la NMJ del medi extern i de proporcionar-li un medi adequat a més de substàncies tròfiques. Evidències recents indiquen que factors tròfics derivats de la CS, afavoreixen la sinaptogènesi en cultius de neurona-múscul (Peng i cols., 2003). Els dos tipus de CS tenen expressió gènica diferent (Georgiou i Charlton, 1999).

La mielina es compon de capes concèntriques de la membrana de les CSs que rodegen de manera espiral a l'axó de la neurona. Hi ha petits espais de l'axó però, que no presenten aquest embolcall mielínic deixant bandes circulars que coincideixen amb el límit entre les diferents CSs. Aquestes bandes sense mielina s'anomenen nòduls de Ranvier, i fan aproximadament 1 μm de longitud. Serveixen per a que l'impuls nerviós

es traslladi de manera saltatòria, el que garanteix una major velocitat de conducció i menys possibilitat d'error. El potencial d'acció de la neurona aconsegueix saltar d'un nòdul a l'altre degut a que en aquests espais hi ha una gran dotació de canals de Na^+ i K^+ .

Temps enrere s'atribuïa a la CS, una funció merament estructural i facilitadora de la conducció, però estudis més recents reconeixen altres funcions en processos de creixement dels axons, manteniment i regeneració en les lesions axonals com la neurapraxia o l'axonotmesis (Balice-Gordon, 1996). Les CSs migren juntament amb els axons fins a formar el contacte sinàptic, però es coneix que l'axó podria arribar a fer contacte amb la cèl·lula muscular en absència de la CS. Aquests terminals nerviosos però, acaben per retraure's, el que explica el paper de manteniment que exerceix la CS en la sinapsi neuromuscular (Feng i Ko, 2008). Se sap que la CS terminal també pot tenir un paper clau en la comunicació entre la part pre- i postsinàptica de la sinapsi (Castonguay i cols., 2001; Auld i Robitaille, 2003).

1.2 Funcionament de la sinapsi neuromuscular

1.2.1 Transmissió neuromuscular

La finalitat de la NMJ és la de provocar la contracció del múscul esquelètic. Per aconseguir-ho, la motoneurona genera un potencial d'acció, que permet que la informació arribi als terminals nerviosos mitjançant la conducció saltatòria (Huxley i Stampfli, 1949; Tasaki, 1959). Una vegada en els terminals, es genera un segon tipus de senyal, aquest cop químic, entre la motoneurona i la fibra muscular. Aquests dos tipus de mecanismes de senyalització (potencials d'acció i senyals sinàptiques) són la base de totes les capacitats de processament d'informació en el sistema nerviós.

El potencial d'acció és un moviment iònic entre el compartiment intra i extracel·lular, que es descriu com a fenomen del tot o res, que es genera al soma de la neurona i viatja al llarg de l'axó fins arribar al terminal nerviós. Amb la despolarització

d'aquest terminal nerviós, s'obren els canals de calci voltatge dependents (VDCC de l'anglès *voltage-dependent calcium channels*) presinàptics, permetent l'entrada de Ca^{2+} a l'interior. Aquest Ca^{2+} estimula la fusió de les vesícules sinàptiques a les zones actives del terminal, a través d'un procés que s'anomena excitosi, que acaba amb l'alliberament d'ACh a la fenedura sinàptica (Stanley, 1993). Aquest procés que és dependent de Ca^{2+} (Katz i Miledi, 1965; Miledi, 1973), també depèn de l'acoblament del complex SNARE (Rizo i Rosenmund, 2008; Jena, 2009). Les proteïnes que conformen el complex SNARE es divideixen en dos grups, el primer format per una proteïna que es localitza a la membrana de la vesícula sinàptica que és la sinaptobrevina i l'altre grup format per les proteïnes que es troben associades a la membrana del terminal nerviós, la SNAP-25 i la syntaxina (Bajjalieh i Scheller, 1995; Sudhof, 1995; Sudhof, 2004). Una quarta proteïna indispensable per a la fusió de les vesícules, és la sinaptotagmina, proteïna integral de la vesícula i sensora de Ca^{2+} . Quan el Ca^{2+} entra al terminal nerviós per mitjà dels VDCCs, s'uneix a la sinaptotagmina i el complex SNARE canvia de conformació, resultant en la fusió de les dues membranes.

Després de l'excitosi, l'ACh difon per tota la fenedura sinàptica i s'uneix als nAChRs. La unió de dos molècules d'ACh a les dos subunitats α , activa el receptor i obre el canal iònic intramolecular. Així es permet el pas simultani de ions Na^+ al seu interior i la sortida de ions K^+ , alterant el potencial de membrana postsinàptic i obtenint com a resposta un potencial de placa evocat (EPP de l'anglès *endplate potential*) que és una despolarització local de la membrana de les fibres musculars. Aquesta despolarització local, activa els canals de Na^+ postsinàptics dependents de voltatge que es localitzen al fons dels plecs secundaris (Flucher i Daniels, 1989), desencadenant un potencial d'acció que es propaga en totes les direccions de la fibra muscular, iniciant una seqüència d'esdeveniments intracel·lulars que finalitza amb la contracció de la fibra. Una vegada l'ACh ja ha activat els seus receptors, es separa d'aquests i difon cap a la membrana basal on és hidrolitzada per l'acetilcolinesterasa (AChE). Els productes d'aquesta hidròlisi: acetil i colina, són reciclats per a ser reutilitzats.

A més d'aquests episodis evocats, en els terminals nerviosos hi ha un alliberament espontani d'ACh on no es necessita de l'estimulació del nervi. El resultat és un potencial de placa miniatura (mEPP de l'anglès *miniature endplate-potencial, veure apartat següent per a més detalls*). Els mEPPs van ser descrits per primera vegada per Fatt i Katz (1952) quan es trobaven fent registres electrofisiològics en músculs de granota. Un mEPP representa el contingut d'ACh d'una vesícula, el que en el seu moment es va descriure com a quàntum (quanta), unitat mínima del neurotransmissor. El número de molècules d'ACh per vesícula sinàptica s'ha estimat en alguns milers, presentant diferències segons l'espècie i el tipus de músculs estudiats.

En estudis electrofisiològics, en els que s'estudiaven les amplades dels EPPs i dels mEPPs, es va veure que cada EPP està format per la suma independent de múltiples mEPPs (Fatt i Katz, 1952).

Un altre concepte important a tenir en compte, és el número de quantes alliberades per impuls nerviós, l'anomenat contingut quàntic (m). Com ja s'ha dit, el mEPP és el resultat de l'alliberament d'una única vesícula d'ACh o quanta i l'EPP d'unes 20-300 vesícules, variable segons l'espècie estudiada. Així, en diferents models neuromusculars en animals de laboratori es parla d'un contingut quàntic de 200-300 quantes (Hubbard i Wilson, 1973; Katz i Miledi, 1979) i en músculs humans de 28-41 quantes (Engel i cols., 1990; Slater i cols., 1992).

1.2.2 Diferències entre la neurotransmissió neonatal i adulta

Les sinapsis neuromusculars ja són funcionals abans del naixement, i els neonats depenen totalment de la transmissió neuromuscular d'alguns músculs com el diafragma o la musculatura de la deglució per a sobreviure. En quant a la neurotransmissió evocada del nou-nat, els diferents terminals nerviosos que es troben innervant simultàniament una mateixa fibra muscular, comencen presentant la mateixa força sinàptica (mesurada en contingut quàntic, Colman i cols., 1997) i al llarg del seu desenvolupament, un d'ells acaba presentant més eficàcia sinàptica i sent

l'únic que resta innervant la fibra muscular. El procés de l'eliminació sinàptica es tractarà més endavant en l'apartat 2. *Eliminació sinàptica*.

La cèl·lula muscular neonatal és molt sensible a l'ACh en tota la seva superfície. D'aquesta manera, a edats embrionàries de 17 dies fins als 3 postantals, es pot aconseguir la despolarització de la cèl·lula amb l'aplicació d'ACh amb una pipeta, al llarg de tota la seva membrana (Diamond i Miledi, 1962), tot i que les regions més pròximes a la placa, són encara més sensibles. Amb el desenvolupament, les zones sensibles s'acaben restringint a les àrees amb contactes sinàptics.

En la neurotransmissió fetal i més tard en el neonat, la freqüència dels mEPPs és més baixa que en l'adult. En el nostre laboratori, utilitzant el múscul LAL (*Levator auris longus*), els valors mitjans observats són aproximadament d'1 mEPP per minut enfront als 60 per minut en l'adult. Això podria explicar-se per una menor síntesis o un pitjor emmagatzematge de l'ACh, que estaria limitant l'alliberació. Això però, no és així, donat que l'alliberació es pot incrementar amb l'administració d'impulsos nerviosos, irritació mecànica o amb solucions despolaritzants. S'ha descrit en un model de diafragma de rata, que l'augment progressiu de la freqüència dels mEPPs durant el desenvolupament de la NMJ, podria estar relacionat amb l'increment de l'àrea de la terminació nerviosa que està en contacte amb la fibra muscular (Diamond i Miledi, 1962). En el cas de l'amplada dels mEPPs, en el nadó obtenim valors sobre els 2 mVolts. Aquesta amplada relativament més gran dels episodis miniatures en el nadó que en l'adult (veure més avall), es pot explicar per les característiques passives del potencial de membrana, donat que el diàmetre de les cèl·lules musculars és més petit i exerceixen més resistència davant de l'entrada. Un altre element a tenir en compte per poder explicar les grans amplades dels mEPPs en el nadó, és la poca quantitat i baixa qualitat de l'AChE que presenten les plaques immadures (Kupfer i Koelle, 1951).

En el cas dels mEPPs de l'adult, com ja s'apuntava, en el nostre model presenten unes amplades més petites que en el nadó, oscil·lant els 0.5-0.7 mVolts. En quant a l'amplada promig dels EPPs, en múscul LAL de nadó, els valors amb els que es treballa en el nostre laboratori poden arribar a ser de 10 mVolts. En els adults, en canvi

les amplitudes dels EPPs poden oscil·lar entre 15-40 mVolts. A part de la freqüència i l'amplada, el curs temporal dels mEPPs del nadó també és diferent del que es dona en l'adult. Així, mentre en l'adult acostuma a ser d'1 ms, en el nadó pot arribar a ser de 5 ms. Pel que fa al temps de caiguda en el nadó també és més gran que en l'adult.

1.2.3 Molècules implicades en la neurotransmissió neuromuscular

Són varies les molècules que estan implicades en el control i modulació de la neurotransmissió en la NMJ, com per exemple els ja anomenats mAChRs i la proteïna cinasa A (PKA) entre d'altres, però en aquest apartat únicament es parlarà de les dues que són objecte d'estudi en la última part de la tesi, la proteïna cinasa C (PKC de l'anglès *protein kinase C*) i el VDCC tipus L.

En el següent esquema (Figura 2), es mostren una part de les relacions descrites fins al moment al nostre laboratori, entre les dues molècules d'estudi d'aquesta tesi en els diferents terminals nerviosos de les sinapsis d'interès: per un costat la sinapsi doble-innervada (formada per l'EPP petit i gran) i per l'altre la mono-innervada en el nadó i en l'adult (per a més detalls, veure apartat 3. *Material i mètodes*). Durant el text, s'anirà fent referència a aquesta figura (Figura 2).

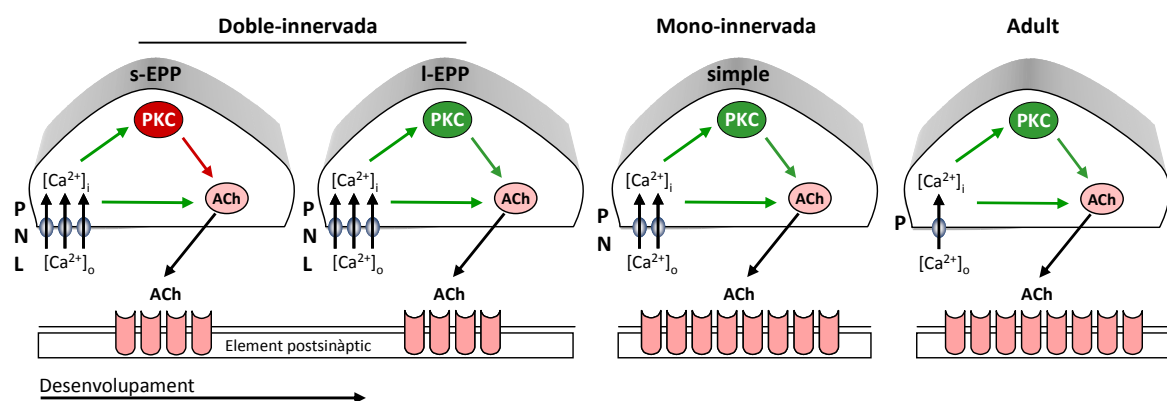


Figura 2. Esquema dels diferents terminals nerviosos estudiats i les implicacions dels VDCCs i la PKC. Es mostren els dos terminals de la sinapsi doble-innervada, el dèbil (que genera l'EPP petit, s-EPP) i el fort (que genera l'EPP gran, I-EPP), el terminal simple de la sinapsi mono-innervada i el terminal madur en l'edat adulta.

1.2.3.1 Canals de calci dependents de voltatge

Els VDCC són un grup de canals iònics que es troben en les cèl·lules excitable (miòcits, neurones, glia, etc) amb permeabilitat al ió Ca^{2+} (Yamakage i Namiki, 2002; Catterall i cols., 2005). En estat de repòs, normalment es troben tancats i s'activen davant d'una despolarització del potencial de membrana. L'obertura d'aquests canals permet l'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula, que depenent del tipus que sigui podrà desencadenar per exemple la contracció muscular, l'excitació neuronal, l'expressió gènica o l'alliberament de neurotransmissors o hormones. Ja s'ha mencionat anteriorment que els VDCCs es troben a les zones actives dels axons motors (Heuser i cols., 1974; Catterall, 1999) i són necessaris per a permetre l'entrada de Ca^{2+} que estimularà la fusió de les vesícules sinàptiques amb l'axolema, i el posterior alliberament de l'ACh a la fenedura sinàptica. Els VDCCs exerceixen les seves funcions biològiques mitjançant diversos efectors intracel·lulars. Així, el canal tipus P/Q modula la transmissió sinàptica controlant la fusió de les vesícules amb la membrana plasmàtica, mitjançant la seva relació amb el complex SNARE (Bennett i cols., 1992a, 1992b; Sheng i cols., 1994; Spafford i cols., 2003). En el nostre laboratori, s'ha descrit que el canal P/Q modula també els mAChRs tipus M1 i M2 en la transmissió sinàptica en l'adult (Santafé i cols., 2003, 2004), i és indispensable en la modulació de l'alliberació d'ACh mediada per la PKC i la PKA (Santafé i cols., 2005, 2006).

Els VDCCs estan formats per diferents subunitats : α_1 , $\alpha_2\delta$, β_{1-4} i γ . L' α_1 és la que conforma el porus i a la qual s'hi uneixen la majoria dels agents farmacològics, l' $\alpha_2\delta$ i la β_{1-4} són dues subunitats estructurals-reguladores, i la unitat γ és la subunitat moduladora del flux de Ca^{2+} (Catterall, 2000; Sandoval-Romero i Felix-Grijalva, 2003). Tenint en compte les propietats electrofisiològiques i farmacològiques, els VDCCs es poden classificar en diferents subtipus: els canals d'activació lenta o activats per baix voltatge (LVA de l'anglès *low-voltatge-activated*) com són els canals T, i els canals d'activació ràpida o activats per alt voltatge (HVA de l'anglès *high-voltatge-activated*) que són els canals L, N, P/Q i R (Catterall, 1995; Hofmann i cols., 1994). Aquesta nomenclatura per lletres va ser la utilitzada inicialment al descriure els diferents

canals, utilitzant la inicial dels teixits on es van localitzar o per les propietats farmacològiques (Nowycky i cols., 1985). Més tard es va designar una altra nomenclatura més formal, tenint en compte les subunitats α_1 que conformen els porus dels canal (Birnbaumer i cols., 1994). Finalment, s'ha creat una tercera i última nomenclatura que s'ha basat en les seqüències de proteïnes (Ertel i cols., 2000) i s'han designat com a Ca_v , fent referència al ió al que són permeables i a la seva dependència de voltatge. En aquest treball es farà servir la nomenclatura inicial. A la taula següent es mostren les correspondències entre les diferents nomenclatures:

Canal	Subunitats α_1	Ca_v
L	$\alpha_{1S}, \alpha_{1C}, \alpha_{1D}$ i α_{1F}	1.1, 1.2, 1.3 i 1.4
P/Q	α_{1A}	2.1
N	α_{1B}	2.2
R	α_{1E}	2.3
T	α_{1G}, α_{1H} i α_{1I}	3.1, 3.2 i 3.3

Taula 1. Correspondències de les diferents nomenclatures dels VDCCs. Taula adaptada de Urbano i cols., 2008.

Com es pot veure a la Figura 2, els canals L, N P/Q i R es troben expressats de diferent manera en el múscul adult i en el neonat. Així, diversos estudis demostren que la neurotransmissió en les sinapsis de mamífers adults, està relacionada amb el Ca^{2+} que entra pels VDCCs tipus P/Q, ja que el seu bloqueig farmacològic amb ω -Agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA) anul·la la neurotransmissió en ratolins adults (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995) i en músculs humans (Protti i cols., 1996). Altres estudis demostren que ni el canal L ni el canal N participen en la neurotransmissió evocada de les sinapsis adultes (Penner i Dreyer, 1986; Atchison, 1989; Bowersox i cols., 1995; Lin i Lin-Shiau, 1997) però si en l'activitat espontània de les mateixes (Protti i cols., 1991; Losavio i Muchnik, 1997). A més a més, estudis immunohistoquímics en el nostre laboratori, identifiquen el canal tipus N en terminals nerviosos d'alguns músculs adults tot i que no són funcionals (Santafé i cols.,

2005). Un treball de Perissinotti i col·laboradors de l'any 2008, suggereix que el canal tipus L promou l'endocitosi, descrivint per primera vegada un rol modulador d'aquest canal en l'alliberament de l'ACh en els terminals nerviosos adults (Perissinotti i cols., 2008).

L'entrada del Ca^{2+} pels VDCCs s'ha relacionat amb el fenomen de l'eliminació sinàptica (Zhu i Vrbová, 1992; Santafé i cols., 2001) i el seus acoblaments a l'alliberament del neurotransmissor s'han estudiat durant el desenvolupament (Rosato-Siri i Uchitel, 1999; Sugiura i Ko, 1997), arribant a la conclusió de que els canals tipus L i N, participen en la neurotransmissió neonatal, així com també el P/Q.

En el nostre laboratori s'han realitzat diversos estudis en els que s'han descrit les diferències d'expressió i funcionalitat entre els VDCCs en les sinapsis simples i dobles durant el període de l'eliminació sinàptica (Figura 2). En el cas de les sinapsis mono-innervades, el bloqueig dels VDCCs tipus P/Q (amb ω -Agatoxina-IVA) i tipus N (amb ω -conotoxina-GVIA, ω -CgTx-GVIA) provoca una disminució de la neurotransmissió (80 i 60% respectivament) mentre que el bloqueig del canal L (amb nitrendipina) no modifica la neurotransmissió. Això evidencia l'acoblament dels dos primers en el control de la neurotransmissió de la sinapsi simple, mentre que amb el desenvolupament, el canal L deixa de ser funcional fins a desaparèixer. A més a més, amb la maduració, la ω -CgTx-GVIA es torna ineficaç pel que molt probablement el canal N té un rol important en el moment de la diferenciació presinàptica i en el procés d'eliminació sinàptica, però després desapareix com el canal L (Sugiura i Ko, 1997; Iwasaki i Takahashi, 1998; Iwasaki i cols., 2000). Això té un lligam amb els diferents estudis ja citats anteriorment, en els que s'ha demostrat que el control de la neurotransmissió en les sinapsis adultes, l'exerceix el canal tipus P/Q, l'únic que resta a la NMJ amb l'assoliment de la maduresa.

En el cas dels terminals fort i dèbil de la sinapsi doble-innervada, són els canals N, L i P/Q els que controlen l'alliberació de l'ACh, tot i que hi participen de diferent manera (Santafé i cols., 2001). S'ha demostrat que el bloqueig dels tres canals amb els

mateixos components que anteriorment s'han mencionat, provoquen una inhibició en el terminal fort, mentre que potencien el dèbil. A més a més, la sensibilitat del I-EPP al bloqueig dels canals P/Q i N, és molt semblant a la de l'EPP de la sinapsi mono-innervada (un 80% aproximadament), el que suggereix que el I-EPP pot ser el contacte sinàptic supervivent a l'eliminació sinàptica. En resum, mentre que els VDCCs tipus P/Q, N i L estan directament lligats a la neurotransmissió del terminal fort, garantint la màxima entrada de Ca^{2+} i assegurant-ne la supervivència, en el cas del terminal dèbil de la sinapsi doble, l'entrada de Ca^{2+} pels mateixos canals, activa un mecanisme repressiu de la neurotransmissió, que pot estar operant mitjançant les proteïnes cinases (Lanuza i cols., 2001; Jia i cols., 1999) o per proteases dependents de Ca^{2+} (Connold i cols., 1986; Van Essen i cols., 1990), provocant finalment la desconnexió del terminal dèbil (Santafé i cols., 2001, 2002).

Encara que el canal P/Q és el responsable de la neurotransmissió en l'adult, hi ha diferents condicions experimentals o patològiques on s'ha vist que estan implicats altres canals a part del P/Q. Una d'aquestes condicions és la reinnervació, on Katz i col·laboradors (1996) van veure que la neurotransmissió també està acoblada al canal L. En estudis de la nostra unitat, també s'ha vist l'aparició dels canals L i N acoblats a la neurotransmissió durant el període de recuperació després d'un bloqueig de la neurotransmissió per l'administració de toxina botulínica en músculs adults (Santafé i cols., 2000). Altres autors relacionen el canal L amb la neurotransmissió en l'adult quan s'inhibeixen les proteïnes fosfatases i el Ca^{2+} intracel·lular està compromès amb el quelant BAPTA (Urbano i cols., 2001). Una altra situació on s'ha vist una modificació dels VDCCs, és quan la subunitat α_{1A} del canal P/Q és eliminada genèticament, i en aquest cas la neurotransmissió depèn dels canals N i R (Urbano i cols., 2003).

1.2.3.2 Proteïna cinasa C

Existeix una ampla varietat de factors extracel·lulars i vies de senyalització intracel·lulars implicades en la regulació de la funció sinàptica mitjançant la fosforil·lació de proteïnes. Una de les molècules efectores en aquest procés són les proteïnes cinases, enzims que fosforil·len proteïnes, provocant la seva activació o inactivació mitjançant la transferència de grups fosfats de l'ATP. Les proteïnes cinases es divideixen en dues famílies, la de les serina/treonina cinases i la de les tirosina cinases. La primera família fosforil·la la proteïna o substrat en un residu serina o treonina i la segona família ho fa en un residu tirosina. La primera de les famílies presenta dues subfamílies: les proteïnes cinases dependents de segons missatgers i les proteïnes cinases que són independents d'aquests. La PKC és un enzim de la família de les proteïnes serina-treonina cinases, concretament de la subfamília que són dependents de segons missatgers: en aquest cas el Ca^{2+} . Quan la PKC fosforil·la una proteïna, li adhireix càrregues negatives i modifica la seva conformació i funció podent provocar un canvi en la seva activitat o en la seva localització cel·lular o l'associació a altres proteïnes (Edelman i cols., 1987). L'activitat metabòlica de les proteïnes unides al fòsfor va ser descrita per primera vegada pel grup de Davidson l'any 1949, i és una de les vies de regulació més important utilitzada per les cèl·lules en la modulació de processos bioquímics i fisiològics com a resposta a senyals extracel·lulars (Hemmings i cols., 1989). El procés contrari a la fosforilació és la defosforilació, a càrrec de les proteïnes fosfatases, que són enzims que catalitzen l'eliminació dels grups fosfats, deixant lliure la proteïna.

L'activitat alterada d'una proteïna cinasa pot ser causa de malaltia, com per exemple de càncer, ja que regulen molts aspectes del control de creixement, moviment i mort de la cèl·lula. En el sistema nerviós, tal com en altres cèl·lules, les proteïnes cinases també regulen la diferenciació morfològica, la supervivència, la reparació i la plasticitat sinàptica (Fukunaga i Miyamoto, 1998; Sardari i cols., 2003).

La PKC es localitza en molts teixits i a la vegada, en molts tipus cel·lulars, com per exemple en les fibres musculars i les neurones motores (Mellor i Parker, 1998), en el múscul cardíac (Perrini i cols., 2004), en els vasos sanguinis, la epidermis (Ekström i cols., 1992), en la melsa i en els testicles (Hilgenberg i Miles, 1995; Nishizuka, 1995), entre d'altres.

Hi ha molta literatura que sustenta la regulació dels canals iònics dependents de lligand (Nelson i cols., 2003; Swope i cols., 1999) i l'alliberament del neurotransmissor (Nishizuka, 1992; Tanaka i Nishizuka, 1994; Byrne i Kandel, 1996) per la PKC. Ara bé, la funció d'aquesta en la desconexió axonal en el període de l'eliminació sinàptica, no ha estat massa estudiada. L'activitat sinàptica depèn de l'entrada de Ca^{2+} des del medi extern mitjançant els VDCCs (Katz i Miledi, 1970). La isoforma convencional de la PKC, que com ja s'ha dit és dependent de Ca^{2+} , contribueix a la modulació de l'alliberament del neurotransmissor. L'activació d'aquest enzim en neurones s'associa a la vegada, amb la modulació dels canals iònics, la desensibilització dels receptors, i l'increment de l'exocitosi (Tanaka i Nishizuka, 1994). Tots aquests processos estan implicats en la modulació de l'activitat i l'eficàcia en varietat de sinapsis. Tot i així, el lligam entre l'activitat de la PKC i l'alliberament de l'ACh no està del tot clar, el forbol èster (PMA) sembla tenir un efecte directe addicional en l'alliberament en la granota (Searl i Silinsky, 1998) i també en cultius de cèl·lules hipocampals (Waters i Smith, 2000). En quan a les dianes de la PKC relacionades amb la neurotransmissió, s'ha suggerit la implicació del VDCC tipus L en la granota (aquest canal és el funcional en els terminals nerviosos d'amfibis) (Arenson i Evans, 2001) i també en neurones hipocampals (en aquestes cèl·lules, el canal L no es troba implicat en l'alliberament) (Waters i Smith, 2000). No obstant, en ratolí s'ha descrit que el VDCC tipus L normalment no es troba implicat en l'alliberament (Urbano i cols., 2002). En estudis previs en el nostre laboratori s'ha descrit que la PKC es troba implicada en l'alliberament d'ACh en la NMJ del múscul LAL d'animals adults, i que és dependent del Ca^{2+} que entra pels VDCCs tipus P/Q durant l'activitat evocada, treballant prop del seu nivell màxim, a concentracions normals de Ca^{2+} extracel·lular (Santafé i cols., 2005).

2. ELIMINACIÓ SINÀPTICA

La formació dels contactes sinàptics, necessaris per a crear els circuits neuronals, són fonamentals per a la funció del sistema nerviós (Sanes i Lichtman, 1999). D'aquesta manera, conèixer els mecanismes cel·lulars i moleculars que sustenten la formació de sinapsis i la plasticitat sinàptica, pot ser de gran utilitat per a estudiar la seva possible modulació en situacions en les que es dona la pèrdua de sinapsis de manera patològica com les malalties neurològiques, per exemple la Malaltia d'Alzheimer (Coleman i cols., 2004; Nelson, 2005). Aquesta pèrdua sinàptica és un procés que també es dona en altres situacions com per exemple l'envelliment normal (Masliah i cols., 2006) i en l'eliminació sinàptica, pròpia del període de desenvolupament, i gràcies al qual es perden tot el seguit de contactes sinàptics de més que es creen, tant en el sistema nerviós central (SNC) com en el perifèric (SNP).

La superproducció de sinapsis i posterior eliminació constitueix una forma de plasticitat i adaptació sinàptiques, que es pot interpretar com un mecanisme eliminador de circuits i connexions inicials difoses i redundants. Per entendre aquest procés és necessari conèixer quines són les característiques dels axons que els permeten competir entre ells i quines són les interaccions que causen la pèrdua d'unes connexions i el manteniment d'unes altres.

2.1 Concepte de la poli-innervació en el neonat

En el SNP de vertebrats, tal i com ja s'avançava en el primer apartat, en el moment de néixer i durant el desenvolupament, les fibres musculars es troben innervades per més d'un axó (Redfern, 1970; Brown i cols., 1976; Ribchester i Barry, 1994). D'aquesta manera una mateixa cèl·lula muscular pot rebre diversos axons, i cadascun dels axons pot estar innervant milers de fibres musculars. A l'inici d'aquesta multi-innervació, tots els terminals nerviosos que han establert un contacte amb una mateixa cèl·lula muscular, tenen la mateixa força i eficàcia sinàptiques. A partir del dia

del naixement, i mitjançant un procés que és activitat dependent, com s'explicarà més endavant, la multi-innervació comença a decreixer fins a arribar a l'estat de mono-innervació, on les plaques motores es troben innervades per un únic axó (Benoit i Changeaux, 1975; O'Brien i cols., 1978). La mono-innervació és l'estat final en l'edat adulta (Redfern, 1970; Brown i cols., 1976; Jansen i Fladby, 1990). És important mencionar que el procés d'eliminació sinàptica no implica una reducció en el nombre total de neurones (Brown i cols., 1976; Balice-Gordon i Thompson, 1988), sinó un reajustament del número de cèl·lules musculars innervades per cada axó.

El perquè es creen més contactes sinàptics dels que són necessaris, encara no es coneix tot i que hi ha algunes possibles explicacions. Donat que no hi ha els gens suficients en un genoma per a especificar la qualitat i quantitat de connexions en cada circuit neuronal, la formació excessiva de connexions permet que els models de connectivitat s'adaptin eficaçment segons el seu ús (Wyatt i Balice-Gordon, 2003). Una segona possibilitat és que l'excés d'innervació assegura que cada fibra del múscul rebi innervació (Wyatt i Balice-Gordon, 2003).

Durant el procés d'eliminació axonal en la NMJ, sempre hi ha un moment en què coexisteixen dos axons en la mateixa placa motora, el que s'anomena sinapsi doble-innervada. Aquesta situació relativament simple, és un bon model per l'estudi experimental d'aquest procés. En aquestes sinapsis doble-innervades hi ha un terminal nerviós fort amb un contingut quàntic més alt que genera l'EPP gran (l-EPP de l'anglès *large-EPP*), i un terminal nerviós dèbil amb un contingut quàntic més baix (Colman i cols., 1997; Culican i cols., 1998), que genera l'EPP petit (s-EPP de l'anglès *small-EPP*). En les sinapsis dobles, s'ha observat que el contingut quàntic del l-EPP és igual al contingut quàntic de l'EPP de les sinapsis simples, suggerint que el l-EPP és l'axó que sobreviurà, establint-se a l'edat adulta. Així, l'axó que sobreviu es caracteritza per tenir un contingut quàntic més gran, mentre que els axons que seran eliminats estan associats a un menor contingut quàntic i la seva eficàcia anirà disminuint progressivament (Colman i cols., 1997; Santafé i cols., 2001).

2.2 El procés d'eliminació sinàptica

Tot i que l'eliminació sinàptica és un procés descrit des de fa temps, es coneix molt poc sobre el seu funcionament i sobre les múltiples molècules que hi intervenen. Aquestes poden ser des de proteïnes que es troben en la làmina basal com la s-laminina (Sanes i cols., 1990a, 1990b; Fitzsimonds i Poo, 1998; Patton i cols., 2001) fins a proteïnes pròpies del terminal nerviós o de la cèl·lula muscular sinàptica com el receptor PAR-1 activat per la trombina (Lanuza i cols., 2003) o factors alliberats pel component postsinàptic (McCann i cols., 2007). Tal i com descriuen Sanes i Lichtman en la revisió de l'any 1999, el procés d'eliminació sinàptica postnatal és gradual en dos aspectes. Primerament, l'eliminació sinàptica és temporalment progressiva dins d'un mateix múscul (Redfern, 1970). Després en una mateixa NMJ, la transició de la poli-innervació a mono-innervació té lloc també gradualment perquè els axons que innerven una placa motora comencen ocupant espais semblants, però aquells que es van eliminant van deixant lliure l'espai que ocupaven i l'axó que finalment consolida la seva sinapsi, ocupa la totalitat de l'àrea postsinàptica (Balice-Gordon i Lichtman, 1993; Colman i cols., 1997). Hi ha evidències que suggereixen que els terminals nerviosos presinàptics i les cèl·lules musculars postsinàptiques, es senyalitzen entre ells per establir una alineació sinàptica precisa (Sanes i Lichtman, 2001).

En la situació de la doble-innervació, que precedeix la innervació simple, els dos axons presenten la mateixa eficàcia sinàptica, i poc a poc un d'ells es torna més eficaç mentre que l'altre disminueix el seu contingut quàntic fins a que finalment, l'alliberament d'ACh ja no es dona. En aquest moment, creiem que els terminals nerviosos, durant unes hores, esdevenen silencis. Aquest terme, en el nostre laboratori, s'utilitza per designar aquells terminals nerviosos que ja no són funcionals tot i que el seu contacte amb el component postsinàptic es manté (Bishop i cols., 2004). En aquest curt període de temps en que són silencis, els terminals nerviosos presenten la capacitat de recobrar l'alliberament evocat, pel que la maquinària que sustenta l'alliberament, es pot tornar a activar.

2.2.1 El component presinàptic

Tal i com s'ha comentat més amunt, els diferents terminals nerviosos que es troben innervant la mateixa fibra muscular, comencen tenint la mateixa eficàcia sinàptica. Arriba un moment però, que la probabilitat d'alliberament d'ACh és diferent, augmentant la diferència en el contingut quàntic durant la competició (Kopp i cols., 2000). Aquest canvi presinàptic en la neurotransmissió pot estar precedint la retirada d'alguns axons, i són moltes les molècules que s'hi troben implicades. Algunes d'elles s'han estudiat en el nostre laboratori com la PKC, els VDCCs i els mAChRs. S'ha vist que aquestes molècules es relacionen amb l'alliberament de l'ACh, en els terminals que es troben en procés de competició axonal en el procés de l'eliminació sinàptica.

Els VDCCs es troben implicats en el procés de l'eliminació sinàptica. Els terminals fort i dèbil de la sinapsi doble-innervada presenten els canals N, L i P/Q, que s'encarreguen de controlar l'alliberació de l'ACh, tot i que hi participen de diferent manera (Santafé i cols., 2001). Ja s'ha dit anteriorment, que el bloqueig de cadascun dels tres canals P/Q, L i N provoca una potenciació de l's-EPP, mentre que inhibeix el l-EPP (Santafé i cols., 2001). Aquesta inhibició del l-EPP és molt semblant a la del terminal de la sinapsi mono-innervada (un 80% aproximadament), el que suggereix que el l-EPP pot ser el contacte sinàptic supervivent a l'eliminació sinàptica. A més a més de la modificació en la neurotransmissió dels terminals immadurs, també s'ha relacionat els VDCCs en el procés d'eliminació sinàptica, donat que el bloqueig dels canals L i el P/Q, permet el reclutament de terminals nerviosos silencis, incrementant així el PI un 37% aproximadament (Santafé i cols., 2002). En resum, els VDCCs tipus P/Q, N i L estan directament lligats a la neurotransmissió del terminal fort, garantint la màxima entrada de Ca^{2+} i assegurant-ne la seva supervivència. En canvi en el cas del terminal dèbil de la sinapsi doble, l'entrada de Ca^{2+} pels mateixos canals, activa un mecanisme repressiu de la neurotransmissió, que sembla que pot estar controlat per l'activitat de la PKC (Jia i cols., 1999; Lanuza i cols., 2001) o per proteases dependents de Ca^{2+} (Connold i cols., 1986; Van Essen i cols., 1990), provocant finalment la desconexió del terminal dèbil (Santafé i cols., 2001, 2002, 2007). A més a més el

bloqueig dels canals L i P/Q permet el reclutament axonal de terminals nerviosos silencis.

En estudis anteriors realitzats al nostre laboratori, s'ha vist que la PKC es troba implicada en el procés d'eliminació sinàptica, donat que el seu bloqueig amb calfosteina C (CaC) entre el quart i el vuitè dia de vida, provoca una aturada del procés de l'eliminació sinàptica, incrementant el número de fibres poli-innervades (Lanuza i cols., 2001). Concretament, aquest bloqueig de la PKC amb CaC (Santafé i cols., 2007) i la reducció de l'entrada de Ca^{2+} (Santafé i cols., 2002) prevenen la pèrdua dels terminals nerviosos inactius o silencis, reclutant-los i permetent que tornin a ser funcionals. Per altra banda, la seva activació directa amb PMA, provoca la pèrdua dels nAChRs i la consegüent reducció de l'eficàcia sinàptica (Lanuza i cols., 2000).

La PKC s'expressa i s'acobla de diferent manera en els terminals nerviosos dèbils i forts de la sinapsi doble-innervada. Ja s'ha dit anteriorment que la PKC depèn del Ca^{2+} intracel·lular, i de processos que redueixen l'entrada del ió, o el bloqueig directe de la PKC, sorprenentment incrementen un 60% aproximadament l'alliberament en el terminal dèbil. Pel que fa al terminal fort i al simple, la CaC no modifica la neurotransmissió, el que suggereix que en condicions de repòs, la PKC no es troba acoblada a la neurotransmissió (Santafé i cols., 2007), això també succeeix en l'edat adulta (Santafé i cols., 2006; veure Figura 2). Aquestes manipulacions del Ca^{2+} intracel·lular (per l'increment de Mg^{2+} en el medi) i de la PKC tenen el mateix efecte que el bloqueig dels VDCCs en el terminal nerviós dèbil. Per tant, un mecanisme presinàptic mediat pels VDCCs i la PKC i a més, dependent de Ca^{2+} , contribueix en la desconexió dels terminals nerviosos dèbils.

2.2.2 El component postsinàptic

En la NMJ i en d'altres sinapsis s'ha suggerit que en la competició axonal, les cèl·lules postsinàptiques discriminen entre l'activitat dels múltiples *inputs* i consoliden selectivament les zones més actives (Lichtman i Colman, 2000). Keller-Peck i

col·laboradors (2001), van demostrar que els diferents terminals nerviosos d'una motoneurona es troben en diferents estadis de l'eliminació sinàptica, evidenciant que en el control del procés, les cèl·lules musculars exerceixen efectes locals decisius. Això vol dir que no únicament el soma neuronal té un rol en la consolidació del terminal nerviós guanyador, sinó que la fibra muscular també hi juga un paper important. Amb el bloqueig de la producció dels potencials d'acció postsinàptics *in vivo* mitjançant la sobreexpressió de canals de potassi voltatge dependents (que contribueixen a la repolarització de la membrana en la última fase del potencial d'acció i en el manteniment del potencial de membrana (Nichols i Lopatin, 1997)), es va observar una inhibició de l'eliminació sinàptica (Favero i cols., 2009). Aquest estudi, suggereix que el múscul pot estar jugant un paper important en el procés d'eliminació sinàptica.

Així, tan important és conèixer les diferències entre els terminals axonals en competició, com les característiques estructurals i funcionals de les molècules postsinàptiques, per exemple els nAChRs, les proteïnes cinases i els factors alliberats per la cèl·lula muscular. S'ha descrit la presència de factors derivats de la cèl·lula postsinàptica, participant en el manteniment de la sinapsi adulta i també en la regulació de l'eliminació sinàptica (McCann i cols., 2007). Alguns d'aquests factors tròfics com el GDNF (de l'anglès, *glial cell line-derived neurotrophic factor*) juguen un paper en l'eliminació sinàptica causant un increment en el número d'axons motors que innerven les fibres musculars (Nguyen i cols., 1998), promovent la ramificació axonal i la formació de sinapsis en les unions neuromusculars (Keller-Peck i col., 2001). Treballs realitzats amb el BDNF (de l'anglès *brain-derived neurotrophic factor*), mostren com aquest pot incrementar el número de contactes sinàptics funcionals i no funcionals, retenint contactes sinàptics silents (Kwon i Gurney, 1996). Estudis recents del nostre laboratori relacionen la PKC i la PKA amb l'estabilitat dels nAChRs durant el desenvolupament (Lanuza i cols., 2000, 2002, 2006).

2.2.3 Paper de l'activitat sinàptica

L'activitat neuronal modula la connectivitat sinàptica en el sistema nerviós madur i immadur. Aquesta plasticitat inclou des dels canvis més lents donats en el desenvolupament fins als més ràpids en la funció i estructura sinàptiques que sustenten, per exemple, la formació de la memòria. Quan es redueix l'activitat nerviosa, per exemple, amb toxines com la tetrodotoxina que és blocadora dels canals de Na^+ axonals (Thompson i cols., 1979; Favero i cols., 2007), la toxina botulínica que impedeix que les vesícules sinàptiques es fusionin amb l'axolema (Brown i cols., 1982), l' α -bungarotoxina (α -BTX) que bloca els nAChRs (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. En canvi, si s'augmenta l'activitat neuromuscular mitjançant l'estimulació elèctrica del nervi motor o estimulants directament la fibra muscular s'accelera la pèrdua de contactes sinàptics (Thompson, 1983; Ridge i Betz, 1984). Així, l'activitat neuromuscular juga un paper important en el procés d'eliminació dels contactes nerviosos redundants, accelerant-lo o reduint-lo segons si s'augmenta l'activitat o pel contrari es bloqueja. Diferents paradigmes d'estimulació i bloqueig apunten a que els terminals nerviosos més actius presenten avantatges envers els menys actius en el manteniment de la innervació a les cèl·lules musculars (Thompson, 1983; Ribchester i Tact, 1983; Ridge i Betz, 1984). Altres estudis però, apunten que la situació inversa també és possible i terminals nerviosos inactius poden desplaçar-ne d'altres que es troben actius (Ribchester i Tact, 1983; Callaway i cols., 1987). Un treball realitzat en aquesta direcció, mostra com els terminals inactius poden passar per davant d'altres també inactius en el procés de reinnervació en l'edat adulta, el que suggereix que l'activitat podria ser un modulador més que un mediador de la competició (Costanzo i cols., 2000).

La modulació de la competició axonal per part de l'activitat sinàptica, sembla dependre en part, de l'habilitat de la cèl·lula muscular per detectar les diferències relatives entre els diferents patrons d'activitat dels axons que li fan contacte. Quan

tots ells són sincrònicament actius, la fibra muscular té dificultats per discriminar, provocant que tots ells es mantinguin (Busetto i cols., 2000; Buffelli i cols., 2002, 2003; Favero i cols., 2007). En canvi, quan els contactes sinàptics són asincrònicament actius, les fibres musculars discriminen entre ells i recompensen els més actius mentre castiguen els que ho són menys (Personius i Balice-Gordon, 2001; Personius i cols., 2007). Per tant, mentre l'activitat sincrònica perllonga el temps de la poli-innervació, l'activitat asincrònica sembla tenir un paper clau en l'eliminació sinàptica durant el desenvolupament i la reinnervació en l'edat adulta. Registres *in vivo* en animals neonats sustenten el rol de l'activitat sincrònica i asincrònica en la competició sinàptica (Buffelli i cols., 2002; Tresch i Kiehn, 2002).

3. LES NEUROTROFINES I ELS SEUS RECEPTORS

Els treballs revolucionaris de Santiago Ramón i Cajal sobre la “doctrina neuronal” i la llei de la polaritat funcional de la neurona, van donar pas a estudis sobre la interconnexió nerviosa, la individualitat neuronal i la seva capacitat per a la transmissió de l'impuls nerviós (Andres-Barquin, 2002). Experiments realitzats per Victor Hamburguer durant la dècada dels trenta, van possibilitar el començament de l'estudi molecular dels mecanismes que controlen el desenvolupament neuronal. En els seus treballs, demostrava la presència d'algun factor capaç de produir el creixement nerviós. Finalment, aquest factor va ser descobert per el grup de Levi-Montalcini l'any 1954, a partir d'una substància derivada d'un sarcoma de ratolí. El van anomenar factor de creixement nerviós (*Nerve growth factor*, NGF) (Cohen i cols., 1954), i es caracteritzava per produir hipertròfia cel·lular, acceleració de la diferenciació dels ganglis i una distribució atípica de les fibres nervioses en embrió de pollastre de 3 dies, una vegada se li havia implantat el tumor del qual provenia. Posteriorment, es va comprovar que les neurones dels ganglis perifèrics eren capaços de transportar de manera retrògrada el factor NGF a través dels axons (Thoenen i Stockel, 1975; Levi-Montalcini, 1987). També es va veure que no totes les neurones

responien a l'aplicació del NGF, pel que es va pensar en l'existència d'altres factors tròfics. Ara, es coneix que els factors tròfics són proteïnes endògenes que promouen la supervivència i la diferenciació de certes poblacions neuronals, regulen el procés de formació i establiment de les connexions sinàptiques i a més, regulen el procés de l'expressió gènica a través de la seva interacció amb certs receptors cel·lulars específics (Huang i Reichardt, 2001).

La teoria tròfica proposa que, durant el desenvolupament, les neurones han de competir per concentracions limitades de factors tròfics alliberats pel teixit diana (Purves i cols., 1988). Les neurones que aconseguixin captar les concentracions necessàries i hi responguin amb rapidesa, seran les que sobreviuran. Encara que els factors tròfics tenen un paper molt important durant el desenvolupament, se sap que també participen en l'etapa adulta en fenòmens com la regeneració, la neuroprotecció i la plasticitat en l'adult (Thoenen, 2000; Schinder i Poo, 2000). Per exemple, un estudi realitzat amb el factor tròfic ciliar (CNTF de l'anglès *ciliary neurotrophic factor*), mostra com el tractament *in vivo* amb aquest factor tròfic, en el glutis de ratolins durant 18 dies, provoca l'aparició d'*sprouts* nerviosos, entenen-los com el creixement dels terminals nerviosos (Tarabal i cols., 1996), i per tant una forma de plasticitat sinàptica.

S'ha descrit una gran varietat de famílies de factors tròfics: la més estudiada, és la família de les neurotrofines (NTs) de la qual es parlarà a continuació; una altra és la família de les citoquines hemopoètiques dins de la qual es troben el CNTF, el factor inhibidor dels leucòcits (LIF de l'anglès *leukemia-inhibitory factor*) o la interleuquina-6; la família del GDNF que l'inclou a ell mateix, a més de la neurturina (NTN de l'anglès *neurturin*) i la persefina (PSP de l'anglès *persephin*); la família dels factors de creixement insulínic (IGF de l'anglès *insulin-like growth factor*) que compren l'IGF-1 i l'IGF-2; la família dels factors de creixement del fibroblast (FGF de l'anglès *fibroblast growth factor*) i per últim el factor de creixement de l'hepatòcit, que és la neuregulina (NRG).

L'any 1982, a partir d'extractes de cervell de porc es va purificar una proteïna capaç de promoure la supervivència de neurones dels ganglis de l'arrel dorsal de la medulla espinal. També era capaç d'evitar la mort neuronal natural, que es dona en el desenvolupament en embrions de pollastre (Barde i cols., 1982). Aquesta nova molècula es va anomenar BDNF. La purificació d'aquesta proteïna i la seva caracterització van revelar una gran homologia amb el NGF (Leibrock i cols., 1989), el que indicava que els dos provenien d'un mateix grup de factors de creixement, que va acabar per anomenar-se família de les NTs. A partir d'aquí es van començar a descriure la resta de les NTs, que s'expliquen amb més detall a continuació.

Els efectes de les NTs estan mediatos per la interacció i activació de receptors específics de la família Trk (de l'anglès *tropomyosin-receptor-kinase*), que pertanyen a la superfamília de receptors amb activitat tirosina cinasa i que són d'alta afinitat per les NTs. També es coneix l'existència del receptor $p75^{NTR}$, que és el receptor de baixa afinitat, al qual s'hi uneixen totes les NTs.

L'any 1989, es va caracteritzar el receptor cinasa relacionat amb la tropomiosina A (TrkA) a partir d'un carcinoma de colon humà (Martín-Zanca i cols., 1989). El mateix any, es va publicar l'existència d'un receptor expressat al SNC i SNP, membre de la mateixa família que el TrkA: el TrkB (Klein i cols., 1989; Kaplan i cols., 1991; Klein i cols., 1991; Klein i cols., 1992). Gairebé al mateix temps, es va definir el receptor TrkC (Lamballe i cols., 1991). A part dels receptors Trk d'alta afinitat, es va identificar l'any 1986 un receptor de baixa afinitat per al NGF que es va denominar $p75^{LNGFR}$ (receptor del NGF de baixa afinitat i de 75 kDa), d'aquí en endavant $p75^{NTR}$ (de l'anglès *p75 neurotrophin receptor*, Johnson i cols., 1986). Més tard, aquest receptor es va descriure de baixa afinitat per la resta de NTs existents (Rodríguez-Tébar i cols., 1990; Hallböök i cols., 1991; Hempstead i cols., 1991).

En quant a les unions de les NTs als seus receptors amb alta afinitat, el NGF s'uneix al TrkA, el BDNF i l'NT-4 al TrkB i l'NT-3 al TrkC. No obstant, existeixen algunes interaccions creuades en certes situacions, com per exemple que l'NT-3 té capacitat d'interaccionar també amb el TrkB (Glass i cols., 1991; Klein i cols., 1991; Squinto i

cols., 1991; Soppet i cols., 1991), o el BDNF amb el TrkC (Pitts i cols., 2006). En quant a les unions amb baixa afinitat, al $p75^{NTR}$ s'hi uneixen totes les NTs (Figura 3).

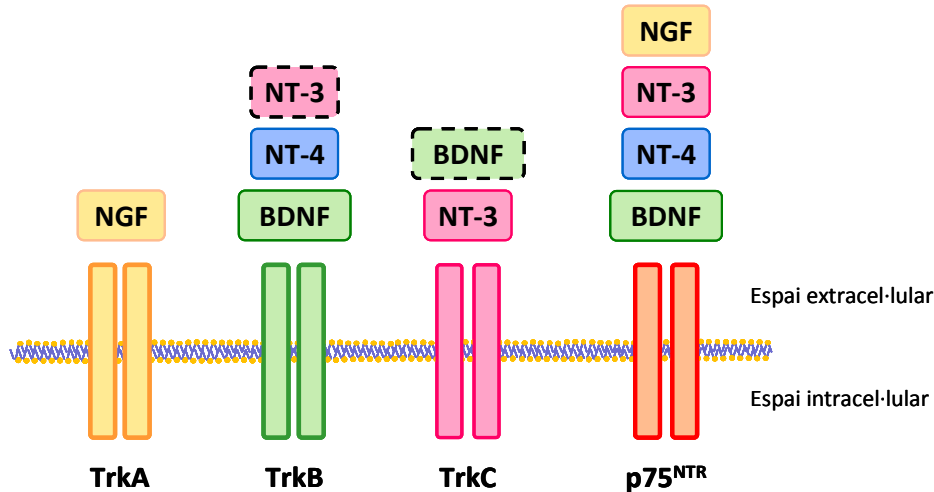


Figura 3. Les neurotrofines i els seus receptors. En aquest esquema es mostren les diferents NTs presents en els vertebrats, i l'afinitat envers els seus receptors. Pel que fa a les unions amb alta afinitat, el NGF s'uneix al TrkA, el BDNF i l'NT-4 s'uneixen al TrkB i l'NT-3 al TrkC. A més a més, totes elles s'uneixen amb baixa afinitat al receptor $p75^{NTR}$. També es mostren les possibles unions del BDNF i l'NT-3 als altres receptor Trk en certes situacions, i es diferencien de la resta d'unions per la línia discontinua que les envolta.

3.1 Les neurotrofines

3.1.1 Tipus de neurotrofines

En l'actualitat, la família de les NTs es troba composta per sis membres, tal com s'ha comentat en l'apartat anterior: el NGF, el BDNF, l'NT-3 (Ernfors i cols., 1990; Hohn i cols., 1990), l'NT-4 (Berkeimeier i cols., 1991; Hallböök i cols., 1991; Ip i cols., 1992), l'NT-6 (Götz i cols., 1994), i l'NT-7 (Nilsson i cols., 1998). Totes elles, amb l'excepció de l'NT-6 i l'NT-7 (motiu pel qual no s'han inclòs en l'esquema de la Figura 3) han estat caracteritzades en una àmplia varietat de vertebrats i presenten un alt grau

d'homologia, suggerint la seva importància en el manteniment del sistema nerviós en vertebrats (Hallböök i cols., 1991). L'NT-6 i l'NT-7 s'han descrit en amfibis i peixos (Li i cols., 1997; Nilsson i cols., 1998).

Inicialment, les NTs són sintetitzades com a precursors immadurs o pro-neurotrofines de 30-34 kDa, les quals mitjançant el trencament per proteases (com les furines i les pro-convertases) es converteixen en proteïnes madures d'uns 14 kDa que ja són actives (Chao, 2003). Les NTs madures presenten regions variables i invariables que defineixen les seves propietats individuals. Són les regions variables les que defineixen les relacions específiques receptor-NT, mentre que les invariables juguen un rol més estructural en el seu disseny tridimensional. Les NTs madures es sintetitzen com a monòmers que poden formar dímers actius gràcies a les cisteïnes que tenen en la seva seqüència (Chao i Hempstead, 1995). Una vegada dimeritzades i actives, s'uneixen als seus receptors també dimeritzats per a iniciar la senyalització (Grob i cols., 1985; Jing i cols., 1992).

Tot i que els rols fisiològics d'aquestes formes no madures no són clars (Jansen i cols., 2007), si que es coneix que el pro-NGF i el pro-BDNF poden activar la mort neuronal per apoptosi, representant un rol oposat al que tenen en la seva forma madura (Kolbeck i cols., 1994; Nykjaer i cols., 2004; Teng i cols., 2005; Hempstead, 2006).

3.1.2 Expressió i localització de les neurotrofines

L'expressió i localització de les NTs ha estat estudiada tant en teixits neuronals del SNC com del SNP. Donat que un dels objectius d'aquesta tesis, és localitzar les NTs i els seus receptors en les cèl·lules que conformen la NMJ, es parlarà únicament de treballs realitzats en teixits neuronals, principalment el sistema neuromuscular. Molts dels treballs realitzats, s'han basat en l'estudi de l'expressió de l'RNA missatger en diferents teixits, pel que hi ha molt pocs treballs que es centrin en la localització de les

pròpies NTs amb resolució cel·lular. Sent pocs els estudis que localitzen les NTs en el sistema neuromuscular, en són menys els que les situen de forma precisa en les diferents cèl·lules que conformen la NMJ. És per això que un dels primers objectius marcats en aquesta tesi, és la localització fina i precisa d'aquestes proteïnes en la NMJ mitjançant immunohistoquímica convencional i per seccions semifines, una tècnica d'alta resolució que permet una localització molt més precisa (per més informació veure apartat de Material i mètodes).

A nivell del SNC, les NTs són presents en diferents regions, per exemple el BDNF s'ha trobat en l'hipocamp i cerebel, l'NT-4 s'ha vist que s'expressa en les neurones i glia cortical del cervell (Riley i cols., 2004). L'NT-4 s'han localitzat també en altres òrgans com la prostata, el timus i la placenta (Hofer i cols., 1990).

A nivell del SNP, s'ha estudiat l'expressió de les NTs en el desenvolupament i en l'edat adulta (Funakoshi i cols., 1993; Timmusk i cols., 1993; Ip i cols., 2001). En quan a l'expressió del BDNF s'ha demostrat en els cossos cel·lulars de les neurones motores i axons del nervi ciàtic (Gómez-Pinilla i cols., 2001; Pitts i cols., 2006), en múscul esquelètic de rata adulta i postnatal (Liem i cols., 2001, Griesbeck i cols., 1995; Koliatsos i cols., 1993) i en les cèl·lules de Schwann de l'arrel dorsal (Acheson i cols., 1991).

En quan a l'expressió de l'NT-4, s'ha observat en múscul de rata adulta i neonata (Funakoshi i cols., 1993, 1995; Koliatsos i cols., 1993; Ip i cols., 2001), en nervi ciàtic i medul·la espinal (Pitts i cols., 2006). Mitjançant IHQ s'ha localitzat en el citosol de fibres musculars de ratolí (Sakuma i cols., 2002).

Pel que fa a l'NT-3, s'ha detectat expressió en múscul de rata adulta (Griesbeck i cols., 1995; Koliatsos i cols., 1993), en nervi ciàtic (Funakoshi i cols., 1993; Griesbeck i cols., 1995; Omura i cols., 2005) i en la medul·la espinal (Ernfors i cols., 1989). L'anàlisi de ratolins transgènics NT-3^{lacZ}, als que s'ha canviat la seqüència que codifica l'NT-3 per una altra seqüència que codifica la β -galactosidasa, per tal de poder investigar l'expressió de l'NT-3 (Fariñas i cols., 2001), mostra com l'NT-3 s'expressa en neurones motores i en la CS durant el desenvolupament, però no en ratolins adults. També

s'expressa en el múscul en desenvolupament però no en l'adult (Hess i cols., 2007). Mitjançant IHQ convencional s'ha localitzat l'NT-3 en les fibres musculars de diafragma de rata (Kato-Semba i cols., 1996).

3.1.3 Funcions de les neurotrofines

Hi ha treballs amb ratolins modificats genèticament, per estudiar les funcions de les NTs. Com que els ratolins homozigots moren durant les primeres setmanes postnals com a conseqüència de les greus alteracions que pateixen a nivell del SNC i del SNP, Chao i els seus col·laboradors (2003), han treballat amb ratolins heterozigots. A més d'afectacions i complicacions a altres nivells, s'ha vist que els ratolins NGF^{+/-}, BDNF^{+/-}, NT3^{+/-} presenten pèrdua de neurones en el SNP (Crowley i cols., 1994; Ernfors i cols., 1994a, 1994b; Dluzen i cols., 2001).

En l'actualitat, se sap que les NTs tenen funcions diferents tot i la seva homologia. Aquestes poden exercir efectes a dos nivells, per un costat una acció a llarg termini que inclou la supervivència i bon funcionament de les cèl·lules pre- i postsinàptiques, afectant de forma indirecta l'estabilització i manteniment de les connexions. Per l'altre, poden tenir una acció local, modulant l'eficàcia sinàptica, l'arborització terminal i la integritat estructural de les connexions sinàptiques, sense repercutir en la supervivència neuronal (Fitzsimonds i Poo, 1998).

La seva participació en processos de desenvolupament i manteniment del sistema nerviós, ha estat àmpliament documentada en models *in vitro* e *in vivo* (Barde, 1989; Thoenen, 1991; Poo, 2001). A més de promoure la supervivència de diferents poblacions neuronals, modulen el creixement i ramificació axonal i dendrítica, la funció sinàptica i la proliferació i diferenciació gials (Lewin i Barde, 1996). Diferents estudis mostren que les NTs promouen la supervivència de motoneurons d'embrions tant en cultiu com *in vivo* després de la secció del nervi ciàtic (Oppenheim i cols., 1992; Henderson i cols., 1993; Koliastos i cols., 1993). A més a més, l'activitat elèctrica pot

regular la síntesis (Gall i Isackson, 1989; Funakoshi i cols., 1995; Xie i cols., 1997) i la secreció (Blöchl i Thoenen, 1995; Wang i Poo, 1997) de les NTs i l'expressió dels seus receptors durant el desenvolupament.

En la formació de les sinapsis i posterior eliminació dels terminals nerviosos redundants, es requereix de la comunicació entre el component pre- i postsinàptic (Fox i cols., 2008). Són molts els treballs que han descrit un rol de les NTs en la plasticitat sinàptica, modulant l'estructura i la funció sinàptica a nivell del SNC i del SNP. Un treball de McAllister i col·laboradors de l'any 1999, mostra com les NTs unides als receptors TrkB i TrkC tenen efectes antagonistes en la modulació del creixement dendrític i la remodelació cortical en rodanxes *in vitro* (McAllister i cols., 1999). El rol del BDNF en la potenciació a llarg termini (LTP de l'anglès *long-term potentiation*) ha estat molt documentada en l'hipocamp i en el neocortex (Figurov i cols., 1996; Lu i Figurov, 1997; Lessmann, 1998; Schuman, 1999; Schinder i Poo, 2000; Poo, 2001). La hipòtesi de que els axons durant el desenvolupament, competeixen per l'alliberament limitat de factors tròfics per part de les cèl·lules diana, ha estat documentada en estudis de supervivència neuronal. La coordinació entre l'activitat pre- i postsinàptica resultaria de la producció local d'un factor, accessible únicament per als terminals nerviosos actius (Personius i Balice-Gordon, 2000). En la NMJ *in vivo*, l'aplicació exògena de neurotrofines i citoquines (English i Schwartz, 1995; Kwon i cols., 1995; Kwon i Gurney, 1996) o la seva sobreexpressió per transgènesi (Nguyen i cols., 1998), comporta un retràs en el transcurs temporal en el que s'assoleix la mono-innervació. També s'ha vist que les NTs poden modular l'activitat sinàptica tant a nivell del SNC (Kang i Schuman, 1995) com a les NMJs (Wang i Poo, 1997; Wang i cols., 1998; Lu i Je, 2003). Concretament, el BDNF i l'NT-3, potencien la transmissió sinàptica en la NMJ en desenvolupament, en cultius de *Xenopus laevis* (Lohof i cols., 1993; Kleiman i cols., 2000; Poo, 2001).

S'ha observat també en diversos estudis, que durant el procés de regeneració que té lloc després de la lesió, hi ha un increment en l'expressió de les NTs (Funakoshi i cols., 1993; Ramer i cols., 2001), com per exemple en la medul·la espinal, on després de la secció del nervi ciàtic, es veuen incrementats els nivells d'mRNA dels receptors de

les NTs (Hammarberg i cols., 2000), o també en lesions del nervi perifèric on incrementa l'expressió del BDNF (Gordon T, 2009, 2010).

Les NTs també han estat estudiades en malalties neuromusculars. Com mostra l'estudi de Sobue i col·laboradors (1998), s'han trobat algunes diferències en l'expressió de l'RNA missatger vers els controls com per exemple, un increment en l'expressió del receptor $p75^{\text{NTR}}$ en nervis amb patologies axonals, i una disminució en la dels receptors TrkB i TrkC, sent el TrkA absent. També s'ha vist que els nivells de BDNF i NT-3 es troben incrementats en nervis malalts, de manera proporcional a la invasió de les cèl·lules T i els macròfags en el nervi. En l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), l'mRNA del receptor $p75^{\text{NTR}}$ i del TrkB també es troben incrementats en la medulla espinal (Sobue i cols., 1998).

3.2 Els receptors de les neurotrofines

3.2.1 Tipus de receptors

En general, els gens Trk codifiquen proteïnes d'uns 800 aminoàcids, amb un domini transmembrana únic i una elevada homologia tant a nivell extracel·lular com en el domini catalític intracel·lular (Figura 4). El producte principal que esdevé de la transducció del gen Trk, és una proteïna de 80 kDa. Aquesta proteïna pateix varies glicosilacions originant formes de 110 kDa i 140 kDa (TrkA) (Martin-Zanca i cols., 1989) o de 145 kDa (TrkB i TrkC) (Klein i cols., 1989; Klein i cols., 1990; Lamballe i cols., 1991). Totes dues formes presenten activitat tirosina cinasa, però únicament les formes de 140 i 145 kDa estan presents a la superfície cel·lular (Martin-Zanca i cols., 1989; Klein i cols., 1989; Klein i cols., 1990; Lamballe i cols., 1991).

La transcripció dels gens Trk també dona lloc a receptors incomplets o segmentats. D'aquesta manera, el TrkA presenta dues isoformes, una d'expressió neuronal (Fl-2) i una altra no neuronal (Fl-1). En el cas del TrkB, s'ha descrit l'expressió

de la forma completa de 145 kDa (*TrkB-full-length*, TrkB-FI), i una altra incompleta de 95 kDa (*TrkB-truncated-length*, TrkB-TI). En quan al gen del TrkC, genera dues formes catalíticament actives que s'expressen tant a teixits neuronals com no neuronals (Lamballe i cols.,1993) i una altra incompleta (Barbacid, 1994).

Pel que fa al receptor $p75^{NTR}$, cal dir que pertany a la família dels receptors de necrosi tumoral, i com ja s'ha dit abans, és capaç d'unir totes les NTs amb afinitat similar. Aquest receptor presenta una regió extracel·lular composta per quatre dominis rics en cisteïnes, un únic domini transmembrana amb estructura helicoïdal i un domini citoplasmàtic d'unió a les diferents proteïnes implicades amb la mort neuronal.

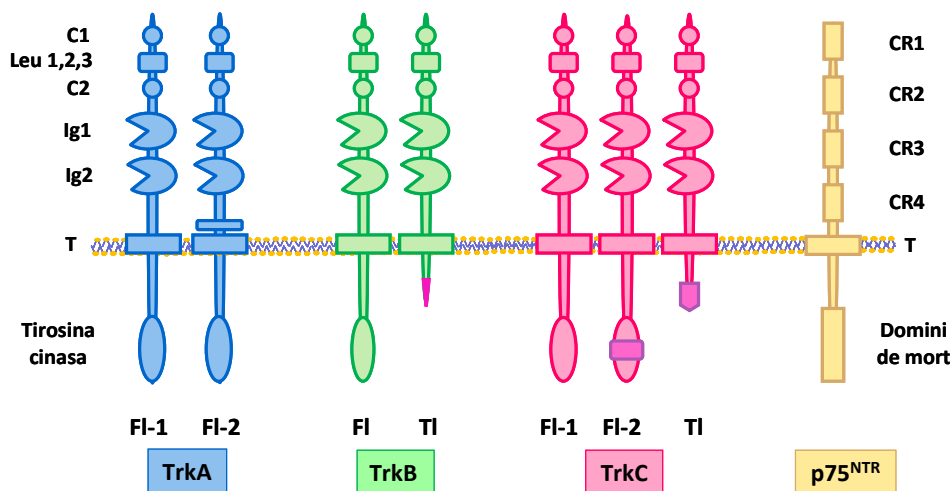


Figura 4. Estructura dels receptors Trk i $p75^{NTR}$. Adaptada de Stoilov i cols., 2002. Esquema on es mostren les diferents isoformes dels receptors d'alta afinitat Trk i el de baixa afinitat $p75^{NTR}$. Els receptors Trk presenten una regió extracel·lular constituïda per dues regions riques en cisteïnes (C1, C2), també un tàndem de tres elements rics en leucines (Leu 1,2,3) i dos dominis globulars similars als de les immunoglobulines (Ig1, Ig2). El domini transmembrana (T) connecta la regió extracel·lular amb la citoplasmàtica, on es troba el domini tirosina cinasa present ens les isoformes completes del Trk (FI-1 d'expressió no neuronal i FI-2 d'expressió neuronal). El $p75^{NTR}$ presenta un domini citoplasmàtic implicat amb la mort cel·lular, un domini transmembrana (T) i una regió extracel·lular amb quatre repeticions riques en cisteïnes (CR).

3.2.2 Expressió i localització dels receptors

Amb la localització dels receptors, succeeix exactament el mateix que amb les NTs, és a dir, els estudis es basen en l'expressió en els diferents teixits, més que amb la localització precisa dels propis receptors. La seva expressió ha estat estudiada tant en teixits neuronals com en teixits no neuronals. En aquest apartat també ens centrarem en els treballs realitzats en teixits neuronals, i altre cop donant més importància al sistema neuromuscular.

S'ha descrit l'expressió del receptor TrkB en la cèl·lula muscular de rata neonata i adulta i medul·la espinal (Gonzalez i cols., 1999; Sakuma i cols., 2001), en el nervi ciàtic (Funakoshi i cols., 1993), en la medul·la espinal ventral (Escandón i cols., 1994) i en la cèl·lula de Schwann mielinogènica del nervi ciàtic de rata (Acheson i cols., 1991; Frisé i cols., 1993). En quan a la localització subcel·lular del TrkB, mitjançant immunohistoquímica s'ha localitzat en la cèl·lula muscular al voltant dels nAChRs de rata neonata i adulta i també en els axons preterminals (Gonzalez i cols., 1999).

Pel que fa a l'expressió del TrkC, s'ha observat a les fibres musculars neonatals i adultes (Funakoshi i cols., 1993; Offenhäuser i cols., 1995; Ip i cols., 2001), en el nervi ciàtic i a la medul·la espinal (Offenhäuser i cols., 1995; Yamamoto i cols., 1996, el segon en teixit humà). Pel que fa a la seva localització, mitjançant IHQ s'ha vist en la cèl·lula de Schwann meilinogènica i teloglial en l'edat adulta i neonatal, i en el terminal i preterminal nerviosos (Hess i cols., 2007).

En quant a l'expressió del receptor $p75^{\text{NTR}}$, s'ha descrit en múscul adult humà (Yamamoto i cols., 1996), de rata adulta (Lomen-Hoerth i Shooter, 1995) i de pollastre en desenvolupament (Ernfors i cols., 1988). També s'ha descrit l'expressió del $p75^{\text{NTR}}$, en medul·la espinal i nervi ciàtic (Lomen-Hoerth i Shooter., 1995), en motoneurons adultes (Ernfors i cols., 1989) i a la cèl·lula de Schwann de rates neonates (Bandtlow i cols., 1987).

3.2.3 Vies de senyalització

Les funcions dels diferents receptors venen determinades per quina de les isoformes està present, per la unió als seus lligands i per la seva distribució en els diferents teixits i cèl·lules. La unió de la NT al receptor Trk, resulta en la seva dimerització, fosforil·lació i transactivació a la superfície cel·lular amb la posterior internalització (Obermeier i cols., 1993; Stephens i cols., 1994; Reichardt, 2006). Una vegada activats, desencadenen la fosforilació de tirosines de les proteïnes cel·lulars, que propaguen els efectes a la cèl·lula per mitjà de les vies de senyalització, permetent canvis en l'expressió de determinats gens entre d'altres.

El lloc on es produeix la unió lligand-receptor també és important, ja que determina les rutes de senyalització que s'activaran. Per exemple, l'estimulació axonal produeix l'activació de la ruta desencadenada per Ras, el que provoca l'elongació dels axons (Mason, 2000). Pel contrari, la fosforilació dels receptors Trk localitzats al cos cel·lular promou l'activació de les cascades que promouen la supervivència neuronal (Bhattacharyya i cols., 1997; Riccio i cols., 1997; Tsui-Pierchala i Ginty, 1999; Nonomura i cols., 1996).

De manera general per als receptors Trk, són tres les rutes de senyalització que es poden desencadenar una vegada s'ha activat el receptor. La primera d'elles és la via desencadenada per Ras, promotora de la supervivència, diferenciació i creixement cel·lulars. La segona via és la dependent de les proteïnes adaptadores Gab-1 (*Grb-associated binder-1*) que medien l'associació i activació de la proteïna fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K de l'anglès *phosphatidylinositol 3 kinase*) (Holgado-Madruga i cols., 1997; Yamada i cols., 1997), especialment relacionada amb la supervivència neuronal. La tercera ruta de senyalització és la dependent de la PLC γ (fosfolipasa C gamma), que regula els nivells intracel·lulars de Ca²⁺ així com l'activitat de la proteïna cinasa C (PKC). Aquesta ruta sembla tenir un paper molt important en l'alliberació de les NTs i la

plasticitat sinàptica, per exemple en neurones hipocampals o cultius de cèl·lules PC12 (Canossa i cols., 1997).

En quan al receptor $p75^{\text{NTR}}$, la seva funcionalitat depèn del context cel·lular en el qual s'expressi. Presenta doble rol, per un costat pot promoure per si sol, o unit al seu lligand, l'activació de les cascades de mort per apoptosi (Lee i cols., 2001; Roux i Barker, 2002) mitjançant l'activació de caspases i de la proteïna proapoptòtica JUN cinasa (JNK) entre d'altres. Per l'altre costat, és capaç d'associar-se a receptors Trk quan els dos receptors es troben en la mateixa cèl·lula. Tan els dominis citoplasmàtic com extracel·lular participen en aquesta interacció, que depèn a la vegada de l'estat de fosforilació del receptor Trk (Bibel i cols., 1999). Aquest fenomen és important ja que possibilita la unió d'alta afinitat de les neurotrofines, incrementant la discriminació dels lligands pels receptors Trk. Aquesta funció és especialment important en el cas del TrkA i TrkB donada la seva possible unió a més d'una NT. Per exemple, en presència del receptor TrkB i $p75^{\text{NTR}}$, únicament el BDNF és capaç d'induir l'activació del TrkB (Bibel i cols., 1999). La proximitat del $p75^{\text{NTR}}$ i el receptor Trk en la membrana cel·lular permet que les seves cascades de senyalització puguin interactuar (Wehrman i cols., 2007) provocant per exemple, que el $p75^{\text{NTR}}$ no desencadeni la mort neuronal (Nykjaer i cols., 2005).

Per tant, com s'ha vist en la introducció de les NTs, aquestes s'expressen i es localitzen en el sistema neuromuscular a diferents nivells i edats. Els treballs publicats fins ara però, no permeten dibuixar un patró de localització en els tres elements cel·lulars de la NMJ. També s'ha vist que les NTs es troben implicades en diverses funcions entre elles el control de la neurotransmissió. Per tant, i com es mostra a continuació, l'objectiu general d'aquesta tesi és l'estudi de les NTs en la NMJ, més específicament, conèixer la localització precisa de les NTs i receptors a nivell sinàptic i quina implicació tenen en el control de la neurotransmissió i procés d'eliminació sinàptics.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

II- HIPÒTESI I OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

1. HIPÒTESI

1.1. Hipòtesi general

Les neurotrofines i els seus receptors s'expressen en el teixit neuromuscular i es localitzen a la unió neuromuscular modulant la neurotransmissió colinèrgica dels terminals en desenvolupament, dels terminals madurs i controlant el procés d'eliminació sinàptica.

1.2 Hipòtesi específica

Les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i els seus receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} presenten un patró de localització complex en els tres elements cel·lulars de la NMJ. Aquestes neurotrofines exerceixen efectes en l'alliberament de l'ACh, controlant l'eficàcia sinàptica dels terminals nerviosos neonatals i adults. Per altra banda, aquestes neurotrofines poden contribuir a regular el procés d'eliminació sinàptica una vegada establerta la competició axonal durant el període de poli-innervació neuronal transitòria, provocant canvis en els terminals nerviosos silencis en vies de retracció. Aquest control en l'alliberament i en el procés de l'eliminació sinàptica, actua modulant la via de senyalització mediada per la proteïna cinasa C i els canals de calci voltatge dependents.

2. OBJECTIUS

2.1 Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi és conèixer l'expressió i la localització de les neurotrofines BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 i els seus receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} a la unió neuromuscular del múscul *Levator Auris Longus* d'animals neonats i adults i valorar les seves possibles implicacions en la modulació de la neurotransmissió neonatal i adulta, i en el procés d'eliminació sinàptica durant el període de desenvolupament.

2.2 Objectius específics

I. Conèixer l'expressió de les diferents neurotrofines (BDNF, NT-3 i NT-4) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) al múscul esquelètic d'animals neonats i adults.

II. Conèixer la localització de les diferents neurotrofines (BDNF, NT-3 i NT-4) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) en els tres components cel·lulars que conformen la sinapsi neuromuscular.

III. Estudiar l'efecte del BDNF, NT-4 i NT-3 aplicats exògenament, en la modulació de l'alliberament d'ACh en els diferents terminals de les sinapsis immadures i en l'adult.

IV. Estudiar l'efecte del BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 en el procés de competició axonal en el transcurs de l'eliminació sinàptica, que té lloc durant el desenvolupament.

V. Identificar la possible relació entre el mecanisme d'acció de les neurotrofines i el mecanisme inhibidor calci dependent descrit prèviament al nostre laboratori.

VI. Estudiar la implicació del BDNF endogen en l'alliberament de l'ACh en els terminals immadurs de la sinapsi neuromuscular.

III- MATERIAL I MÈTODES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.

Per a la realització dels experiments amb animals, s'ha disposat de l'autorització del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili de Reus. La cura i manipulació dels animals s'ha realitzat contemplant les directrius establertes per la llei 5/1995, de 21 de juny, de protecció dels animals utilitzats per a l'experimentació i per altres finalitats científiques, aprovada l'any 1995 pel Parlament de Catalunya.

Els animals d'experimentació utilitzats en aquest treball han estat rosegadors de dues espècies diferents, per un costat rates *Sprague-Dawley* i per l'altre ratolins *Swiss Blanc*. En estudis previs en el laboratori, s'han examinat les possibles diferències en la neurotransmissió col·linèrgica entre les dues espècies treballades, sense veure diferències en cap dels paràmetres estudiats. En el període postnatal, al que nosaltres anomenem neonatal, s'han utilitzat dos edats diferents, animals postnatsals de 2-3 dies i de 6-7 dies, obtinguts a partir de creuaments controlats a l'estabulari de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili. Pel que fa a l'edat adulta, s'han fet servir animals de 30-45 dies postnatsals.

Els animals progenitors que s'han utilitzat, han estat subministrats per la casa comercial Charles River (Criffa, Barcelona), i per evitar-ne la consanguinitat, no s'han fet creuaments entre animals de la mateixa família. Per tal d'assegurar la concepció de la femella, s'han fet frotis vaginals 24 hores després del creuament. Les possibles femelles positives, que per tant han mostrat espermatozoides en el frotis, s'han aïllat en gàbies individuals durant tot el període de gestació i posterior al part. Amb la finalitat d'homogeneïtzar tot el possible les característiques dels nadons utilitzats, s'han deixat créixer un màxim de vuit cries per ventrada.

Els animals s'han mantingut a l'estabulari en gàbies estàndard de Makrolon^R (23x46x14 cm³). La temperatura ambiental s'ha mantingut constant a 20-22°C amb un termòstat electrònic, i una humitat relativa del 60-70 %. Els cicles de llum artificial han estat de 12 hores amb neó de llum blanca i 12 hores de foscor. L'alimentació i hidratació dels animals adults ha estat *ad libitum*, a base de pinso de manteniment per

rata i ratolí del tipus VRF-1 subministrat per la firma comercial Charles River i aigua clorada.

S'han anestesiats els animals amb l'administració intraperitoneal de tribromoetanol al 2% (TBE, 0.15 ml per cada 10 g de pes de l'animal). Una vegada anestesiats s'han dessagnat per a procedir a l'extracció del múscul com es detalla en l'explicació del model muscular.

2. EL MODEL MUSCULAR

El model neuromuscular, ha estat utilitzat durant molts anys per a l'estudi de la neurotransmissió, plasticitat i competitivitat sinàptiques entre d'altres aspectes. Es tracta d'un bon model per diversos motius, té una mida relativament gran que permet observar els diferents components per separat i estudiar-los en conjunt; és de fàcil accés per la seva localització en molts casos a la perifèria (com és el cas del model utilitzat en aquesta tesi) i l'estructura de la sinapsi neuromuscular (NMJ) és simple respecte altres models, ja que consta únicament de tres components (la neurona motora presinàptica, la cèl·lula muscular postsinàptica i la cèl·lula de Schwann). Aquests components es poden visualitzar amb diferents marcadors de proteïnes específiques per a cadascun d'ells. Una altra característica que el fa un bon model és que a diferència del SNC conté un únic sistema de neurotransmissió que és el col·linèrgic. Aquestes facilitats l'han convertit, en les últimes dècades, en un prototip molt utilitzat en estudis electrofisiològics i neurobiològics per a entendre els mecanismes implicats en la transmissió sinàptica (Salpeter, 1987).

En aquest estudi, s'ha treballat amb el múscul elevador de les orelles o *Levator auris longus* (LAL), que permet als animals moure les orelles (Figura 5a). Aquest múscul va ser descrit per primer cop per Denis Angaut-Petit i col·laboradors al 1987. Per les seves característiques, és ideal per a realitzar estudis de localització com també experiments electrofisiològics *in toto*, ja que és de fàcil manipulació. Es tracta d'un

múscul molt pla (Figura 5b) situat immediatament per sota de la pell a l'àrea dorsal del cap i el coll, que presenta una part cranial i una altra caudal (Figura 5a). Al tractar-se d'un múscul subcutani, les drogues que s'injecten subcutàniament *in vivo*, a la zona del LAL, accedeixen directament a la superfície muscular i, per tant, també a les terminacions nervioses, així el seu efecte sobre les sinapsis neuromusculars és per contacte directe. Les fibres de la regió cranial s'originen a les espines de la quarta vèrtebra cervical i es dirigeixen cap a la part anterior de la base del pavelló auricular, on s'hi insereixen. Les fibres de la regió caudal s'estenen des de la quarta i cinquena vèrtebra cervical cap a la part posterior de la base del pavelló auricular. Està format per fibres musculars de contracció ràpida (Erzen i cols., 2000) que es disposen en unes 5 o 6 capes de cèl·lules a la porció cranial (5.25 ± 0.78 , Lanuza i cols., 2001) mentre que a la part caudal n'hi pot haver algunes més (Angaut-Petit i cols., 1987; Erzen i cols., 2000). Gràcies a la seva morfologia plana i fina, les terminacions nervioses de la branca auricular posterior del nervi facial, que és el que l'innerva, queden al descobert, podent-ne intuir la localització de les plaques motores (Tomàs i cols., 2000). En la Figura 5c i 5d) es mostren imatges laterals d'un tall semifí d'un LAL tenyit amb blau de metilè, on s'aprecien les poques capes de miòcits i inclús una branca nerviosa intramuscular.

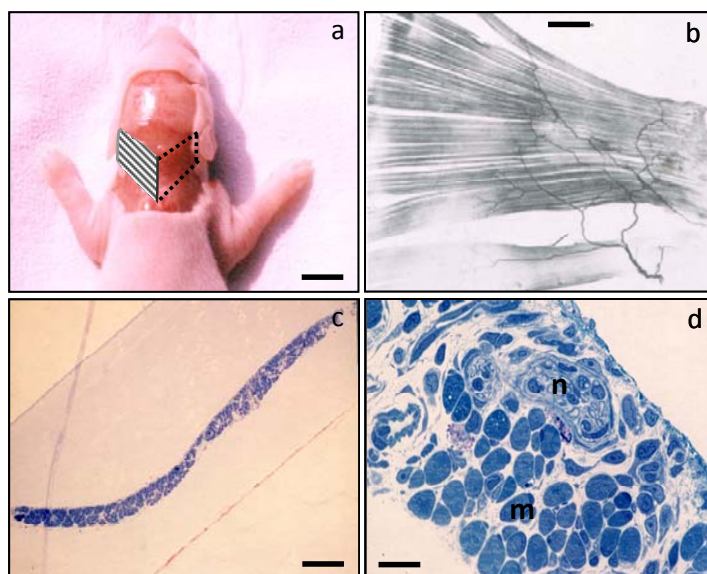


Figura 5. Localització del múscul LAL. Impregnació argèntica i tinció amb blau de metilè. (a) Rata de 8 dies de vida (P8) on s'evidencia l'àrea que ocupa el LAL esquerra. Barra d'escala = 1 cm. (b) Preparació histològica, impregnació argèntica de Gros-Bielschowsky, d'un múscul LAL sencer on s'observa la innervació (Angaut-Petit i cols., 1987). Barra d'escala = 1.2 mm. (c) i (d) Talls semifins transversals d'un múscul LAL tenyit amb blau de metilè. S'observa un nervi (n) entremig dels miòcits (m). Barra d'escala (c) 150µm (d) 50µm.

3. OBTENCIÓ DE LES DIFERENTS MOSTRES

3.1 Dissecció del múscul esquelètic LAL

La dissecció d'aquest múscul és bastant delicada i es necessita treballar sota una lupa estereoscòpica amb material microquirúrgic. En primer lloc, s'anestesia l'animal amb TBE i es dessagna. Després i per facilitar-ne la manipulació, l'animal es fixa amb agulles en una plataforma de suro i en forma de T. Si es tracta d'un animal adult, s'afaita el pèl que cobreix tota la part cranial, vorejant les orelles. Després es retira la pell que envolta el cap per la part dorsal de l'animal, tallant-la des de l'omòplat esquerra cap a l'ull fins arribar al voltant de l'orella d'aquest mateix costat (veure Figura 5a). Una vegada queda al descobert tot el paquet muscular, se'l desinserta del cos de l'animal fins a quedar en un dels extrems l'orella i en l'altre la línia mitja que uneix els dos músculs LAL. Es diposita amb la part muscular interna a la superfície, en una placa de Petri (amb el fons de Sylgard) que conté solució Ringer normal (veure detalls de la solució a l'apartat 8.5) per mantenir-lo viu en el cas d'utilitzar-lo per electrofisiologia. En el cas d'estudis morfològics en comptes de Ringer s'utilitza tampó salí fosfat (PBS, pH 7,4). Per al Western blot, el múscul es congela directament i per a la immunohistoquímica, es fixa immediatament amb paraformaldehid per a la seva conservació (veure detalls més endavant). Després s'extreu tot el seguit de músculs que es troben per sobre, fins que només en queda un que és el LAL. Tant en el cas dels estudis funcionals com estructurals, és vital extreure el màxim de teixit connectiu que envolta les fibres musculars, per a que les diferents substàncies o anticossos puguin penetrar bé, amb delicadesa de no lesionar el múscul. Una vegada s'ha aïllat el LAL, el procediment a seguir s'explica més endavant en cadascuna de les metodologies utilitzades.

3.2 Dissecció del cervell i la medul·la espinal

Per a realitzar controls positius per a determinar l'expressió de les diferents neurotrofines i els seus receptors amb la tècnica WB, s'han fet servir dos altres models experimentals: el cervell i la medul·la espinal d'animals neonats. Concretament, de la medul·la es fa servir la regió ventral que és on hi ha els somes de les motoneurons que innerven la musculatura esquelètica.

Per a l'extracció de la medul·la, una vegada l'animal s'ha dessagnat es fixa amb agulles a una superfície de suro. Amb unes tisores es fa una incisió a la part dorsal per sobre la columna vertebral fins que aquesta queda al descobert. Després es talla l'ós de les vertebres amb cura fins que s'evidencia la medul·la. Es selecciona la regió ventral de la medul·la i es posa en un tub eppendorf que conté PBS en fred. Després es congela a -30°C fins que s'ha d'utilitzar.

Amb l'extracció del cervell, el procediment és el següent: una vegada l'animal ja està dessagnat, es fixa en forma de T a la superfície del suro per les extremitats i el morro. Amb l'ajuda d'unes tisores grosses especials per a tallar os, es fa un tall per un dels laterals de la boca fins arribar a la superfície cranial. Després es fa pressió per obrir la superfície cranial i poder accedir al cervell que es retira amb una espàtula i es congela amb PBS a -30°C .

4. DETECCIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇANT ELECTROFORESI SDS-PAGE I WESTERN BLOT

4.1 Fonament de la tècnica.

La tècnica Western blot, té com a objectiu la detecció de proteïnes en una mescla complexa de diferents proteïnes com pot ser per exemple l'homogeneïtzat d'algun teixit. En aquesta tècnica, les proteïnes es separen pel seu pes molecular mitjançant electroforesi amb gels de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) i posteriorment es transfereixen a una membrana, en aquest cas de PVDF mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric perpendicular al gel. Després es realitza la detecció de la proteïna en les membranes, mitjançant la utilització de l'anticòs primari per a l'antigen d'interès (Towbin i cols., 1979). Les dades que s'obtenen permeten per un costat, realitzar afirmacions qualitatives mitjançant l'observació de la presència o no de la proteïna en la mostra analitzada, i per l'altre costat, aportar dades semiquantitatives que permeten observar canvis en l'expressió de les diferents proteïnes d'interès, i per últim avaluar l'especificitat dels anticossos utilitzats. Aquesta tècnica consta de diferents passos diferenciats que es detallen a continuació:

4.1.1 Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi amb SDS-PAGE (gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic; Laemmli, 1970) permet separar les proteïnes pel seu pes molecular de les mostres amb l'aplicació d'un camp elèctric. Aquest gel, està compost per poliacrilamida composta d'una barreja d'acrilamida/bisacrilamida que forma un entramat similar a una xarxa. En la preparació del gel, es fa servir el tampó TRIS, SDS, persulfat d'amoni (PSA) i TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina). Aquests dos últims fan que la barreja polimeritzi i gelifiqui. L'SDS interacciona amb les proteïnes i, per les seves propietats, fa que la separació d'aquestes en el gel sigui només dependent del seu pes molecular. Aquest gel de poliacrilamida s'utilitza en dues variants diferents (amb un % de

poliacrilamida i un pH diferents) amb les que s'aconsegueixen característiques físiques apropiades per a funcions diferents: són el gel acumulador i el gel separador.

El gel acumulador, presenta un percentatge baix en poliacrilamida (5%) i un pH també més baix (pH 6,7). Serveix per apilar les proteïnes abans que entrin al gel separador. D'aquesta manera, totes les proteïnes comencen a migrar al mateix moment i des del mateix lloc, pel que no hi ha diferències temporoespacials entre les diferents mostres.

Per altra banda, el gel separador té un percentatge més alt de poliacrilamida que és variable segons els pesos moleculars de les proteïnes d'interès que volem separar (un pH superior de 8,8). D'aquesta manera, si les proteïnes són de pes molecular baix (10-50 kDa), es pot fer servir un gel amb un % més elevat, del 12-15% per exemple, mentre que si les proteïnes són més grans (100-250 kDa), el percentatge de poliacrilamida serà més baix, per exemple del 7-8%, per a que la trama del gel sigui més espaiada i permeti a les proteïnes més grans desplaçar-s'hi.

4.1.2 Transferència o Western blot

La transferència o "blotting" suposa la immobilització de les proteïnes separades prèviament en el gel de poliacrilamida, sobre membranes sintètiques de PVDF (de l'anglès *polyvinylidene difluoride*) o de nitrocel·lulosa, per després detectar-les per immunodetecció.

4.1.3 Immunodetecció

En aquest pas de la tècnica, s'aconsegueix la detecció de les proteïnes transferides a la membrana PVDF mitjançant la utilització dels anticossos primari i secundari. L'anticòs secundari està vinculat a la peroxidasa de rave (HRP). Quan es procedeix al revelat amb el mètode quimioluminiscent (que és l'utilitzat en aquest

treball) la reacció d'oxidació que té lloc, dona com a resultat un substrat oxidat a més de l'emissió de llum. Aquesta llum és la que després es pot detectar mitjançant diversos sistemes de revelat.

4.2 Procediment per a la detecció de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) mitjançant el Western Blot

Amb l'objectiu de confirmar la presència de les diferents neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) en el múscul esquelètic, s'han utilitzat homogeneïtzats de múscul LAL, cervell i medul·la d'animals de 6-7 dies postnals, i múscul d'animals adults de 30-45 dies postnals aproximadament. El cervell i la medul·la s'han utilitzat com a controls positius. L'obtenció de les proteïnes totals dels diferents teixits, s'ha fet a partir de les mostres obtingudes com s'ha explicat anteriorment. Les mostres s'han homogeneïtzat per separat mitjançant un homogeneïtzador manual de vidre, amb tampó d'homogeneïtzació (20 % w/v, veure composició a l'apartat 4.3 *Tampons i reactius utilitzats*). Una vegada s'ha obtingut l'homogenat, s'ha centrifugat a 4.000 g durant 5 minuts i se n'ha extret el material insoluble. S'ha tornat a centrifugar a 15.000 g durant 15 minuts i del sobrenedant resultant, que és la fracció de llistat, se n'ha quantificat la quantitat de proteïna final. Per determinar la quantitat de proteïna s'ha utilitzat el mètode *DC Protein Assay* de BioRad. Aquest mètode consta d'un assaig colorimètric per a la determinació de la quantitat de proteïna en mostres que s'han solubilitzat utilitzant detergents. Per últim, s'ha llegit l'absorbància a 750 nm. Juntament amb la preparació de les mostres a quantificar s'ha preparat una recta patró amb una solució d'albumina sèrica bovina (BSA). Tant les mostres com la recta patró s'han preparat per duplicat. Abans de carregar les mostres, s'han barrejat amb el tampó reductor de la mostra (per conèixer composició, veure apartat 4.3 *Tampons i solucions utilitzats*), que conté β -mercaptoetanol (que trenca l'estructura terciària de les proteïnes) i SDS (un detergent que confereix càrrega negativa a la proteïna proporcionalment al seu pes molecular).

També conté colorant blau de bromofenol (0.006%) per a poder seguir la migració de les proteïnes en el gel.

La preparació dels gel separador de poliacrilamida i l'electroforesi s'han fet mitjançant el sistema Mini-Protean 3 (MP-3) de BioRad que permet treballar amb volums de mostra relativament baixos (10-50 μ l). S'han fet servir diferents percentatges d'acrilamida en funció dels pesos moleculars de les neurotrofines i els receptors. Així per als receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} s'ha fet servir un gel de poliacrilamida al 8% i un altre al 12,5 % per les neurotrofines BDNF, NT4 i NT3, ja que aquestes tenen un pes molecular més baix.

Quan les mostres d'interès i els gels han estat preparats, s'ha col·locat tot a la cubeta d'electroforesi i s'han carregat les fraccions de llisat en els carrils de l'electroforesi. La quantitat total de proteïna ha estat de 100 μ g per a totes les neurotrofines i receptors menys en el cas del BDNF que s'ha carregat 50 μ g de proteïna de cervell i medul·la. Per a cada neurotrofina i receptor, s'ha carregat un carril per al control negatiu (veure més endavant). En cada gel s'ha reservat un o dos carrils pel marcador del pes molecular (*Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers*, Amersham). Després s'ha afegit el tampó d'electroforesi (veure apartat 4.3 *Tampons i solucions utilitzats*) que afavoreix que les proteïnes corrin en el gel, s'ha aplicat el camp elèctric fixant el voltatge entre 90-100 volts i s'ha deixat córrer fins que el front de càrrega ha arribat al final del gel. El temps que triga a córrer el gel dependrà del voltatge aplicat i del % de poliacrilamida del gel (un gel al 8% d'acrilamida a un voltatge de 90 mVolts pot tardar 1 hora i mitja).

Una vegada obtinguts els gels amb les proteïnes separades pel pes molecular, s'ha realitzat la transferència a les membranes de PVDF. Per a la transferència s'ha utilitzat el mateix sistema MP-3. Un cop la membrana de PVDF s'ha activat amb metanol, s'ha muntat el sandvitx amb el gel, la membrana PVDF on es transferiran les proteïnes, i les esponges i papers de filtre mullats amb tampó de transferència. Aquest conjunt s'ha recollit entre dues tapes de plàstic perforat amb dos pols diferenciats, un de negre que és el negatiu i un altre transparent que és el positiu. Després s'ha

introduït en un tanc ple de tampó de transferència que posseeix dos elèctrodes plans dissenyats per aconseguir un camp uniforme a tota la superfície del gel. No s'ha introduït de qualsevol manera, s'ha disposat el gel cap a l'ànode (-) i la membrana cap al càtode (+). Tot aquest sistema s'ha refrigerat amb uns blocs de gel, ja que el procés adquireix temperatures altes. Una vegada muntada la transferència, s'ha aplicat un camp elèctric a un amperatge fix de 250 mA durant 1 hora. Transcorreguda aquesta hora, s'ha desmuntat la preparació amb les esponges i s'ha obtingut la membrana a la que s'han transferit les proteïnes i amb la qual s'ha procedit a la immunodetecció.

Abans de començar la immunodetecció, s'han bloquejat les membranes amb tampó de bloqueig durant (composició detallada al següent apartat *4.3 Tampons i reactius utilitzats*) a base de tampó Tris i llet descremada (5%). Per a la detecció de les proteïnes en les diferents membranes, s'han utilitzat els anticossos primaris contra les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i els receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} que es detallen a la següent taula (Taula 2), on també es mostra el tipus d'anticòs, la casa comercial i la dilució empleada.

Proteïna detectada	Anticòs	Casa comercial	Dilució
BDNF	anticòs policlonal de conill	N-20: sc-546, Santa Cruz	1:700
NT-4	anticòs policlonal de conill	AB1781, Chemicon	1:500
NT-3	anticòs policlonal de conill	ANT-003, Alomone Labs	1:500
TrkB	anticòs policlonal de conill	H-181: sc-8316, Santa Cruz	1:1000
TrkC	anticòs policlonal de conill	AB9834, Millipore	1:300
p75^{NTR}	anticòs policlonal de cabra	C-20: sc-6188, Santa Cruz	1:1000

Taula 2. Taula d'anticossos primaris utilitzats en la tècnica de detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot.

Una vegada s'han realitzat les incubacions amb l'anticòs primari (diluint amb el tampó de bloqueig) durant tota la nit a la nevera i en moviment, s'han fet 3 rentats

amb tampó de rentat de 10 minuts cadascun. L'anticòs secundari vinculat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP, Jackson Immunoresearch) s'ha incubat durant 1-2 hores a una dilució 1:20.000–1:40.000 i a temperatura ambient. Després s'han realitzat 3 rentats més de 10 minuts amb tampó de rentat i s'ha revelat amb el mètode ECL (*Advance Western Blotting Detection Kit*, Amersham) que és un mètode de detecció quimioluminiscent, compost per Luminol i un potenciador de la senyal, que reaccionen amb l'HRP. Per al revelat s'ha fet servir el sistema de processament d'imatges VersaDoc de BioRad.

S'han realitzat controls negatius per a testar l'especificitat de l'anticòs secundari en tots els Western Blots que s'han fet i descartar unions inespecífiques. Les mostres utilitzades per a aquests controls es processen seguint els mateixos passos, amb la única diferència que en la immunodetecció, únicament s'incuba l'anticòs secundari. En cap dels casos, s'han detectat unions inespecífiques.

4.3 Tampons i reactius utilitzats en el procés de Western blot

A continuació es mostra el llistat de tampons i solucions utilitzats:

- **PBS** (Tampó salí fosfat). Compost per NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM i Na_2HPO_4 8.1 mM (ajustat a pH 7.4).
- **Tampó de bloqueig**. Aquest tampó està compost per 5% de llet descremada en tampó Tris 50 mM ajustat a pH 7.4, NaCl 200 mM, Tritó X-100 al 0.1% i Tween-20 al 0.2%.
- **Tampó d'homogeneïtzació**. Aquest tampó conté Tris 20 mM (ajustat a pH 7.4), EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, i una solució inhibidora de les proteases (AEBSF 1.4 mM, aprotinina 0.8 μM , leupeptina 0.02 μM , bestain 0.04 μM , pepstatina A 0.015 μM , E-64 0.015 μM (1/10 w/v).

- **Tampó reductor de la mostra.** Aquest tampó conté Tris 0,5 M (ajustat a pH 6,8), β -mercaptoetanol 10 mM, SDS al 10 %, EDTA 0,1 M, H₂O bidestilada, glicerol al 20 % i Blau de bromfenol al 0,006 %.
- **Tampó de rentat.** Aquest tampó està compost per Tris 10 mM (ajustat a pH 7.5), NaCl 100 mM i Tween 20 al 0.1%.
- **Gel acumulador.** Està compost per acrilamida/bisacrilamida (8.5% i 5% respectivament), Tris 0.25 M (ajustat a pH 6.8), aigua bidestil·lada, SDS al 10%, TEMED al 0.08% i PSA al 10%.
- **Gel separador.** Compost per acrilamida/bisacrilamida, Tris 0.75 M (ajustat a pH 8.8), SDS al 10%, TEMED al 0.05% i PSA al 10%.
- **Tampó d'electroforesi (SDS-PAGE).** Compost per Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS al 0.1%.
- **Tampó de transferència.** Aquest tampó conté Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol al 20%.

Cal dir que les sals utilitzades en la composició dels diferents tampons i solucions han estat distribuïdes per la casa comercial Sigma. En la següent taula (Taula 3) es mostren els diferents reactius utilitzats i la casa comercial distribuïdora:

Reactiu	Casa comercial
Tris base (hidroxmetil aminometà)	Sigma
Sodi dodecil sulfat (SDS)	Sigma
Glicina	Sigma
β -Mercaptoetanol	Sigma
Blau de bromofenol	Merck
Tritó X-100	Sigma
Persulfat d'amoni (PSA)	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina)	Sigma
Marcador de pes molecular <i>Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker</i>	Amersham
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Glicerol	Panreac
Poliacrilamida	Pronadisa
Metanol	Merck
Llet descremada en pols	Puleva

Taula 3. Reactius utilitzats en la tècnica de detecció de proteïnes per Western blot.

5. TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL PER FLUORESCÈNCIA

5.1 Fonament de la tècnica

La tècnica d'immunohistoquímica (IHQ) convencional per fluorescència, permet identificar estructures i molècules amb gran precisió. Consisteix en utilitzar anticossos específics com a marcadors d'alguna molècula o proteïna, present en les estructures que conformen els teixits o sistemes. Aquests anticossos específics contra l'antigen, s'anomenen anticossos primaris. Després aquests es marquen amb uns altres anticossos, que se'ls anomena secundaris i que estan conjugats amb fluorocroms. Els fluorocroms són molècules que és caracteritzen per tenir la capacitat d'emetre llum d'un determinat espectre quan són excitées a la longitud d'ona apropiada. Existeix un

ampli ventall de fluorocroms que tenen diferents propietats d'excitació i emissió i que són utilitzats en la detecció dels components i estructures cel·lulars amb l'ajuda del microscopi de fluorescència o el microscopi confocal. D'aquesta manera, es poden realitzar marcatges de diverses proteïnes amb diferents colors i visualitzar-les conjuntament. Això permet estudiar les localitzacions, proximitats, i fins i tot co-localitzacions entre les diferents proteïnes marcades.

5.2 Aplicació de la immunohistoquímica convencional en el model neuromuscular

En el nostre model i mitjançant aquesta tècnica convencional, es marquen proteïnes presents en els tres elements de la NMJ per tal de poder visualitzar-los conjuntament.

Previ a la IHQ, s'han obtingut els músculs LALs d'animals postnatsals de 6-7 dies i adults de 30-45 dies, seguint el procediment detallat anteriorment. Una vegada adquirit el paquet muscular, s'ha col·locat en una placa de Petri que conté una base de polímer sintètic Sylgard. Després s'ha fixat la mostra amb paraformaldehid diluït al 4% amb PBS durant 30-40 minuts a 4°C. Una vegada fixat s'han fet 3 rentats de 10 minuts amb PBS i s'ha incubat amb glicina 0.1 M en PBS durant un mínim de 30 minuts per aturar l'acció del fixador utilitzat i bloquejar els grups aldehid que hagin pogut quedar lliures. Un cop fixat, s'ha realitzat la dissecció fina sota lupa i amb ajuda de pinces i estisores per tal de deixar únicament el múscul LAL. És a partir d'ara que es comença amb el protocol d'IHQ.

Primerament s'han bloquejat les unions inespecífiques i s'ha permeabilitzat el teixit amb albúmina sèrica bovina al 4% (BSA) i Tritó X-100 al 0.1% respectivament, en PBS durant una nit a 4°C. Després s'ha realitzat el marcatge amb l'anticòs primari. Les proteïnes de la NMJ que s'acostumen a marcar en la majoria de les IHQs que s'han realitzat són l'S-100, present a la cèl·lula de Schwann (CS), la syntaxina, present en l'axó i el terminal nerviosos i per últim els receptors d'acetilcolina postsinàptics (nAChRs) que es marquen amb alfa-bungarotoxina (α -BTX). L' α -BTX, és una toxina que s'uneix

irreversiblement als nAChRs i es pot utilitzar entre d'altres, conjugada amb TRICT o amb Alexa 647 (dilució 1:600, Molecular Probes). Per a detectar l'S-100, en aquest cas s'ha utilitzat l'anticòs monoclonal de conill (dilució 1:10.000, Z0311 de Dako) ja que s'ha co-localitzat amb la syntaxina, que s'ha marcat amb l'anticòs monoclonal de ratolí (dilució 1:1000, S 0664 de Sigma). La incubació de l'anticòs primari s'ha fet durant tota la nit a 4°C i amb el mateix tampó de bloqueig i permeabilització que s'ha utilitzat en el primer pas. Després de la incubació amb el primari, s'han rentat les mostres amb PBS, fent 3 rentats de 10 minuts per eliminar l'anticòs lliure que no s'ha unit. A continuació, s'ha incubat amb l'anticòs secundari o una barreja d'aquests. En aquest cas, els anticossos secundaris que s'han utilitzat són l'Alexa Fluor 488 d'ase contra ratolí (dilució 1:300, A-21202 de Molecular Probes) per a la syntaxina (en verd) i Alexa Fluor 647 d'ase contra conill (dilució 1:300, A-31571 de Molecular Probes) per a l'S-100 (en blau). En aquest cas els nAChRs s'han marcat amb α -BTX-TRICT (en vermell).

Com ja s'ha explicat abans, els anticossos secundaris estan conjugats a un fluorocrom específic. La incubació s'ha realitzat durant 4-6 hores a temperatura ambient i a la foscor per tal de que no es perdi la senyal fluorescent. L' α -BTX s'ha afegit al mateix temps que els anticossos secundaris. Un cop acabat aquest temps d'incubació s'han tornat a rentar les mostres amb PBS (3x10) per tornar a eliminar els sobrants. Per acabar s'han muntat les mostres amb un medi de Mowiol amb p-fenilenediamina per a prolongar la marca fluorescent. Una vegada s'han muntat les mostres i s'han deixat reposar un temps prudencial es visualitzen amb un microscopi làser confocal Nikon (TE-2000-E).

Els resultats que s'obtenen mitjançant aquesta tècnica, aplicada al model neuromuscular, es mostren a la Figura 6. En tots els casos s'han marcat la syntaxina, l'S-100 i els nAChRs. En la primera IHQ (Figura 6A), realitzada amb múscul adult, s'intueix en una petita porció de la placa (veure fletxa blanca imatge co-localitzada Figura 6A) la disposició dels tres components de la NMJ que després s'acabarà de tractar i aclarir amb els exemples de les seccions semifines. S'observa una marca de color vermell corresponent als nAChRs, per sobre d'aquests una marca verda intensa corresponent

als botons del terminals nerviosos i envoltant aquestes dues estructures la marca blava de la CS. En la segona imatge, realitzada en múscul nadó (Figura 6B), es pot veure el recorregut dels diferents axons que finalitzen a les tres plaques motores. La marca de la CS mielínogènica es troba recobrint els axons i la CS teloglial per sobre de les plaques motores. En quant als nAChRs, s'aprecia com encara es troben en l'estat immadur ja que no presenten la morfologia en plects primaris independents pròpia de l'adult i que si s'evidencia a la de la Figura 6A.

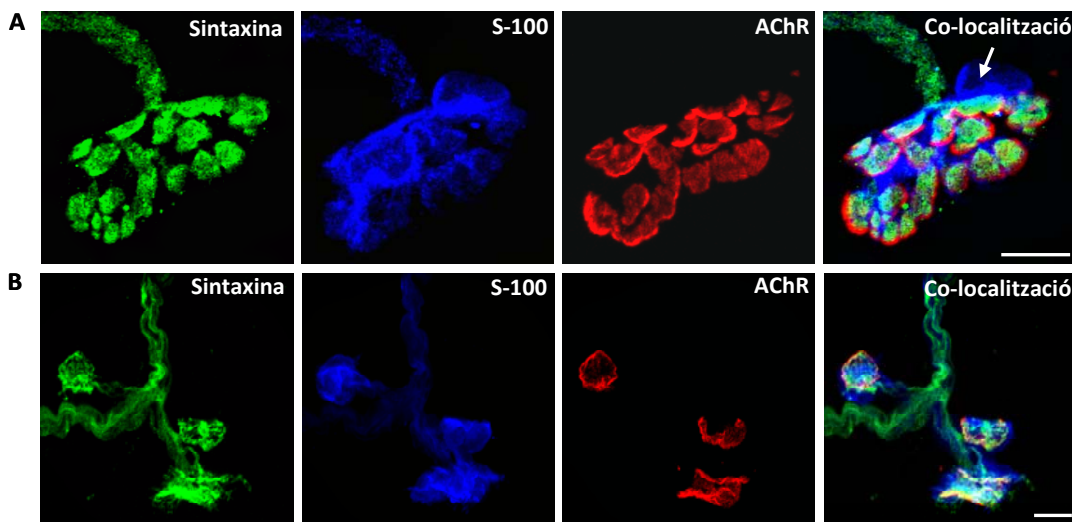


Figura 6. Exemples d'immunohistoquímiques convencionals en músculs adult (A) i neonatal (B). S'ha marcat en els dos casos, el component presinàptic amb la syntaxina (en verd), la CS amb l'S-100 (en blau) i el component postsinàptic (nAChRs, en vermell). En l'A es mostra una placa motora adulta, on s'intueix la disposició espacial dels tres component de la NMJ (fletxa blanca). En la B, s'observen tres plaques motores i el recorregut axonal d'un múscul neonatal. Barra d'escala 10 µm.

5.3 Procediment per a la localització de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR})

Amb l'objectiu de descriure la localització de les neurotrofines estudiades (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) en la NMJ neonatal i adulta, s'han realitzat triples marcatges on s'ha detectat cadascuna de les neurotrofines o receptors conjuntament amb la syntaxina (marcador del terminal i preterminal nerviosos) o l'S-100 (marcador de la CS) i els nAChRs (veure Taula 4). La finalitat de realitzar els triples marcatges és la de poder co-localitzar la proteïna d'interès amb els components de la NMJ i així estudiar-ne la seva localització. A la taula que es mostra a continuació, es llisten els anticossos primaris i secundaris que s'han fet servir en cada cas, la casa comercial i les dilucions empleades.

Amb la intenció de descartar la inespecificitat i reaccions creuades no apropiades entre els anticossos secundaris i primaris amb aquesta tècnica, s'han realitzat dos tipus de controls en múscul P6. El primer s'ha realitzat per veure si l'anticòs secundari s'uneix a altres estructures de la unió neuromuscular a més a més de l'anticòs primari. Per això s'ha incubat la mostra en absència d'anticossos primaris i presència del seus secundaris, observant que no hi ha tinció inespecífica (resultats no mostrats).

Proteïna marcada	Anticòs primari	Casa comercial	Dilució
BDNF	anticòs policlonal de conill	N-20: sc-546, Santa Cruz	1:50
NT-4	anticòs policlonal de conill	AB1781, Chemicon	1:800
NT-3	anticòs policlonal de conill	ANT-003, Alomone Labs	1:800
TrkB	anticòs policlonal de conill	H-181: sc-8316, Santa Cruz	1:500
TrkC	anticòs policlonal de conill	AB9834, Millipore	1:1000
p75^{NTR}	anticòs policlonal de cabra	C-20: sc-6188, Santa Cruz	1:100
Syntaxina	anticòs monoclonal de ratolí	S 0664, Sigma	1:1000
S-100	anticòs monoclonal de ratolí	ab4066-500, Abcam	1:1000
S-100	anticòs monoclonal de conill	Z 0311, Dako	1:10000

Anticòs secundari	Casa comercial	Dilució
Alexa Fluor 488. IgG d'ase contra-conill	A-21206, Molecular Probes	1:300-500
Alexa Fluor 488. IgG d'ase contra-cabra	A-11055, Molecular Probes	1:300-500
Alexa Fluor 488. IgG d'ase contra-ratolí	A-21202, Molecular Probes	1:300-500
Tetrametil rodamina (TRICT). IgG d'ase contra-ratolí	715-025-151, Molecular Probes	1:300-500
Alexa Fluor 647. IgG d'ase contra-ratolí	A-31571, Molecular Probes	1:300-500

Taula 4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en la IHQ convencional i en les seccions semifines per a la localització de les neurotrofines i els seus receptors.

El segon tipus de control permet descartar que hi hagi reaccions creuades entre els diferents anticossos primaris i secundaris utilitzats. Per això, en l'exemple que es mostra a la Figura 7A i 7B, s'han utilitzat els anticossos necessaris (primari i secundari) per a marcar l'S-100, el primari és l'anticòs monoclonal de ratolí (1:1000, ab4066-500 d'Abcam), i com a anticòs secundari l'Alexa Fluor 647 d'ase contra-ratolí (1:300, A-31571, Molecular Probes). També s'han marcat els nAChRs amb α -BTX-TRICT (en vermell). Per veure la possible inespecificitat dels anticossos secundaris de les neurotrofines o dels seus receptors específics, s'ha afegit també el secundari d'ase contra-conill conjugat amb Alexa 488 (com a control negatiu pels anticossos primaris de les tres neurotrofines i els receptors TrkB i TrkC, Figura 7A) o bé s'ha afegit l'anticòs secundari d'ase contra-cabra conjugat amb Alexa 488 (com a control negatiu per l'anticòs del p75^{NTR}, Figura 7B).

En les imatges obtingudes es comprova que els diferents anticossos secundaris presenten especificitat única vers el seu corresponent anticòs primari, i per tant no permeten reaccions creuades.

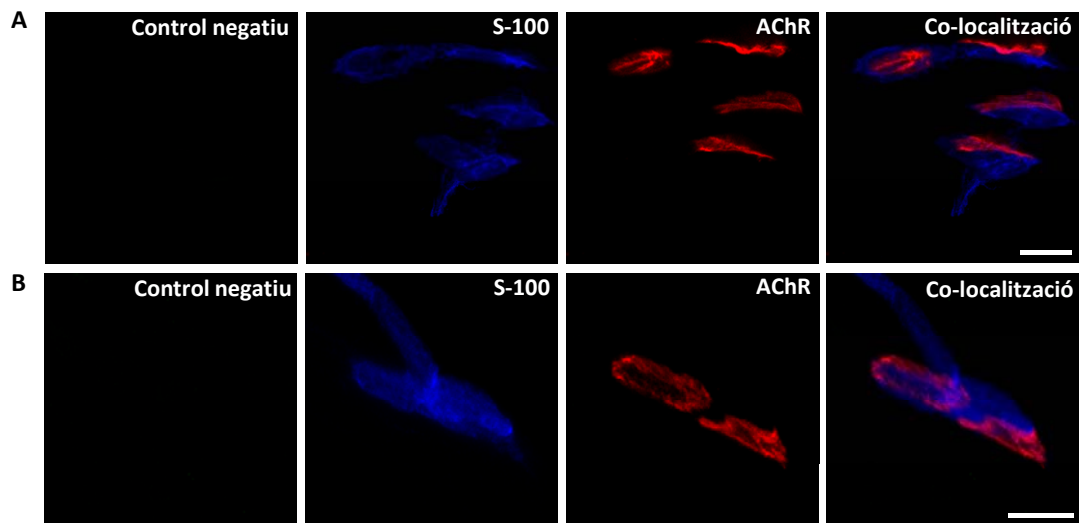


Figura 7. Controls negatius amb la tècnica d'IHQ convencional realitzats en múscul P6. (A) Control per a l'anticòs d'ase contra-conill conjugat amb Alexa Fluor 488. **(B)** Control per a l'anticòs d'ase contra-cabra conjugat amb Alexa Fluor 488. En els dos casos, els anticossos secundaris per a les neurotrofines i els seus receptors, no reaccionen amb els altres anticossos utilitzats. Barra d'escala 10 μ m.

5.4 Tampons i solucions utilitzats en la tècnica d'immunohistoquímica convencional

- **PBS** (Tampó salí fosfat). Compost per NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM i Na_2HPO_4 8.1 mM amb un pH ajustat a 7.4.
- **Tampó de bloqueig i permeabilització.** Compost per BSA al 4% i Tritó al 0.1% en base PBS.
- **Paraformaldehyd.** Concentració de treball: 2-4 % i dissolt en solució salina.

Les diferents sals que s'han utilitzat són de la casa comercial Sigma. En aquesta tècnica s'han utilitzat els reactius detallats a la Taula 5:

Reactiu	Casa comercial
Paraformaldehid	Sigma
Tritó X-100	Sigma
Albúmina sèrica bovina (BSA)	Sigma
α -BTX conjugada amb Alexa 647	Molecular Probes
α -BTX conjugada amb TRICT	Molecular Probes

Taula 5. Reactius utilitzats en la tècnica de localització de proteïnes per IHQ convencional.

6. SECCIONS SEMIFINES PER A LA IMMUNOFLUORESCÈNCIA D'ALTA RESOLUCIÓ

6.1 Fonament de la tècnica

La tècnica d'obtenció de les seccions semifines d'alta resolució, consisteix en adquirir seccions semifines d'uns 0.5-0.7 μm de gruix, de la mostra o teixit d'estudi una vegada s'ha inclòs en un medi que li proporciona consistència, com per exemple diferents tipus de resines sintètiques (*Epoxy*, *Spurr*, etc...), o acríliques o també policarbonat. El procés consta de diferents passos, començant amb una bateria creixent d'alcohols i acetona amb la finalitat de deshidratar la mostra i la posterior inclusió en la resina. Adquirir els talls semifins, és el pas previ a l'obtenció dels talls ultrafins per a microscòpia electrònica de transmissió, tot i que no ha estat aquesta la finalitat en aquest treball.

6.2. Aplicació de la tècnica de seccions semifines en el model neuromuscular

Amb la IHQ convencional s'aconsegueix el marcatge dels elements de la NMJ (el terminal nerviós, la cèl·lula de Schwann i els nAChRs en el component postsinàptic), conjuntament amb la proteïna d'interès en el múscul sencer. Moltes vegades, el

resultat final és una imatge en la que es superposen els colors corresponents als tres marcadors utilitzats donada la proximitat entre les tres cèl·lules (Lanuza i cols., 2007) (per exemple veure Figura 6A i 6B). Això en alguns casos pot representar un problema a l'hora de discernir entre les diferents parts i precisar la localització del marcatge de la proteïna d'interès. Amb la finalitat d'aconseguir una millor resolució en les imatges obtingudes per microscòpia confocal, i poder precisar en la distribució específica cel·lular i subcel·lular dels tres components de la NMJ, s'ha combinat la IHQ convencional i l'obtenció de talls semifins. D'aquesta manera, i previ a la inclusió es realitza l'immunomarcatge dels components de la NMJ i de les proteïnes d'estudi, com s'ha explicat en l'apartat anterior, i posteriorment es comença el tractament de deshidratació i inclusió en resina (procés detallat en el següent apartat), per acabar obtenint les seccions semifines.

La NMJ té una estructura ordenada en l'espai i moltes vegades es fa el símil amb un sandvitx al que se li ha fet un tall transversal i es poden veure els diferents components. Així, com es mostra en el dibuix de la Figura 8A, extret d'una imatge d'un tall semifí, els nAChRs (en vermell) es localitzen a la superfície de la cèl·lula muscular (en blanc). Immediatament per sobre es troben els terminals nerviosos (en verd) i tot aquest conjunt queda sellat per la CS (en blau). Per tal que es doni aquesta disposició de les cèl·lules, els talls semifins s'han de realitzar transversalment a la direcció de la mostra. D'aquesta manera s'aconsegueix situar les diferents cèl·lules en un mateix pla.

Exemples del tipus d'imatges que s'adquireixen utilitzant aquesta tècnica en el model neuromuscular, es mostren en la Figura 8B (múscul adult) i 8C (múscul neonatal), on es poden identificar els tres elements cel·lulars (situant la syntaxina al centre) i la posició que ocupen sense problemes de solapament entre ells i amb molt bona resolució (Garcia i cols., 2005; Lanuza i cols., 2007). Els anticossos utilitzats en l'obtenció d'aquests talls semifins han estat els mateixos que en els marcatges en les IHQs convencionals (veure Taula 2).

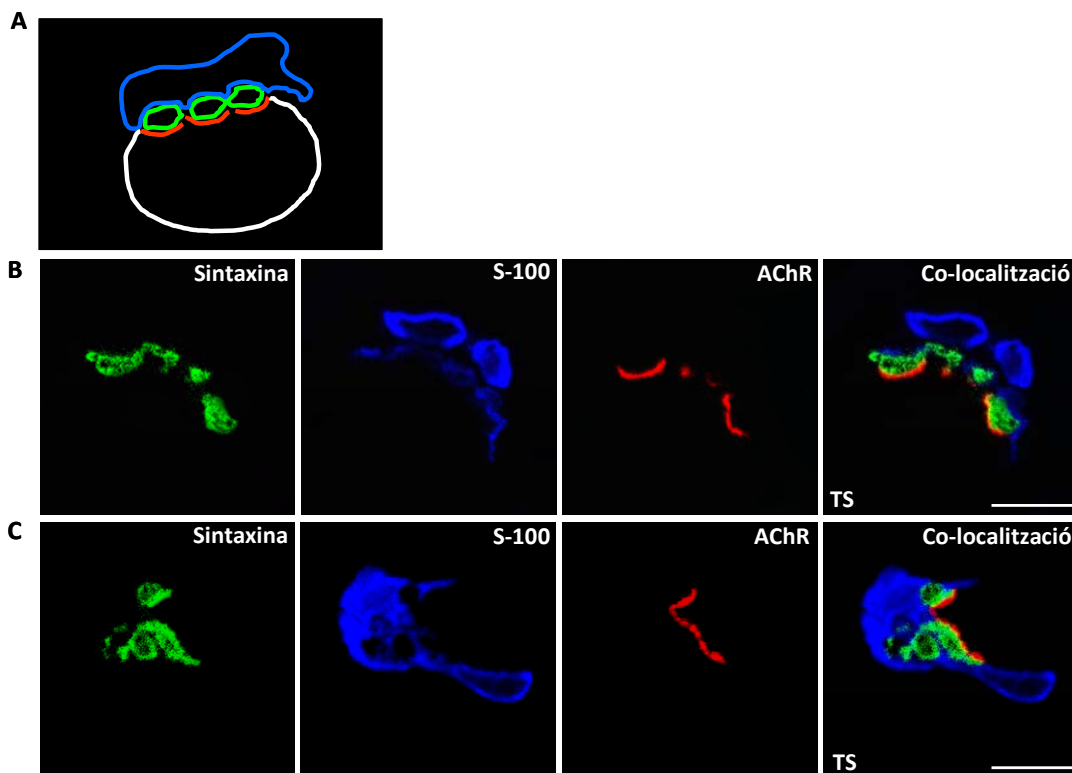


Figura 8. La unió neuromuscular. Exemples de seccions semifines transversals de sinapsi adulta (B) i neonatal (C). A l'esquema A es mostra l'ordre dels tres components de la NMJ. Els receptors en vermell, es localitzen a la superfície de la cèl·lula muscular (en blanc). Per sobre de color verd es situen els terminals nerviosos i per damunt d'aquests la cèl·lula de Schwann (en blau). **(B)** Imatge de tall semifí realitzat en múscul adult on s'observen els tres components de la NMJ, el terminal nerviós marcat amb la syntaxina (en verd), la cèl·lula de Schwann marcada amb l'S-100 (en blau) i els AChRs nicotínics marcats amb α -BTX-TRICT (en vermell). La última imatge correspon a la vista co-localitzada dels tres components on es pot apreciar la disposició ordenada que presenten en l'espai. **(C)** Exemple de tall semifí obtingut de múscul de nadó on s'han utilitzat els mateixos marcadors, adquirint un resultat molt semblant a l'adult en quan a la separació dels 3 components de la NMJ. Barra d'escala 10 μ m.

6.3 Procediment per a la localització de les neurotrofines (BDNF, NT-4 i NT-3) i els seus receptors (TrkB, TrkC i p75^{NTR})

Amb la finalitat de precisar en la distribució específica cel·lular i subcel·lular dels tres components de la NMJ i la localització de les NTs BDNF, NT-4 i NT-3 i els seus

receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR}, s'ha combinat la IHQ convencional i l'obtenció de seccions semifines quan ha estat necessari. D'aquesta manera, en l'obtenció de seccions semifines, i previ a la inclusió de la mostra s'ha realitzat l'immunomarcatge convencional en músculs LAL sencers, de les NTs i els seus receptors simultàniament amb la syntaxina o l'S-100 i els nAChRs (procés detallat en l'apartat anterior). Tot seguit i amb la utilització d'un microscopi de fluorescència, s'han seleccionat les zones riques en unions neuromusculars detectant els nAChRs que s'han marcat amb α -BTX conjugada amb TRICT o Alexa 647. Un cop seleccionada la zona, s'ha tallat a una mida aproximada de 3 mm² i s'ha procedit a l'obtenció de blocs de resina *Spurr*. Per a obtenir-los, s'ha seguit un protocol de canvis en diferents medis començant amb alcohols creixents per a deshidratar la mostra: banys cada 10 minuts en alcohol al 30% - 50% - 70% - 96% - 100%, després 3 canvis de 15 minuts en acetona. En acabar, s'ha fet la preinclusió dels fragments en acetona-resina *Spurr*: durant 1½ - 2 hores en proporcions 3:1 (acetona : resina) a temperatura ambient i en agitació. Després 1½ - 2 hores a proporcions 1:1, i finalment 1 hora a proporcions 1:3 en les mateixes condicions. S'ha incubat en aquesta última proporció tota la nit a 4°C en agitació i amb els vials tapats. Una vegada realitzada la preinclusió, que ha permès que la resina s'hagi anat introduint a poc a poc entre els fragments del múscul, s'ha realitzat la inclusió dels fragments en resina *Spurr* pura: 3 banys de resina *Spurr* pura de 1½ - 2 hores cada bany a temperatura ambient i en agitació. Un cop acabada la inclusió de la mostra, el fragment de múscul s'ha orientat transversalment en el motlle de silicona per fer els blocs. Per a que la resina solidifiqui s'han col·locat els blocs a l'estufa a 60°C durant 48 hores. Una vegada els blocs han solidificat, s'han piramidat per l'extrem que conté el tros de múscul LAL i s'han realitzat les seccions semifines, d'un gruix de 0.5-0.7 μ m, amb el micròtom (Reichert Ultracut E microtome, Leica Microsystems). Els talls semifins resultants s'han col·locat en portaobjectes i s'han observat mitjançant el microscopi làser confocal (TE-2000-E, Nikon).

De la mateixa manera que per a la tècnica d'IHQ convencional, s'han obtingut controls per a descartar inespecificitat i reaccions creuades entre els anticossos

primaris i secundaris. En aquest cas es presenten músculs adults. En el primer dels controls, s'ha avaluat la possible unió inespecífica de l'anticòs secundari a altres estructures, per això s'ha omès l'anticòs primari contra les diferents neurotrofines però no l'anticòs secundari corresponent i s'ha observat com els anticossos secundaris, amb aquesta tècnica no marquen de manera inespecífica cap altra estructura de la NMJ (imatges no mostrades).

En el segon control, s'ha avaluat la possibilitat de les reaccions creuades entre els anticossos secundaris utilitzats per les neurotrofines i els seus receptors. Com es mostra a la Figura 9, s'ha marcat l'S-100 (en blau) amb l'anticòs monoclonal de ratolí (1:1000, ab4066-500, Abcam) i com a anticòs secundari Alexa 647 d'ase contra-ratolí (1:300, A-31571, Molecular Probes), conjuntament amb el secundari d'ase contra-conill conjugat amb Alexa 488 (com a control negatiu pels anticossos primaris de les tres neurotrofines i els receptors TrkB i TrkC, Figura 9A) o bé s'ha afegit l'anticòs secundari d'ase contra-cabra conjugat amb Alexa 488 (com a control negatiu per l'anticòs del p75^{NTR}, Figura 9B). També s'han marcat els nAChRs amb α -BTX-TRICT (en vermell). En les imatges obtingudes es comprova que els diferents anticossos secundaris presenten especificitat única vers el seu corresponent anticòs primari, i per tant no permeten reaccions creuades.

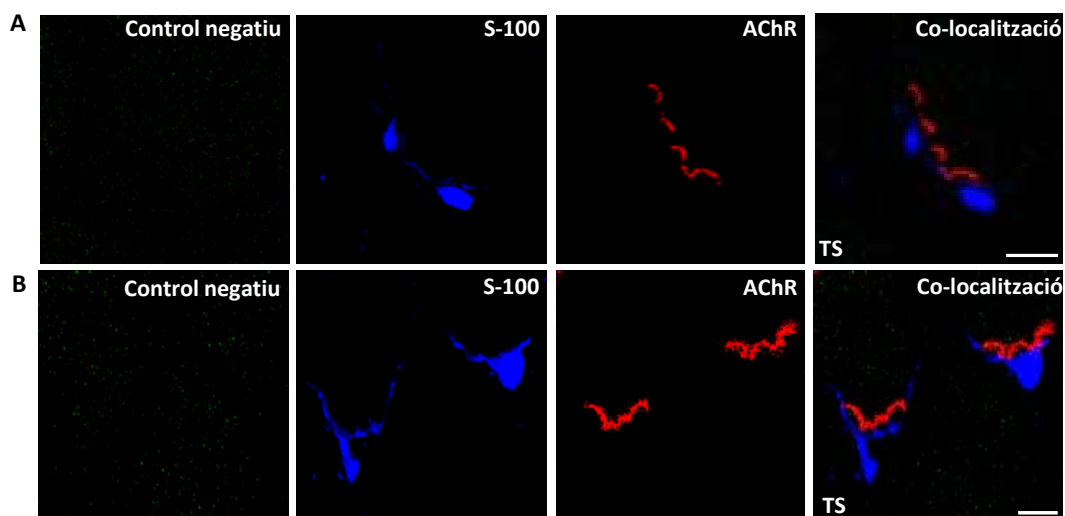


Figura 9. Controls negatius amb la tècnica de talls semifins realitzats en múscul P30. A Control per a l'anticòs d'ase contra-conill conjugat amb Alexa Fluor 488. **B** Control per a l'anticòs d'ase contra-cabra conjugat amb Alexa Fluor 488. En els dos casos, els anticossos secundaris per a les neurotrofines i els seus receptors, no reaccionen amb els altres anticossos utilitzats. Barra d'escala 10 µm.

6.4 Solucions i reactius utilitzats en el procés d'obtenció de seccions semifines

A més a més dels tampons i solucions utilitzats per a la IHQ, per al processament de talls semifins s'han utilitzat els reactius de la Taula 6:

Reactiu	Casa comercial
Alcohol a diferents % dissolts en aigua destil·lada	Panreac
Acetona 100% ultrapura	Panreac
Resina-Spurr ERL (vinil ciclohexenedioxid) DER (diglicidil èter polupropolè glicol) NSA (nonenil succinic anhidre) DMAE (dimetilamino etanol)	Electron Microscopy Sciences

Taula 6. Reactius utilitzats en la tècnica de localització de proteïnes per talls semifins

7. MICROSCÒPIA LÀSER CONFOCAL

Una vegada que les mostres estan muntades ja sigui mitjançant el procediment d'IHQ convencional o per a talls semifins, es visualitzen les sinapsis neuromusculars amb el microscopi làser confocal Nikon (TE-2000-E). Les imatges es capten amb un objectiu de 63x o 100x d'1.4 d'obertura numèrica oil (UPlan-Apochromatic objective). Els fluorocroms Alexa fluor 488, TRICT i Alexa fluor 647 s'han excitat seqüencialment

amb les línies de 488 nm, 568 nm i 633 nm amb làsers d'argó-kriptó-He-Ne. S'ha tingut en compte la força dels làsers per evitar qualsevol senyal de contaminació d'un canal en un altre. Les seccions X i Y s'han recollit en la direcció Z d'una mostra utilitzant un "Z-stage" (platina mòbil) d'elevada resolució. Les projeccions de màxima intensitat de les successives seccions X,Y es transformen en projeccions 3D utilitzant un software específic del microscopi làser confocal.

8. METODOLOGIA ELECTROFISIOLÒGICA

S'han realitzat diferents tipus d'experiments electrofisiològics amb la finalitat d'obtenir resultats funcionals i poder descriure els rols de les diferents NTs en el desenvolupament de les NMJ neonatals, el procés d'eliminació sinàptica i en definitiva la seva participació en la modulació de la neurotransmissió. Per a tal objectiu s'ha treballat amb la tècnica electrofisiològica de registres intracel·lulars convencionals. Amb aquesta tècnica s'aconsegueix reproduir artificialment d'una manera fidel, la resposta fisiològica de la sinapsi neuromuscular.

8.1 Preparació del múscul LAL

La dissecció del múscul LAL ha de ser molt acurada i poc lesiva. El procediment a seguir per a la dissecció és molt semblant a la que s'ha comentat a l'apartat 3.1. *Dissecció del múscul esquelètic LAL*. Una vegada s'obté el paquet muscular a la superfície del qual es troba el LAL, es diposita a la placa de Petri amb un fons de Sylgard que conté solució Ringer normal (veure composició a l'apartat 8.4.8 *Substàncies utilitzades en la metodologia electrofisiològica*), de manera que el LAL queda a la part més profunda, el grup muscular es subjecta amb agulles entomològiques, s'extreu tots els músculs que queden per sobre el LAL fins a que aquest queda l'últim i es poleix l'excés de teixit connectiu. A continuació, s'aïlla el nervi

que es troba molt pròxim al cartílag. Després es posa el múscul a la camareta de registre, que és on es realitzaran els experiments (Figura 10). En el cas dels animals postnats, el nervi es succiona amb un elèctrode de succió, que serà a la vegada el d'estímul. En el cas dels LALs d'animals adults, en que el nervi és més gran i manipulable, aquest no es succiona sinó que es fixa per sobre dels dos elèctrodes de platí (el càtode positiu i el negatiu) incorporats a un extrem de la camareta, per on arriba l'estímul elèctric administrat. D'aquesta manera, quan el múscul es disposa i es fixa a la camareta de registre, s'ha de procurar que el nervi quedi per sobre d'aquests dos elèctrodes per després sellar el conjunt amb vaselina i evitar que hi hagi discontinuïtat.

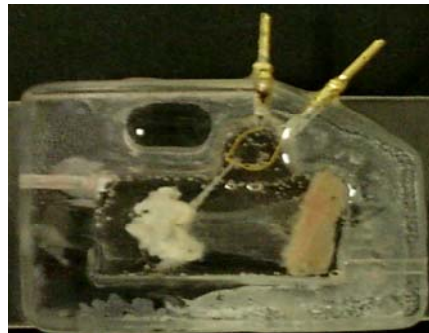


Figura 10. Camareta de registre

Abans de començar a enregistrar les fibres control, s'ha d'abolir la contracció muscular per tal d'evidenciar els potencials de placa evocats en comptes dels potencials d'acció, i també per a que l'elèctrode de registre no es trenqui i/o pugui lesionar la preparació. Per a tal fi, es poden fer servir dos procediments que afavoreixen el manteniment del potencial de membrana i permeten tenir millors potencials sinàptics espontanis i evocats. Per un costat s'utilitza la toxina μ -conotoxina GIIIB (μ -CgTx-GIIIB, 1-3 μ M), que bloqueja de manera selectiva els canals de Na^+ voltatge dependents musculars (1000 vegades més afinitat pels canals del múscul vers els del nervi), impeding la propagació del potencial d'acció i anul·lant la contracció muscular. Aquest procediment es fa servir tant en els experiments realitzats en adult

com en nadó. L'altre procediment és la tècnica del *cut* que consisteix en tallar les fibres musculars a costat i costat de la branca nerviosa intramuscular. Aquest mètode en el treball present, es fa servir únicament en el cas del nadó i a vegades es combina amb la μ -CgTx-GIIIB. Aquests dos procediments no presenten diferències ni interfereixen en els resultats obtinguts (resultats no mostrats).

Els experiments s'han realitzat a temperatura ambient 22-25 °C (23.4 °C \pm 1.7, Digital Thermometer TMP 812, Leica) i amb una humitat del 50% (vaporitzador convencional Chicco).

8.2 Equip d'electrofisiologia

L'equip d'electrofisiologia es mostra a la Figura 11 i consta de l'unitat estimuladora, l'amplificador, la unitat aïlladora, la taula digitalitzadora i el sistema informàtic (Axoscope 9.0). L'administració de l'estímul elèctric és fa mitjançant l'elèctrode de platí que està en contacte amb el nervi i en el cas del nadó per succió. La unitat estimuladora (CS-20, Cibertec Stimulator) està associada a la unitat d'aïllament d'estímuls i genera polsos de 1-10 Volts, a una freqüència entre 0.5 i 100 Hz i amb una durada de 0.1-0.2 ms. El voltatge a treballar en el cas del múscul adult ve determinat pel llindar d'estímul (intensitat d'estímul mínima per a crear activitat elèctrica en la preparació neuromuscular) multiplicat per 3, d'aquesta manera s'assegura que la totalitat de les fibres responen a l'estímul aplicat. En el cas del nadó es treballa amb el llindar propi de cada terminal nerviós (veure més endavant).

L'elèctrode de registre és un capil·lar de borosilicat (GC150F-10, Harvard Apparatus Ltd., diàmetre intern 0.86 mm, diàmetre extern 1.5 mm), que mitjançant un Puller (Narishige, Japó) s'escalfa i s'estira formant finalment dos elèctrodes de registre amb una punta fina de menys d'1 μ m de diàmetre i una resistència d'entre 20-70 M Ω , idònia per al registre intracel·lular. El seu interior s'omple amb KCl 3 M i va connectat a un amplificador diferencial (Tektronix, AM502) per tal d'amplificar la senyal 10 vegades. Les senyals elèctriques s'han filtrat en tots els casos. Per a la

neurotransmissió evocada han estat filtre inferior: 1 kHz i filtre superior: 1 Hz i per la neurotransmissió espontània filtre inferior: 0.2 KHz i filtre superior: 1 Hz.

L'elèctrode de referència es troba a una distància petita de la preparació, i connectat amb la solució del bany mitjançant un pont d'Agar (3.5 % d'Agar en 137 mM d'NaCl).

Les senyals enregistrades es digitalitzen (DIGIDATA 1300 Interface, Axon Instruments Inc.), s'emmagatzemen i analitzen amb el software Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc.) a l'ordinador.

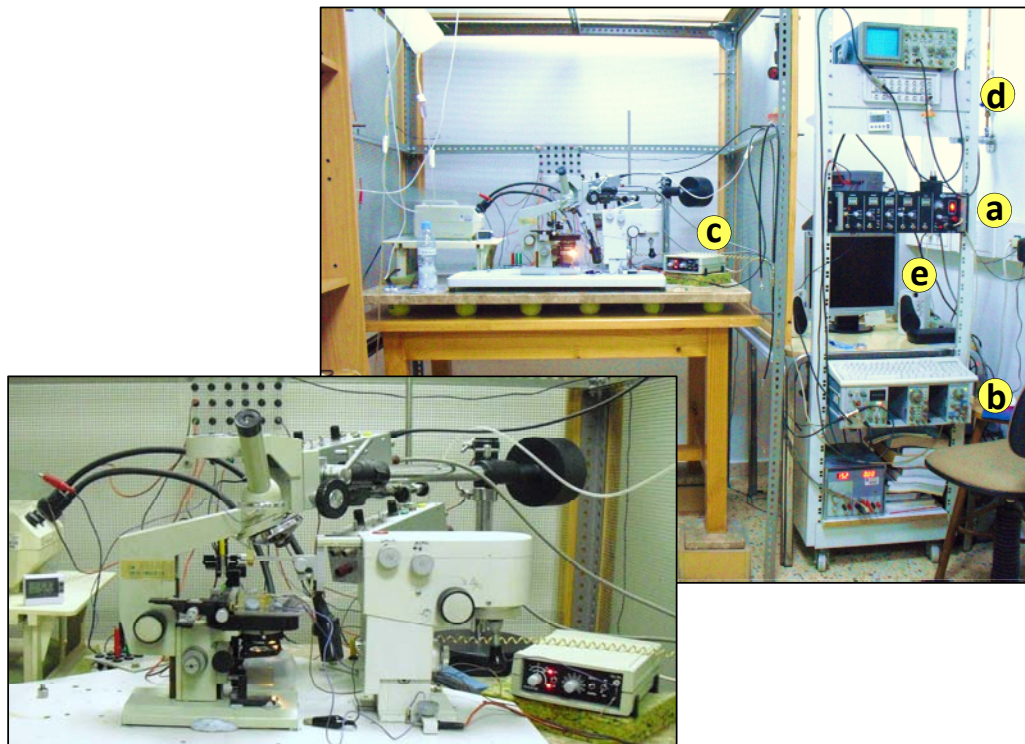


Figura 11. Equip bàsic d'electrofisiologia de registre intracel·lular. Elements bàsics d'un equip d'electrofisiologia. **a)** unitat estimuladora, **b)** amplificador, **c)** unitat aïlladora, **d)** taula digitalitzadora i **e)** sistema informàtic (Axoscope 9.0).

8.3 Registre de l'activitat sinàptica

8.3.1 Neurotransmissió evocada

La neurotransmissió evocada és aquella que sorgeix de l'administració artificial d'un estímul al nervi de la preparació neuromuscular i que es registra a nivell de la cèl·lula muscular postsinàptica. La resposta de la despolarització local de la membrana de la cèl·lula muscular és el potencial de placa evocat (EPP). Aquest event té una forma peculiar i és que si s'observa d'esquerra a dreta consisteix en la línia de base que presenta un pic de poca durada corresponent a l'artefacte d'estímul elèctric, i després d'un curt període de temps entre 1 i 2 ms, que s'anomena latència (fletxa blava, Figura 12) apareix una ona de major durada i amb una amplada que és l'EPP. L'amplada és la distància (en l'eix Y, mesurat en mVolts, fletxa vermella, Figura 12), des de la base fins al punt màxim i dona informació de l'eficàcia sinàptica. Algun canvi en la latència indica que s'estan produint canvis en la conducció de l'estímul.

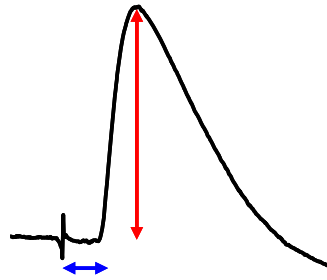


Figura 12. Potencial de placa evocat (EPP, de l'anglès *evoked endplate potencial*). La distància entre l'artefacte d'estímul que és la petita ona que apareix a l'inici, fins al principi de l'EPP s'anomena latència (fletxa blava). L'amplada de l'EPP és la distància entre la base i el pic de l'event (fletxa vermella).

Per assegurar que els registres es prenen pròxims a la placa motora, es té en compte el temps de pujada de l'EPP (distància des de la base on comença l'episodi fins

al punt més alt en milisegons), intentant que no superi en cap cas 1,5 ms en els músculs adults i no més de 5 ms en el cas dels nadons.

La metodologia emprada per a l'avaluació de la neurotransmissió evocada, presenta diferències de procediment entre els músculs d'animals neonats i adults. A continuació es detalla com es realitza en cada cas.

8.3.3.1 Sinapsi neuromuscular neonatal

En el cas dels nadons, a l'inici del desenvolupament, cada fibra es troba innervada per més d'un axó pel que poden aparèixer diferents EPPs en una mateixa fibra muscular. Quan s'introdueix l'elèctrode de registre a la fibra muscular, el nervi s'estimula a una intensitat creixent des de 0 fins que apareix un EPP. En el moment de seguir incrementant la intensitat d'estímul, poden donar-se dues situacions: pot ser que no s'evidenciï un canvi en la latència i/o l'amplada de l'EPP, pel que es posa de manifest que es tracta d'una fibra simple o mono-innervada (Figura 14f) o per altra banda, pot ser que la fibra estigui multi-innervada i que amb l'increment de la intensitat apareguin els EPPs restants (exemple sinapsi quíntuple de la Figura 13). Així doncs, existeixen diferents tipologies de sinapsis en funció del número d'axons que presenten i de com aquests es fan evidents en el registre electrofisiològic, és a dir si és necessari un increment en la intensitat de l'estímul per a que apareguin (sinapsi múltiple per diferència de llindar) o si apareixen amb petites variacions temporals (diferència de latència). També es pot donar la combinatòria d'aquestes dues situacions. En la Figura 13 es mostra l'evolució de l'aparició dels diferents EPPs d'una sinapsi quíntuple. Es parteix del primer EPP (EPP_I) i incrementant la intensitat apareixen el segon EPP (EPP_{II}) per sobre de l' EPP_I (diferència de llindar) i el tercer (EPP_{III}) i quart (EPP_{IV}) amb diferent latència. Si es segueix incrementant la intensitat apareix el cinquè EPP (EPP_V) per davant de l' EPP_I .

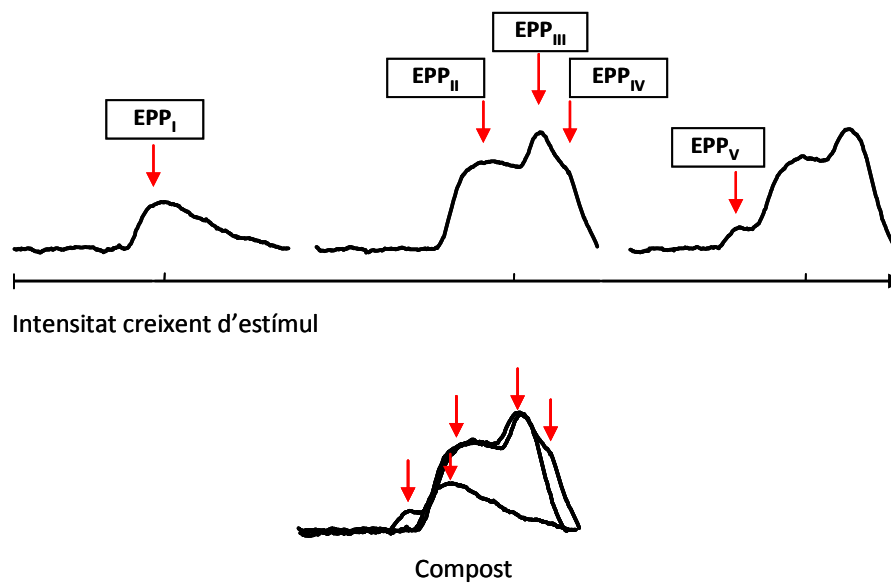


Figura 13. Exemple d'una fibra muscular innervada per cinc axons. En aquest exemple s'observa com amb l'increment de la intensitat de l'estímul van apareixen els diferents EPPs. L'EPP_I apareix el primer, l'EPP_{II} apareix per diferència de llindar superposat al primer. L'EPP_{III} i l'EPP_{IV} i l'EPP_V apareixen per diferència de llindar i latència.

En la Figura 14 es mostren exemples de sinapsis ordenades en el mateix sentit en que es dona l'eliminació sinàptica, de la poli-innervació a la mono-innervació. La Figura 14a mostra una sinapsi quàdruple que presenta diferències de llindar i latència. Les Figures 14b i 14c són dues sinapsis triples, la primera d'elles ho és per latència donat que els tres EPPs tenen el mateix llindar però apareixen amb una variació petita de temps. La segona en canvi ho és per llindar ja que cadascun dels tres EPPs presenta un llindar diferent. En el cas de les sinapsis doble-innervades, els dos EPPs poden presentar diferència de llindar, si és necessari l'increment de la intensitat d'estímul per a l'aparició de l'EPP del segon axó (Figura 14e). També poden presentar ambdues diferències (llindar i latència) de manera que un apareix poc després del primer amb l'increment de la intensitat (Figura 14d, Redfern, 1970). Aquest últim cas és el de més o menys, el 50% de les sinapsis multi-innervades. En la sinapsi doble, el segon EPP també pot aparèixer encavalcat al primer dibuixant registre semblant al de la Figura

14b, amb dos pics en comptes de tres. La situació final en l'eliminació sinàptica és la mono-innervació (Figura 14f).

En aquest treball i per claretat tècnica, s'ha estudiat la neurotransmissió valorant únicament les sinapsis simples i dobles, mentre que per als estudis dels índexs de poli-innervació, s'han valorat tots els tipus de sinapsis fins al màxim de quatre axons. En estudis previs no s'ha vist una relació entre l'amplada de l'EPP i el llindar de l'axó (Santafé i cols., 2001).

La neurotransmissió en el múscul LAL neonatal sovint presenta falles, té un contingut quàntic baix (Santafé et al., 2001) i per això, estímuls massa perllongats poden depleccionar les vesícules sinàptiques del terminal. Així, generalment s'aplica com a màxim un tren de 20 estímuls (0.5 Hz) i se'n registren els últims 10 episodis. Després es reposa durant tres minuts, abans d'aplicar un altre tren d'estímul. D'aquesta manera que s'acaba de descriure, s'avaluen les sinapsis simples. En el cas de les sinapsis doble-innervades es repeteix aquest procediment per a cadascun dels axons amb el seu llindar corresponent, obtenint així dos registres diferents. S'estudien 15 fibres per al control i 15 per a la situació problema per cada múscul, amb un mínim de 5 músculs en cada tipus d'experiment. També es realitzen experiments de fibra única on s'avalua l'efecte a temps real de la substància en una mateixa fibra, obtenint registres cada 15 minuts. Els registres s'analitzen únicament si el potencial de membrana supera els -15 mVolts en el cas dels músculs amb *cut* i els -30 mVolts en el cas de la utilització de la μ -CgTx-GIIIB (1.5-3 μ M) per abolir la contracció. Tanmateix, si en el transcurs de la gravació, el potencial de membrana disminueix més de 5 mVolts, el registre no s'incorpora en l'estudi.

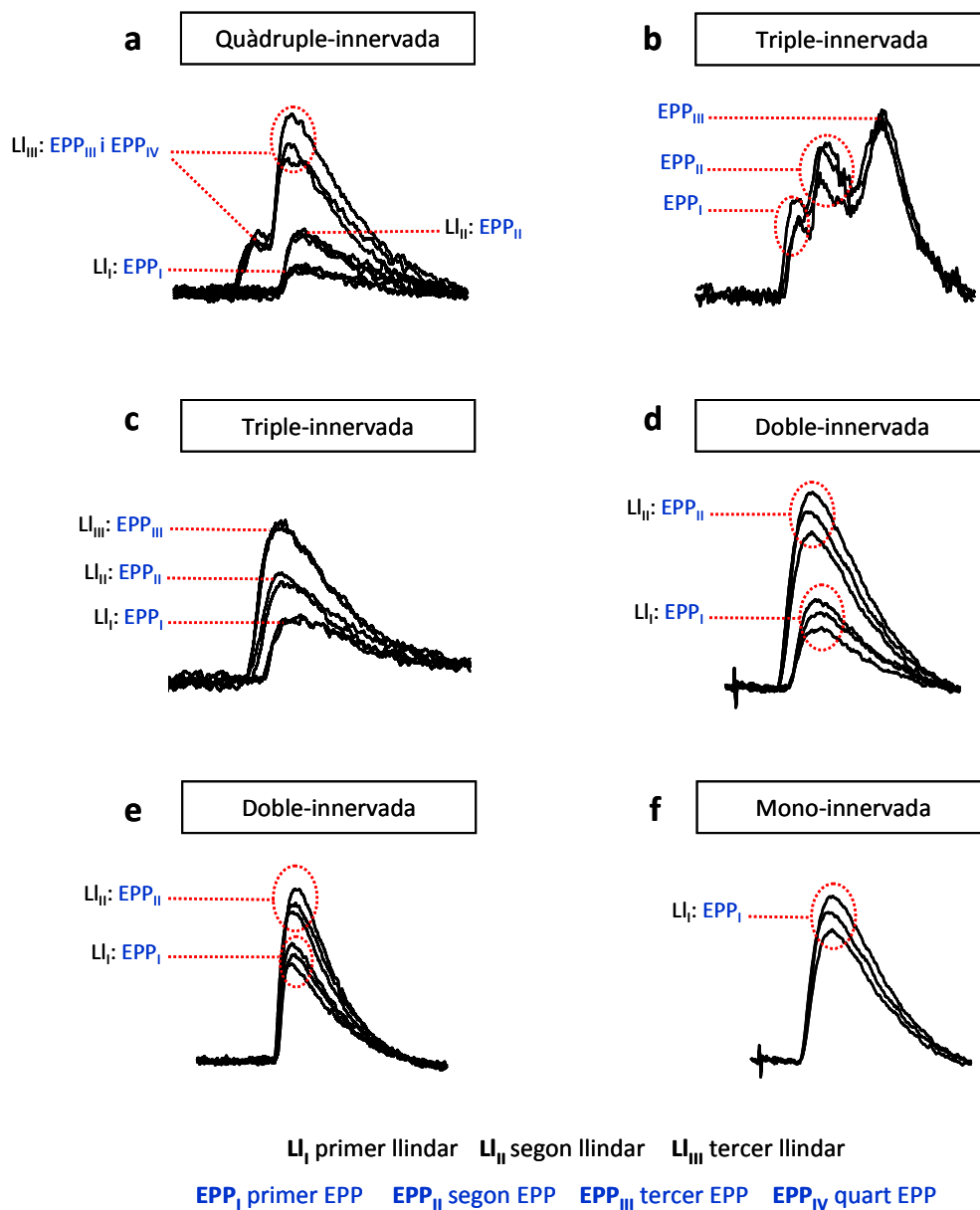


Figura 14. Exemples de registres electrofisiològics en músculs P6. **a)** Sinapsi quàdruple-innervada **b)** Sinapsi triple-innervada per latència **c)** Sinapsi triple-innervada per llinar **d)** Sinapsi doble-innervada per latència i llinar **e)** Sinapsi doble-innervada per llinar **f)** Sinapsi mono-innervada.

8.3.1.2 Sinapsi neuromuscular adulta

En alguns experiments també hem avaluat músculs adults. En el cas de la NMJ adulta, la contracció s'anul·la amb la utilització de la μ -CgTx-GIIIB (1-1.5 μ M) com ja

s'ha explicat. Una vegada s'ha introduït l'elèctrode de registre a la cèl·lula muscular, el paradigma d'estímul que s'aplica en aquest cas és de 70 estímuls a 0.5 Hz, dels que es registren únicament els últims 50 episodis. El potencial de membrana discriminador en l'adult són els -50 mVolts, per tant totes aquelles fibres amb potencials de membrana inferiors, no seran contemplades. A més a més, de la mateixa manera que amb el nadó, si durant el registre el potencial de membrana cau més de 5 mVolts, tampoc s'inclouran en l'estudi. També es realitzen experiments de fibra única on s'obtenen registres cada 15 minuts durant 120 minuts.

8.3.2 Neurotransmissió espontània

Amb la intenció de descartar un efecte postsinàptic de les substàncies químiques a avaluar en les condicions en les que es treballa, s'han avaluat els canvis en la neurotransmissió espontània. L'estudi dels mEPPs (potencials de placa miniatures espontanis) no necessita cap bloqueig de la contracció muscular ni l'activació del potencial d'acció axonal, ja que apareixen de manera espontània.

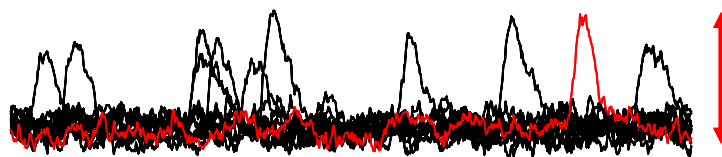


Figura 15. Exemples de potencials de placa miniatures espontanis (mEPP, de l'anglès *miniature endplate potential*). La fletxa vermella indica l'amplada d'un dels mEPPs.

Per al registre de l'activitat espontània, s'introdueix l'elèctrode de registre a la cèl·lula muscular i s'enregistren tots els episodis que apareixen durant un minut, o fins que s'adquireixin 100 episodis. Un exemple d'aquest tipus de registre es mostra en la Figura 15. Es tenen en compte diferents paràmetres a l'hora d'analitzar-los, com la

freqüència d'aparició, el temps de pujada i l'amplada. Aquests dos últims valors s'obtenen seguint el mateix procediment que per calcular-los en l'EPP. Una variació en la freqüència dels mEPPs evidencia una afectació a nivell del terminal nerviós, com podria ser la disponibilitat de les vesícules contenedores de l'ACh. Pel contrari, variacions en l'amplada mostren una afectació a nivell del component postsinàptic, com pot ser el temps d'obertura dels canals postsinàptics, o el número de nAChRs disponibles. En el model utilitzat en aquesta tesi, es descarta sempre l'afectació postsinàptica de les substàncies amb les que es treballa, ja que l'objectiu d'estudi es restringeix a nivell del component presinàptic.

Com succeeix amb la metodologia empleada per a l'avaluació de la neurotransmissió evocada, per a l'espontània també hi ha diferències de procediment entre els músculs d'animals neonatals i adults.

8.3.2.1 Sinapsi neuromuscular neonatal

Així com els músculs dels animals adults, presenten neurotransmissió espontània per si sols amb una freqüència alta, en el nadó no és d'aquesta manera, ja que la freqüència d'aparició que presenten és d'un episodi per minut aproximadament i una amplada que oscil·la entre 0.5-5 mVolts. La freqüència s'ha incrementat afegint CLK (20-30 mM) al bany, aconseguint una freqüència semblant a la de l'adult. No s'ha discriminat si la fibra registrada en cada moment és simple o doble. Per a registrar la freqüència dels mEPPs, s'han fet servir temps superiors a 1 minut, fins que s'han obtingut més de 100 mEPPs per fibra.

8.3.2.2 Sinapsi neuromuscular adulta

En el múscul adult, la neurotransmissió espontània té una freqüència aproximada de 60 episodis per minut i una amplada mitjana 0.5 mVolts. S'introdueix

l'elèctrode de registre i es graven els diferents episodis durant un minut o fins que s'arriben a adquirir 100 episodis. Després es calculen i comparen les amplades, els temps de pujada i la freqüència entre els registres control i els problema.

8.4 Paràmetres avaluats en els experiments funcionals

8.4.1 Amplada dels potencials de placa evocats

Com ja s'ha dit més amunt, l'amplada de l'EPP és la distància entre la línia base i el punt més alt de l'episodi (Figura 12). En els animals adults, l'amplada de l'EPP pot arribar fins a 30-40 mVolts mentre que en el nadó i en les nostres condicions de treball, no acostuma a fer més de 8 mVolts.

Aquesta variable aporta informació quantificable, com l'efectivitat en l'alliberament del neurotransmissor. D'aquesta manera, un increment en l'amplada de l'EPP s'atribuirà a una potenciació de l'alliberació, mentre que una disminució de l'amplada estarà evidenciant una disminució en l'alliberament de l'ACh, i per tant una disminució de l'eficàcia sinàptica.

Així com en els músculs adults i en les sinapsis simples del nadó, l'amplada en el cas de les fibres doble-innervades, es calcula mesurant la distància entre el pic i la base, on l'EPP compost sorgeix del reclutament de dos axons que presenten la mateixa latència, l'amplada del segon EPP es calcula restant l'amplada del primer EPP respecte del compost (Figura 16).

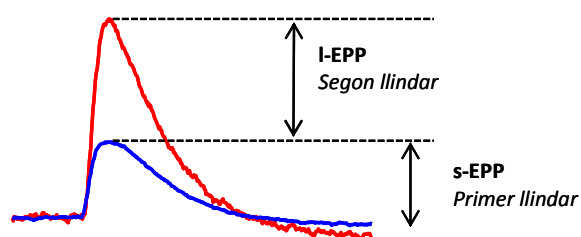


Figura 16. Càlcul de les amplades de la sinapsi doblement innervada. En blau es mostra l'EPP que apareix primer amb el llindar més baix i en vermell l'EPP compost que apareix amb el segon llindar. L'EPP del terminal dèbil, és el potencial de placa evocat que té l'amplada més petita i l'EPP del terminal fort, és el que té l'amplada més gran. La situació inversa es dona únicament en un 3% dels casos.

D'aquesta manera s'obtenen dues amplades de valors diferents, que es designen com a s-EPP (*small-EPP*) o dèbil el que té l'amplada més petita, i l-EPP (*large-EPP*) o fort el que té l'amplada més gran (Santafé i cols., 2001), independentment de l'ordre d'aparició i el llinard que tenen. Si la fibra presenta falles, es considera que tenen una amplada de 0 mVolts. Observant la Figura 16, cal dir que l'EPP que apareix amb el llinard petit no té perquè ser el de l'amplada petita com es mostra en aquesta exemple.

En el cas del múscul adult, la mitjana de l'amplada (mVolts) de cada fibra s'ha calculat pel mètode de la sumació no lineal (McLachlan i Martin, 1981) assumint en aquest cas un potencial de membrana de -80 mVolts. Generalment, s'han estudiat 5 músculs com a mínim en cada experiment, 15 fibres en el registre control i 15 en el registre problema.

Així, la mitjana de l'amplada pel mètode de sumació no lineal s'ha calculat:

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

On:

$$V_{m_0} = V_{epp} / \{ (V_{m_i} - V_{m_r}) / (V_m - V_{m_r}) \}$$

V_{epp} : amplada mitjana de l'EPP enregistrat

V_{m_i} : potencial de membrana assumit en -45 mVolts (nadó) o -80 mVolts (adult)

V_{m_r} : potencial de reversió de l'acetilcolina assumit en -15 mVolts

V_m : potencial de membrana registrat

En el múscul postnatal, la mitjana de l'amplada (mVolts) per a cada fibra també s'ha calculat pel mètode de la sumació no lineal (McLachlan i Martin, 1981), però en aquest cas s'ha assumit un potencial de membrana de -45 mVolts.

8.4.2 Amplada dels potencials de placa espontanis

L'amplada dels mEPPs, donen informació de canvis a nivell del component postsinàptic com podrien ser el número de nAChRs disponibles a la membrana de la fibra muscular o la cinètica d'aquests canals. L'amplada dels mEPPs s'ha calculat de la mateixa manera que l'amplada dels EPPs, i també s'ha corregit assumint un potencial de membrana de -45 mVolts, pel mètode de la sumació no lineal (McLachlan i Martin, 1981).

8.4.3 Freqüència dels potencials de placa espontanis

La freqüència dels mEPPs, dona informació de canvis a nivell del component presinàptic com podrien ser el número de vesícules d'ACh disponibles per a ser alliberades. Cada fibra s'enregistra durant un minut, i si no ha assolit els 100 episodis, s'allarga el temps fins que aquests s'obtenen.

8.4.4 Contingut quàntic

El contingut quàntic és el número de quantes o vesícules sinàptiques alliberades per impuls nerviós. La mitjana del contingut quàntic (m) de la resposta evocada, s'ha avaluat pel mètode directe, i s'ha calculat mitjançant l'obtenció de la ratio entre l'amplada mitjana dels EPPs de cada fibra i l'amplada mitjana dels mEPPs de la mateixa fibra:

$$m = \bar{x} \text{ EPPs} / \bar{x} \text{ mEPPs}$$

8.4.5 Índex de poli-innervació

En l'estudi de l'Índex de poli-innervació (PI de l'anglès *polyinnervation index*), s'obté un valor a partir del número de sinapsis simples, dobles, triples i quàdruples registrades. En un estudi de PI, es recorren els 5 feixos del múscul, i s'anota de quin tipus de sinapsi es tracta. A les sinapsis simples se'ls dona el valor d'1, a les dobles de 2, a les triples de 3 i a les quàdruples de 4. Després es calcula la mitjana del total obtenint un valor entre 1 i 4. Per exemple si totes les sinapsis fossin simples s'obtindria un 1 i si totes fossin quàdruples un 4. La interpretació d'aquest paràmetre es fa de la següent manera: si aquest valor en una situació problema incrementa respecte el valor inicial, significa que la substància testada, ha provocat un reclutament de sinapsis silents donat que ha incrementat el número de sinapsis multi-innervades. Pel contrari si, el valor es fa petit significa que aquesta substància afavoreix o accelera el procés d'eliminació sinàptica, donat que ha incrementat el número de sinapsis amb menys axons per la desconexió de sinapsis existents.

8.4.6 Percentatges de les plaques motores segons el número d'axons per fibra muscular

Un altre paràmetre que s'ha avaluat relacionat amb el PI, son els percentatges de les NMJ en funció del número d'axons per fibra muscular. Per a realitzar aquests perfils, es fa un comptatge com en el PI, calculant després els tants per cents de cada tipus de sinapsi (simple, doble, etc...). El que permeten aquestes distribucions, es visualitzar quin és l'efecte de la substància testada en els diferents tipus de sinapsis.

8.4.7 Potencial de membrana

El control del potencial de membrana (PM) es realitza durant l'enregistrament dels episodis control i problema. Es procura que no caigui el valor més de 5 mVolts, i de ser així es desestima la fibra. A més a més, es compara la mitjana del PM entre el grup control i problema per veure si hi ha hagut variacions. Una caiguda després del tractament amb la substància d'interès, podria significar que s'ha degradat la mostra i que les membranes del miòcit estan en mal estat.

8.5 Substàncies utilitzades en la metodologia electrofisiològica

Solució Ringer: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 12 mM, Na₂HPO₄ 1 mM i glucosa 11mM. Bombolleig constant amb un 95% d'O₂ i un 5% de CO₂.

Les substàncies utilitzades en aquest apartat d'experiments funcionals, s'indiquen a la Taula 7:

Substància	Concentració	Casa comercial
Dimetil Sulfoxid (DMSO)	màxim 0.1%	Sigma
μ-conotoxina-GIIIB (μ-CgTx-GIIIB)	Solució stock: 300 μM en Ringer normal Solució de treball: 1-3 μM	Alomone Labs
Calfosteina C (CaC)	Solució stock: 2.5 mM en DMSO Solució de treball: 1 μM	Sigma
Nitrendipina	Solució stock: 50 mM en DMSO. Solució de treball: 1 μM Experiments realitzats en absència d'il·luminació	Research Biochemicals Inc
h-BDNF (<i>human brain derived neurotrophic factor</i>)	Solució stock: 0.37 μM en aigua bidestil·lada Solució de treball: 10 - 50 nM	Alomone Labs
h-NT-4 (<i>human neurotrophin-4</i>)	Solució stock: 4 μM (10000 ng/ml) en aigua bidestil·lada Solució de treball: 2- 8 nM (50 -200 ng/ml)	Alomone Labs
h-NT-3 (<i>human neurotrophin-3</i>)	Solució stock: 100 μM en aigua bidestil·lada Solució de treball: 10 -200 nM.	Alomone Labs
K-252a	Solució stock: 5 mM en DMSO. Solució de treball: 200 nM Experiments realitzats en absència d'il·luminació	Calbiochem (Merck)
Químera TrkB-Fc (Proteïna humana de fusió TrkB-IgG)	Solució de treball: 1 μg/ml	R & D Systems
Anticòs contra-p75-192-IgG	Solució de treball: 5 μg/ml	Chemicon
Magnesi	Solució de treball: 500 μM dissolt en Ringer normal	Sigma

Taula 7. Llistat de substàncies utilitzades en els experiments funcionals.

9. ESTADÍSTICA

En els experiments electrofisiològics, els valors s'han expressat com la mitjana \pm error estàndard de la mitjana (S.E.M.). S'ha utilitzat l'anàlisi de la variància (ANOVA) per avaluar les diferències entre grups i el test de Bonferroni per fer comparacions múltiples. Per avaluar diferències entre dos grups, s'ha utilitzat el test t de Welch de dues cues (per dades no aparellades i assumint variàncies no iguals). Les diferències s'han considerat significatives per a $p < 0.05$.

VI- RESULTATS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

1. EXPRESSIÓ DE LES NEUROTROFINES (BDNF, NT-4 i NT-3) I ELS SEUS RECEPTORS (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC LAL

Amb la finalitat de conèixer i provar la possible presència de les diferents NTs: BDNF, NT-4 i NT-3 com també els seus receptors: TrkB, TrkC i p75^{NTR}, s'ha utilitzat la tècnica de detecció de proteïnes Western blot (per a més informació veure l'apartat 4. *Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot* a Material i Mètodes). S'han utilitzat diferents homogeneïtzats, de medul·la i cervell d'animals neonatals i de múscul LAL d'animals neonats i adults.

Aquest anàlisi per Western blot també ha permès testar l'especificitat dels diferents anticossos, per a d'utilitzar-los després amb tota seguretat en l'immunomarcatge (mitjançant la IHQ) de les diferents proteïnes i localitzar en quin o quins dels tres components que conformen la unió neuromuscular es situen.

Tot i que l'objectiu principal d'aquesta tesi és l'estudi de la implicació de les neurotrofines en el període d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament postnatal, s'ha estudiat també l'expressió d'aquestes proteïnes en animals adults.

1.1 Expressió de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3

1.1.1 Expressió del BDNF

Per tal de conèixer l'expressió del BDNF en el múscul LAL s'ha utilitzat l'anticòs policlonal de conill contra BDNF (N-20: sc-546, Santa Cruz). S'ha vist immunoreactivitat per a dues bandes en els quatre tipus de mostra, el múscul neonatal i l'adult i en els dos controls positius (medul·la i cervell d'animals neonats). Una banda és de 30 kDa, la posició de la qual coincideix amb el pes molecular predit pel precursor del BDNF i una

altra de 14 kDa corresponent al BDNF madur (Figura 17). Per tant, es pot afirmar que l'anticòs és específic per aquesta proteïna i que la neurotrofina es troba en els músculs en desenvolupament i en els madurs.

1.1.2 Expressió de l'NT-4

Per a l'NT-4, s'ha utilitzat l'anticòs policlonal de conill contra NT-4 (AB1781, Chemicon), i com es mostra a la Figura 17 s'ha detectat una banda específica en les quatre mostres testades. El pes molecular és de 14 kDa, que correspon amb el pes molecular predit per aquesta proteïna. Així, l'anticòs usat, és específic per a aquesta proteïna que es troba present en el múscul neonatal i adult.

1.1.3 Expressió de l'NT-3

En el cas de l'NT-3, s'ha fet servir l'anticòs policlonal de conill contra NT-3 (ANT-003, Alomone Labs). Els resultats obtinguts mitjançant el Western blot es mostren a la Figura 17, on s'evidencia la detecció d'una banda en cadascun dels llisats utilitzats amb un pes molecular de 14 kDa, que es correspon amb el pes molecular pronosticat per a l'NT-3; per tant, mitjançant aquest anticòs específic per a aquesta NT, s'evidencia la seva presència en els músculs en desenvolupament i madurs.

1.2 Expressió dels receptors de les neurotrofines TrkB, TrkC i p75^{NTR}

1.2.1 Expressió del receptor TrkB

Utilitzant l'anticòs policlonal de conill contra TrkB (H-181: sc-8316, Santa Cruz), s'han detectat dues bandes clarament diferenciades en els quatre llisats utilitzats

(múscul d'animal neonatal i adult, medul·la i cervell d'animals neonatals) com es mostra en la Figura 17: una de 145 kDa coincident amb el pes predit per la isoforma sencera del TrkB i una altra de 95 kDa corresponent a la isoforma segmentada del receptor. Així doncs, el receptor TrkB és present en el teixit muscular neonatal i madur en les dues isoformes existents.

1.2.2 Expressió del receptor TrkC

Per al receptor TrkC s'ha utilitzat l'anticòs policlonal de conill contra TrkC (AB9834, Millipore), que ha reaccionat amb una única banda de 140 kDa en els quatre llistats testats (Figura 17). Aquesta banda de 140 kDa, té el pes molecular esperat per a aquesta proteïna, per tant es posa de manifest l'especificitat de l'anticòs utilitzat i la presència d'aquest receptor en el teixit muscular immadur i adult.

1.2.3 Expressió del receptor p75^{NTR}

En el cas del receptor p75^{NTR}, amb l'anticòs policlonal de cabra contra p75^{NTR} (C-20: sc-188, Santa Cruz) ha reaccionat amb una única banda de 75 kDa, present a les quatre mostres testades (medul·la i cervell P6, múscul P6 i P30 (Figura 17). Aquestes bandes de 75 kDa són equivalents al pes molecular predit per aquesta proteïna. Es confirma doncs l'especificitat de l'anticòs i la presència del receptor en el múscul de neonat i d'adult, com també en els homogeneïtzats de cervell i medul·la com a controls positius.

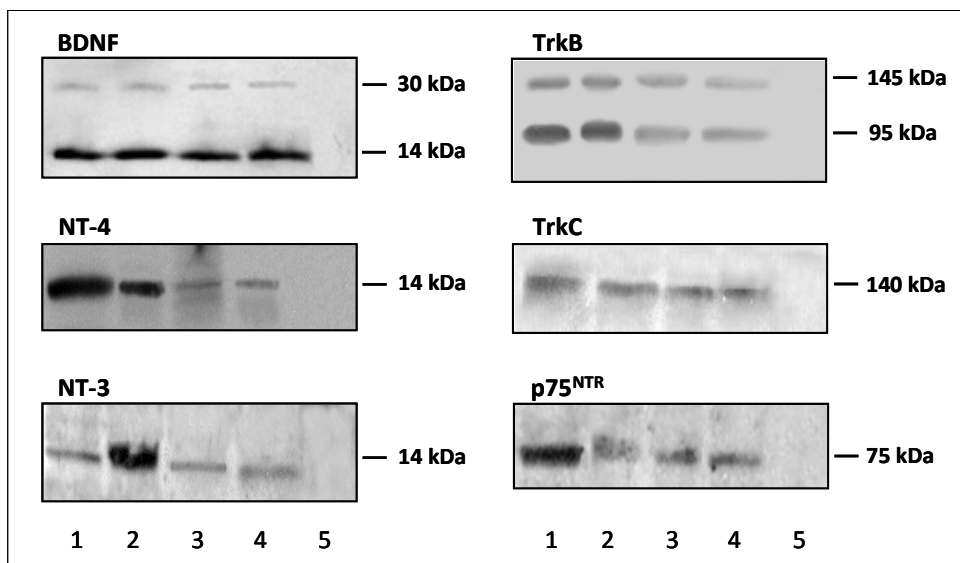


Figura 17. Western blots de les diferents neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i dels receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR}. Mitjançant els anticossos descrits, s'han detectat les bandes corresponents amb els pesos moleculars predits per les diferents proteïnes d'interès. Carrils **1)** medul·la d'animal P6 **2)** cervell d'animal P6 **3)** múscul LAL d'animal P6 **4)** múscul LAL d'animal P30 **5)** Control negatiu en el que s'ha omès la incubació amb l'anticòs primari i s'ha incubat el secundari. La quantitat total de proteïna ha estat de 100 µg per a totes les neurotrofines i receptors menys en el cas del BDNF que s'ha carregat 50 µg de proteïna de cervell i medul·la.

Per tant, mitjançant el Western blot, es posa de manifest la presència de les tres NTs i els seus receptors en els teixits musculars neonatal i adult. També s'ha confirmat l'especificitat dels anticossos primaris per a les NTs i els seus receptors.

2. LOCALITZACIÓ DE LES NEUROTROFINES (BDNF, NT-4 i NT-3) I ELS SEUS RECEPTORS (TrkB, TrkC i p75^{NTR}) EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC LAL

Conèixer la localització específica subcel·lular de les NTs i els seus receptors en els elements pre i postsinàptics i en la cèl·lula glial, és crucial per determinar la funció d'aquestes proteïnes. Fins ara, en pocs estudis s'ha descrit la localització de les NTs i els seus receptors en el sistema muscular esquelètic, i menys de manera precisa i concreta en la NMJ. És per això que un dels objectius principals en aquesta tesi, és la descripció de la distribució precisa de les NTs BDNF, NT-4 i NT-3 i els seus receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} a la NMJ del múscul LAL d'animals neonatals i adults, utilitzant la tècnica d'IHQ convencional i per seccions semifines per fluorescència. Per a dur a terme aquest objectiu, s'han utilitzat els mateixos anticossos primaris per les NTs i els seus receptors, que en la tècnica de Western blot. Després per a detectar-los, s'han fet servir marcadors fluorescents (veure procediment a l'apartat 5 de *Material i Mètodes*). Conjuntament amb els anticossos primaris de les NTs i receptors, s'han utilitzat els anticossos primaris, específics de proteïnes que es troben en els diferents tipus cel·lulars de la NMJ. Aquestes proteïnes són la syntaxina, per a detectar el terminal nerviós i l'S-100, com a marcador de la cèl·lula de Schwann (CS). També s'ha utilitzat l' α -BTX conjugada a un fluorocrom com a marcador dels nAChRs postsinàptics. Això permet, en el model utilitzat (múscul LAL) i mitjançant la microscòpia làser confocal, localitzar on es situen les diferents proteïnes en els tres components cel·lulars que conformen la NMJ, és a dir, determinar si es troben al terminal nerviós, a la cèl·lula muscular postsinàptica o la CS.

A més de la tècnica d'IHQ, en els casos en els que ha estat necessari s'ha ampliat l'estudi utilitzant la tècnica d'obtenció de talls semifins (TS), a partir de les mostres processades per IHQ i incloses en resina Spurr. Aquesta tècnica ha permès d'una manera simple i molt sensible l'anàlisi de les molècules de la NMJ, incrementant la resolució i precisió en l'anàlisi de la distribució específica cel·lular i subcel·lular de les

diferents NTs i dels seus receptors. Per a la realització d'aquestes dues tècniques, s'ha treballat amb músculs LAL d'animals P6-P7 i P30-P45.

S'han realitzat diferents controls negatius per tal d'assegurar que no hi ha marca inespecífica per part dels anticossos secundaris utilitzats o creuaments no desitjats (aquests resultats s'han presentat en les làmines de les Figures 7 i 9 de l'apartat de Material i mètodes, pàgines 69 i 74). El marcatge obtingut per a cada NT i receptor ha estat diferent per cada anticòs utilitzat i es detalla a continuació.

En cadascuna de les figures de les localitzacions de les NTs i els seus receptors, s'ha adjuntat un esquema resumint en quines àrees de les tres cèl·lules que conformen la NMJ, es localitzen aquests. En el dibuix del tall semifí de l'esquerra es recorda cada vegada, en quines parts s'han dividit els tres components de la NMJ, i al dibuix de la dreta es mostra el mateix esquema, amb les àrees acolorides corresponents a la localització positiva de la proteïna d'interès. Amb la intenció de clarificar, cal dir que el codi de colors emprats per acolorir les àrees positives, s'han mantingut independentment del fluorocrom que s'ha fet servir en cada IHQ.

2.1 Localització de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3

2.1.1 Localització del BDNF

S'ha realitzat un triple marcatge en LALs P6 del BDNF (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau). Els resultats permeten veure com el BDNF es localitza a l'àrea sinàptica de la NMJ neonatal. Les fletxes roses senyalen la marca del BDNF a la cèl·lula muscular; concretament, a la part extrasinàptica de la sinapsi vista lateralment (Figura 18A) i en l'altra amb vista frontal (Figura 18B). En el cas dels TSs mostrats, s'observa la localització del BDNF en el component postsinàptic per sota dels nAChRs com indica la fletxa rosa en la imatge co-localitzada 18D.

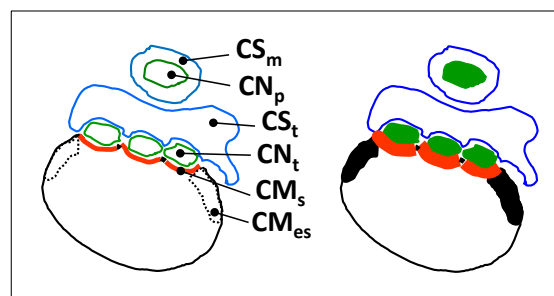
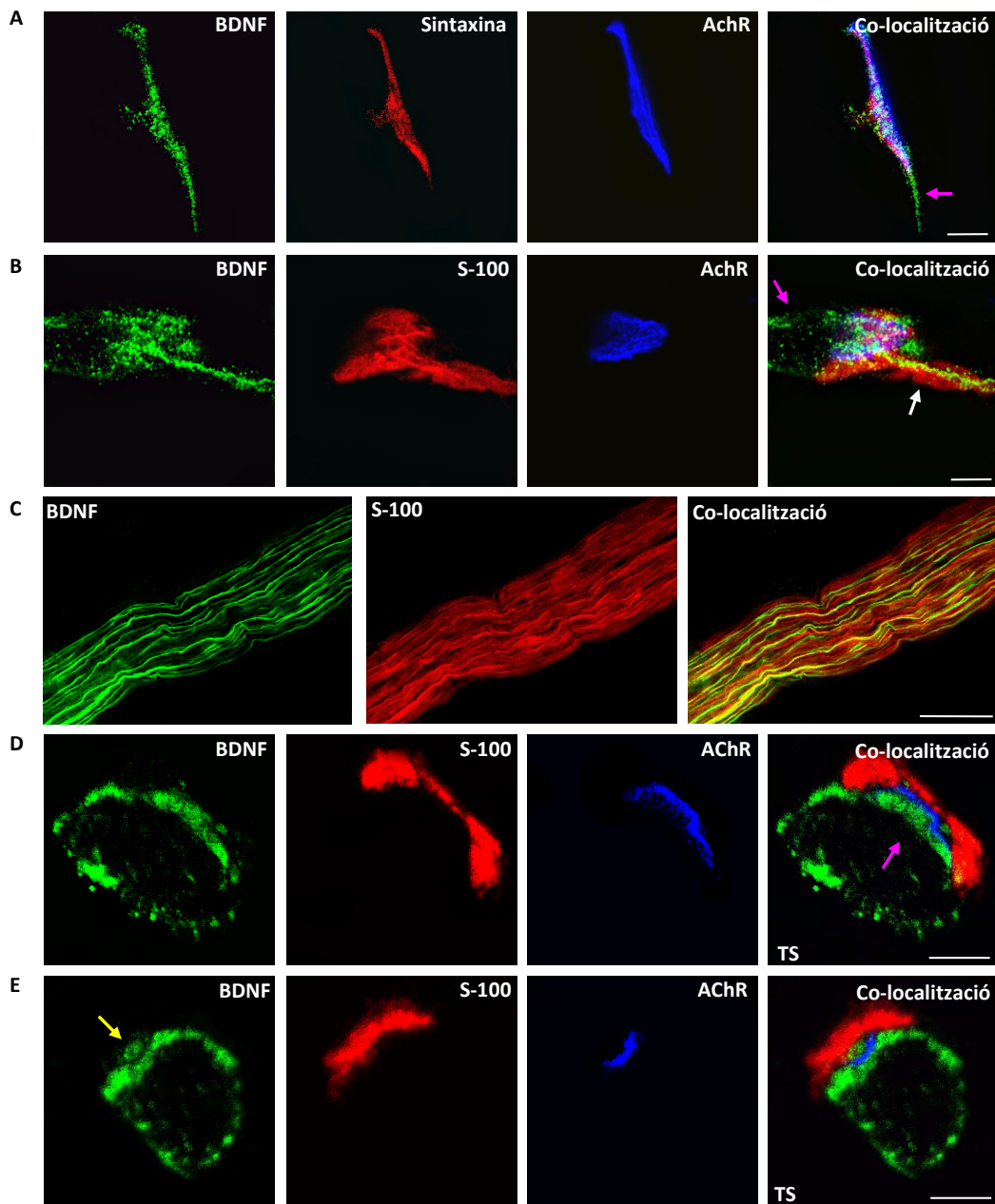


Figura 18. Triple marcatge del BDNF (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P6. El BDNF es localitza a l'àrea sinàptica de la NMJ neonatal. Les fletxes roses senyalen la marca del BDNF a la part extrasinàptica de la sinapsi vista lateralment (18A) i en l'altra amb vista frontal (18B). En el cas dels TSs mostrats, s'observa BDNF per sota dels nAChRs (fletxa rosa en la imatge co-localitzada 18D). La marca del BDNF coincideix fortament amb la marca de la syntaxina, corresponent a l'axó terminal (fletxa blanca 18B), al preterminal i terminal nerviosos (18A) i en el botó sinàptic (fletxa groga co-localitzada 18E). Els dos TSs mostren clarament que no hi ha co-localització entre la marca del BDNF i la cèl·lula glial. En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el BDNF en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10µm.

La marca del BDNF coincideix fortament amb la marca de la syntaxina, corresponent al preterminal i terminal nerviosos (Figura 18A). Observant la Figura 18E de TS s'aprecia que l'espai entre la CS teloglial i els nAChRs també és BDNF positiu, el que indica la presència de la NT al botó sinàptic (fletxa groga). Ara bé, en la imatge 18B quan la distribució del BDNF es compara amb la de l'S-100 (marcador de la CS), les zones positives no es superposen, sinó que la marca de l'S-100 de color vermell envolta la marca verda filiforme del BDNF corresponent a l'axó preterminal (fletxa blanca, Figura 18B). La Figura 18C presenta la visió d'un tronc nerviós intramuscular on s'ha marcat el BDNF amb l'S-100 i s'observa immunoreactivitat del BDNF als axons però no a la cèl·lula mielinogènica del tronc nerviós intramuscular. En quant a la CS teloglial, els dos TSs mostren clarament que no hi ha co-localització entre la marca del BDNF i la cèl·lula glial. Per tant, veient les imatges obtingudes, s'arriba a la conclusió que el BDNF es troba present en el component presinàptic i postsinàptic de la NMJ neonatal.

En la NMJ adulta, el triple marcatge s'ha fet amb syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell). Les diferents imatges evidencien que el BDNF (en verd) es troba a la fibra muscular, tant a l'àrea sinàptica com extrasinàptica. Concretament a la imatge 19A, la fletxa rosa assenyala marca subsarcolèmica d'un miòcit veí i a la 19B la fletxa rosa indica la marca muscular extrasinàptica. La imatge 19D del TS mostra que en el sarcoplasma postsinàptic hi ha una forta marca molt definida i que penetra en els plecs sinàptics (fletxes roses a la imatge co-localitzada 19D). L'àrea dels nAChRs també és positiva pel BDNF tal i com mostra la fletxa blava a la imatge 19D, on s'aprecia una bona correspondència entre la marca positiva de BDNF (en verd) i la marca vermella dels nAChRs. La immunofluorescència en els TSs, mostra com el BDNF quan és co-localitza amb la syntaxina, es situa en la part central dels terminals nerviosos syntaxina-positius sense ocupar la totalitat de l'àrea (19D). A més, quan se'l co-localitza amb l'S-100 ocupa també part de l'espai corresponent al terminal nerviós comprès entre la CS teloglial (que és S-100-positiva) i la membrana postsinàptica rica en nAChRs (fletxa groga a la imatge co-localitzada 19E). En aquesta mateixa imatge, s'observa una marca intensa de BDNF per sota els nAChRs corresponent a la fibra muscular (fletxa rosa) i una altra de més granular i més fina per sobre el terminal nerviós que coincideix amb la CS teloglial. Així doncs, pel que fa a la placa motora adulta s'evidencia una presència del BDNF més notable en el component pre- i postsinàptic, mentre que en la CS és menys notòria.

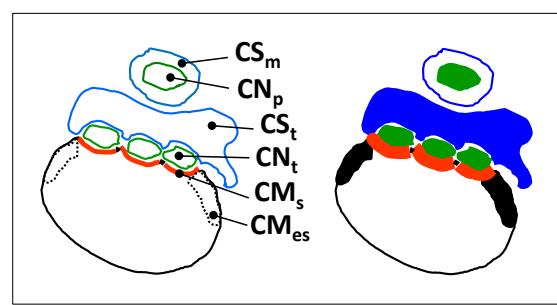
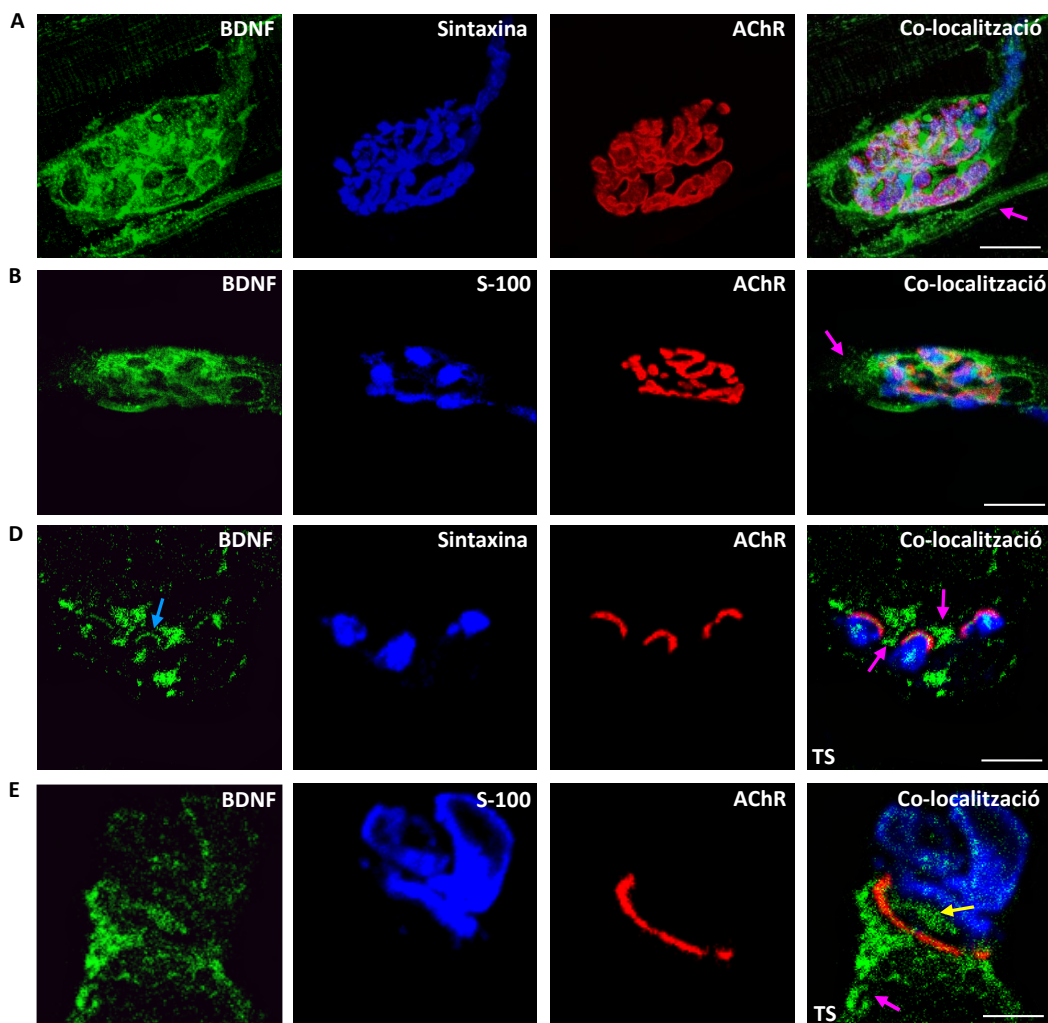


Figura 19. Triple marcatge del BDNF (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs P30. S'observa marca subsarcolèmica d'un miòcit veí (la fletxa rosa 19A), marca muscular extrasinàptica (fletxa rosa 19B), una forta marca que penetra en els plecs sinàptics (fletxes roses 19D) i en la membrana dels nAChRs (fletxa blava 19D). El BDNF es troba en la part central dels terminals nerviosos syntaxina-positius sense ocupar la totalitat de l'àrea (19D), ocupant la part de l'espai corresponent al terminal nerviós comprès entre la CS (que és S-100-positiva) i la membrana postsinàptica rica en nAChRs (fletxa groga

19E). En els TS 19E s'observa marca corresponent a la fibra muscular (fletxa rosa) i una altra més granular que coincideix amb la CS teloglial. En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el BDNF en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

2.1.2 Localització de l'NT-4

En les Figures 20A i 20B, es presenten les imatges obtingudes per IHQ convencional i en la Figura 20C una IHQ processada per TS, per a l'NT-4 en múscul LAL P6. S'ha combinat el marcatge de l'NT-4 (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell). La immunoreactivitat de l'NT-4 coincideix amb l'àrea sinàptica (Figura 20A). La senyal de l'NT-4 es correspon amb la marca poc definida que mostra la syntaxina en els primers estadis de desenvolupament, pel que es pot afirmar que l'NT-4 es troba en el terminal nerviós presinàptic (Figura 20A, fletxa groga) i en el recorregut axonal (Figura 20B, fletxa groga). A la imatge en verd de la Figura 20B s'observa un granulat molt fi i tènue que pot correspondre a una marca muscular extrasinàptica (fletxa rosa). En la imatge obtinguda del TS (Figura 20C) es pot apreciar com l'NT-4 no es troba en la CS teloglial, ja que la marca en blau que queda per sobre dels botons sinàptics no presenta immunoreactivitat en verd. També es pot observar marca verda per sota dels nAChRs en l'àrea muscular subsinàptica. Aparentment doncs, l'NT-4 està present a la NMJ neonatal, concretament en el recorregut axonal i el terminal nerviós i a la cèl·lula muscular subsinàptica i extrasinàptica.

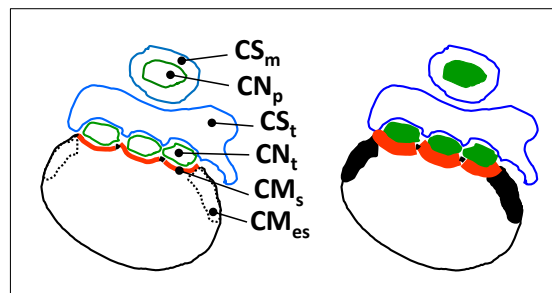
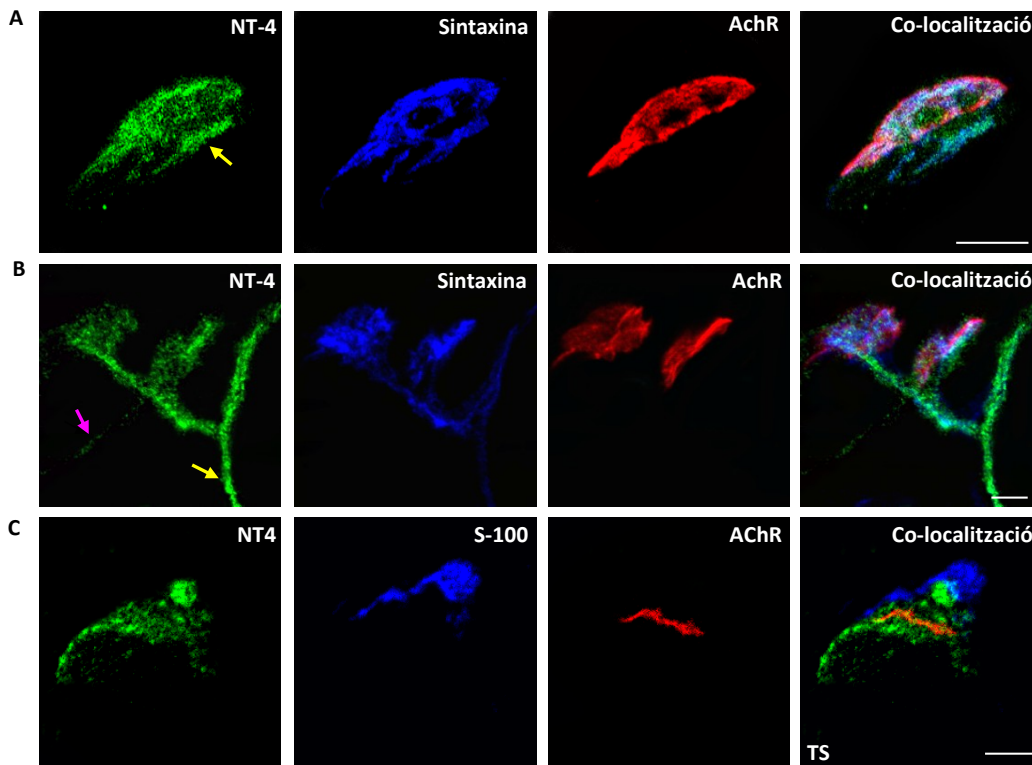
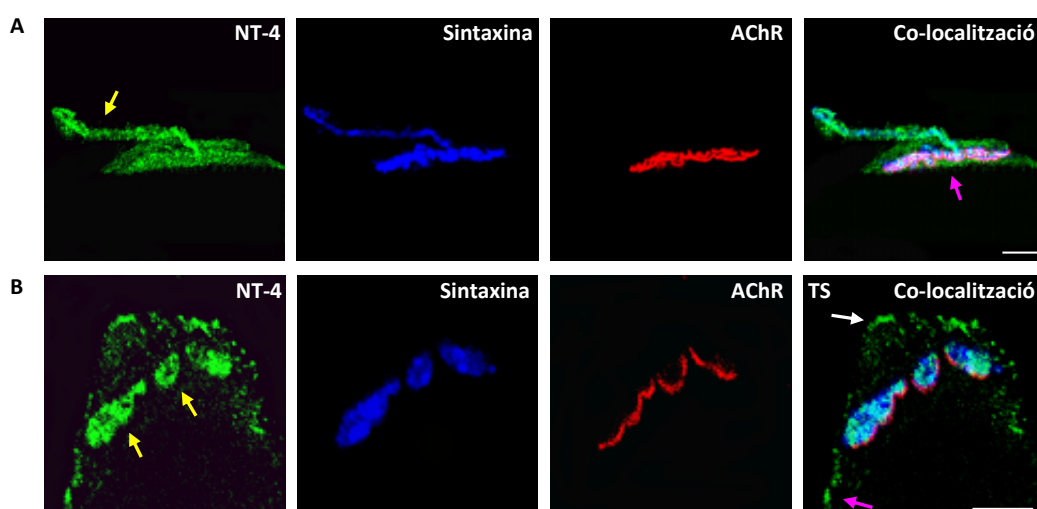


Figura 20. Triple marcatge de l'NT-4 (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs P6. La marca d'NT-4 es troba en el recorregut axonal (fletxa groga 20B), en el terminal nerviós presinàptic (fletxa groga 20A) a la cèl·lula muscular extrasinàptica (fletxa rosa 20B) En el TS s'aprecia que l'NT-4 no es troba en la CS telogial En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza l'NT-4 en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (CS_m) i telogial/terminal (CS_t). Cèl·lula nerviosa preterminal (CN_p) i terminal (CN_t). Cèl·lula muscular sinàptica (CM_s) i extrasinàptica (CM_{es}). Barra d'escala: 10 μm.

En el cas dels LALs P30, es pot veure en les imatges obtingudes per IHQ de la Figura 21 que l'NT-4 (en verd) coincideix amb l'àrea de la syntaxina (en blau) i amb l'àrea dels nAChRs (en vermell). En la Figura 21A s'aprecia que la marca de l'NT-4 és molt igual a la del recorregut axonal preterminal marcat amb syntaxina (fletxa groga). En la mateixa imatge es veu com la marca d'NT-4 es troba per sota dels nAChRs, per tant a la cèl·lula muscular (fletxa rosa a la imatge co-localitzada). A la Figura 21B, que és un tall semifi transversal, es pot observar una localització més precisa de l'NT-4. Es mostra amb molta claredat, com la immunoreactivitat per l'NT-4 coincideix amb el perfil syntaxina-positiu dels botons sinàptics dels terminals nerviosos (fletxes grogues imatge 21B co-localitzada). La reactivitat granular i feble que es disposa per sota dels nAChRs correspon a l'àrea muscular subsinàptica. Aquesta marca es va fer més intensa en l'àrea muscular extrasinàptica (fletxa rosa imatge 21B). En aquesta mateixa imatge també es pot apreciar un granulat immunoreactiu una mica més intens, positiu per l'NT-4, que està recobrint els botons terminals en l'àrea de la CS teloglial (fletxa blanca a la imatge co-localitzada, Figura 21B). Resumint i amb diferències envers la situació immadura, l'NT-4 es troba principalment en el preterminal i terminal nerviós i a la CS teloglial, però també en la cèl·lula muscular.



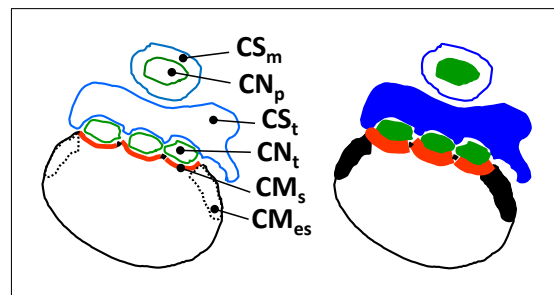


Figura 21. Triple marcatge de l'NT-4 (en verd) amb la syntaxina (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs P30. La marca de l'NT-4 és molt igual a la del recorregut axonal preterminal marcat amb syntaxina (fletxa groga 21A). L'NT-4 es troba per sota dels nAChRs a la cèl·lula muscular (fletxa rosa 21A). En el TS s'observa que la immunoreactivitat per l'NT-4 coincideix amb el perfil sintaxina-positiu dels botons sinàptics dels terminals nerviosos (fletxes grogues 21B). Hi ha marca a l'àrea muscular subsinàptica i més intensa a l'extrasinàptica (fletxa rosa 21B). També es pot apreciar un granulat immunoreactiu recobrint els botons terminals en l'àrea de la CS teloglial (fletxa blanca 21B). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza l'NT-4 en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

2.1.3 Localització de l'NT-3

Les IHQs de la Figura 22, mostren la immunoreactivitat de l'NT-3 a la NMJ del LAL postnatal de 6 dies. El triple marcatge presenta en verd l'NT-3, en vermell la marca de la syntaxina o s-100 i en blau la localització dels nAChRs. En les dues primeres IHQs realitzades en les que s'ha immunomarcant amb la syntaxina (Figures 22A i 22B), es pot observar que el perfil de l'NT-3 co-localitza amb molta fidelitat a la marca de la syntaxina corresponent al preterminal (fletxa groga, Figura 22A) i al terminal nerviosos (fletxa groga, Figura 22B). La marca granulada assenyalada per les fletxes roses, situada més enllà de l'àrea sinàptica en les imatges 22A i 22B, delimita la membrana del miòcit. En la tercera IHQ que es mostra (Figura 22C), s'ha co-localitzat l'NT-3 amb l'S-100, i es pot apreciar com la marca de la NT en verd no s'assembla massa a la marca

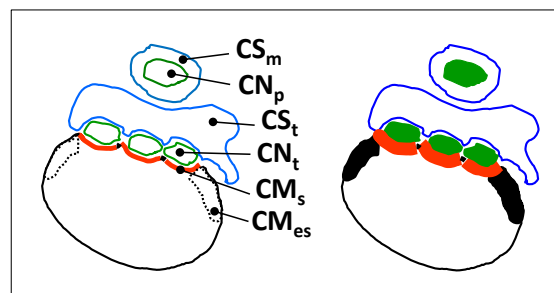
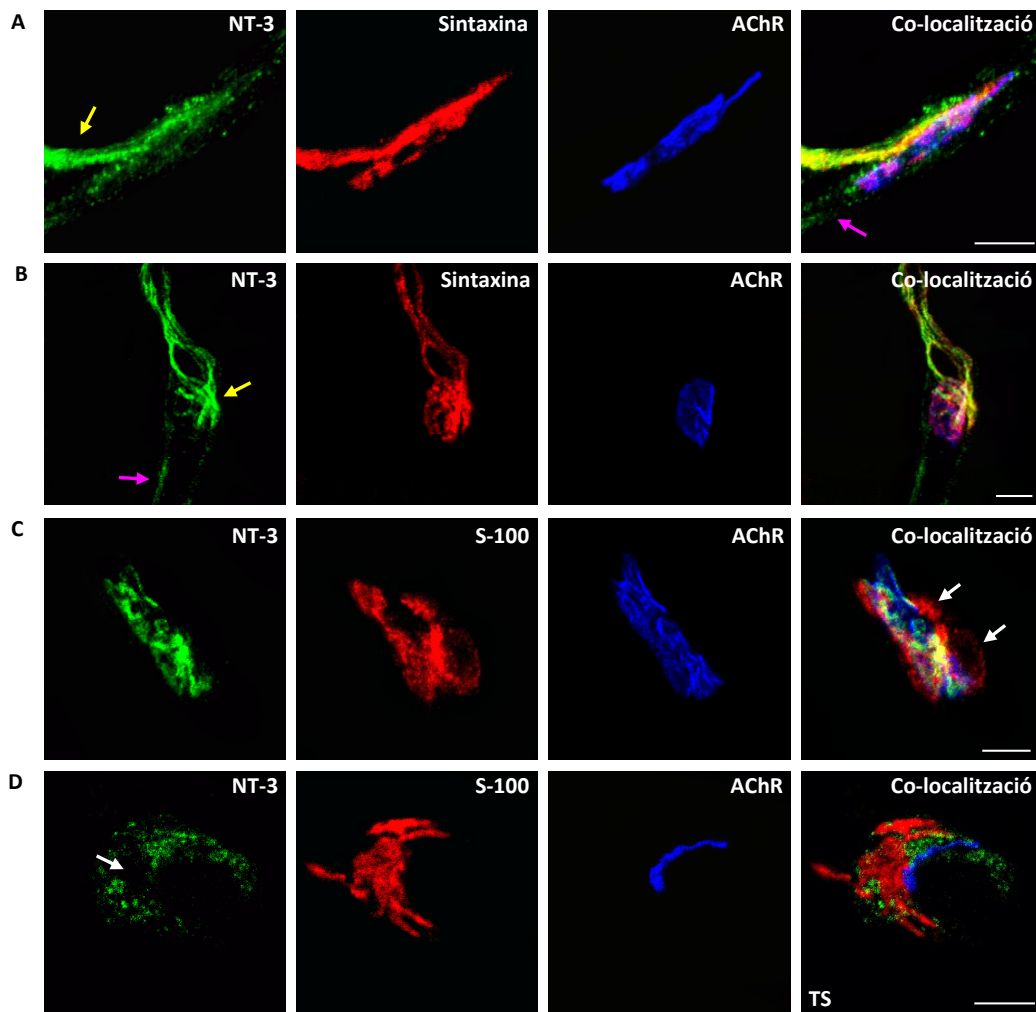


Figura 22. Triple marcatge de l'NT-3 (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P6. El perfil de l'NT-3 co-localitza amb molta fidelitat a la marca de la syntaxina corresponent al preterminal nerviós (fletxa groga 22A) i al terminal (fletxa groga 22B). Les fletxes roses assenyalen marca delimitant la membrana del miòcit (22A i 22B). La marca de l'NT-3 no s'assembla massa a la marca de la CS teloglia, donat que aquesta última està envoltant la marca de l'NT-3 i dels nAChRs (fletxes blanques 22C). No hi ha co-

localització entre l'NT-3 i l'S-100, donat que els espais buits presents en la imatge (fletxa blanca 22D) són els que després presenten marca d'S-100 en vermell. En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza l'NT-3 en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

en vermell de la CS teloglial, donat que aquesta última sembla estar envoltant la marca de l'NT-3 i dels nAChRs (fletxes blanques imatge co-localitzada Figura 22C). Per tal de detallar més aquesta manca de presència d'NT-3 en la CS, s'han realitzat talls semifins com el que es mostra a la Figura 22D. Així es corrobora com no hi ha co-localització entre les dues proteïnes (NT-3 i S-100), donat que els espais buits presents en la imatge (exemple fletxa blanca, Figura 22D) són els que després presenten marca d'S-100 en vermell. En la Figura 22B es pot apreciar com la marca de l'NT-3 en els diferents axons que es mostren, coincideix amb la marca de la syntaxina. Ara bé, no s'aprecia marca de color verd envoltant aquests axons, per tant no hi ha presència d'NT-3 en la CS mielinogènica. En resum, sembla ser que l'NT-3 en les sinapsis immadures es troba en l'axó preterminal i terminal i en la cèl·lula muscular.

En el cas del múscul adult, s'ha co-localitzat l'NT-3 (en verd) amb l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau). La localització és similar a la postnatal, donat que es pot veure una forta immunoreactivitat per l'NT-3 en el preterminal axonal (fletxa groga Figura 23A) i el terminal nerviós tal i com mostren la Figura 23A i la Figura 23C. En aquesta última, la fletxa groga de la imatge co-localitzada, assenyala el granulat positiu per a l'NT-3 situat a l'àrea que li correspon al terminal nerviós entre la marca de l'S-100 i la dels nAChRs. En el cas de la imatge de placa motora sencera (Figura 23A) el marcatge de l'S-100 permet veure que la marca vermella (corresponent a la CS) es troba per sobre de la marca verda de l'NT-3 pel que es podria dir que aquesta NT no es troba a la CS teloglial. No obstant, en les imatges de la sinapsi obtingudes pel mètode del tall semifí, on s'aconsegueix una resolució molt més precisa, una marca verda fina i granulada de l'NT-3 co-localitza lleugerament amb la marca vermella de l'S-100, el que

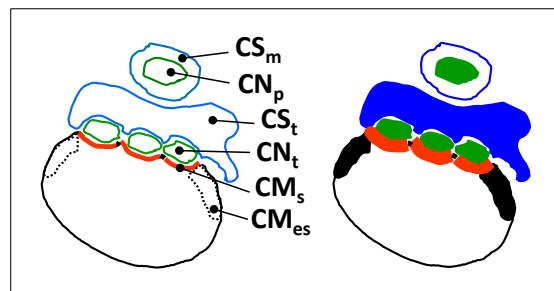
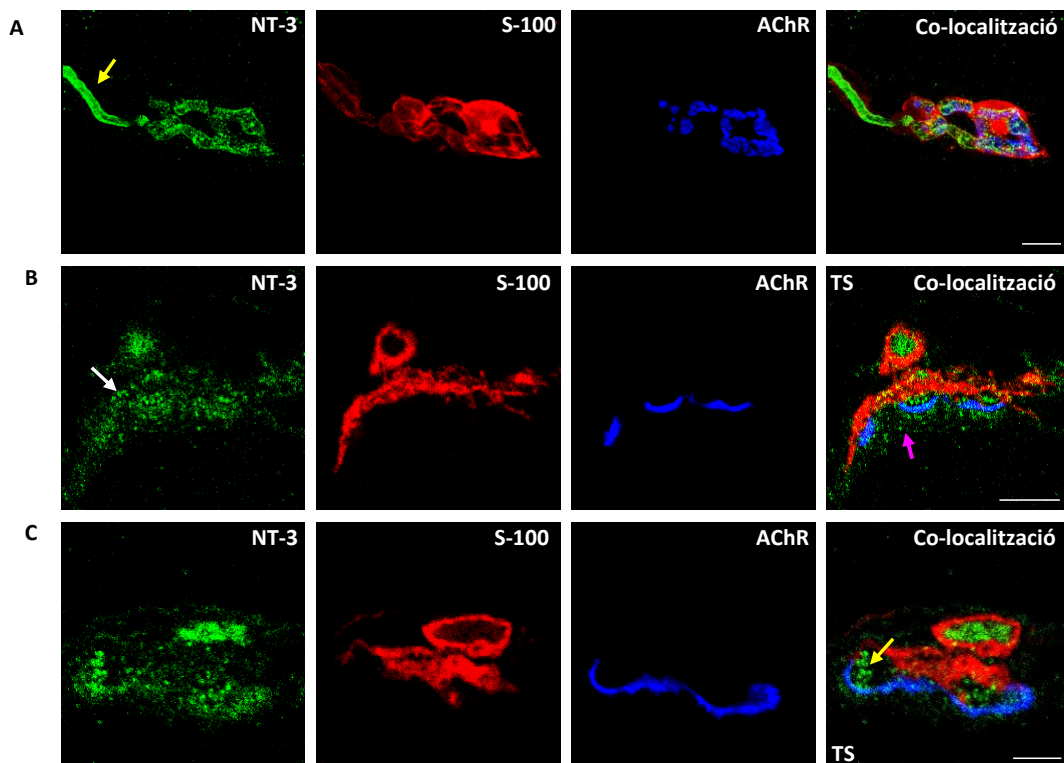


Figura 23. Triple marcatge de l'NT-3 (en verd) amb l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P30. Es pot veure una forta immunoreactivitat per l'NT-3 en el preterminal axonal (fletxa groga 23A) i el terminal nerviós (23A i 23C). La fletxa groga de la imatge 1C co-localitzada, assenjala el granulat positiu per a l'NT-3 situat a l'àrea que li correspon al terminal nerviós. Una marca verda fina i granulada d'NT-3 co-localitza lleugerament amb la marca vermella de l'S-100, el que pot indicar presència d'NT-3 a la CS teloglial (fletxa blanca 23B). A la mateixa imatge s'observa que l'NT-3 es localitza a la cèl·lula muscular per sota dels nAChRs marcats en blau (fletxa rosa 23B). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza l'NT-3 en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

ens pot indicar presència d'NT-3 a la CS teloglial (fletxa blanca Figura 23B). A més a més del component presinàptic i de la CS teloglial, a la mateixa imatge s'observa que la neurotrofina també es localitza a la cèl·lula muscular per sota dels nAChRs marcats en blau (fletxa rosa). Per tant, en l'edat adulta, els animals presenten l'NT-3 en els tres components de la NMJ: en el terminal i preterminal nerviosos i la cèl·lula muscular amb més intensitat i a la CS teloglial de manera més difusa.

2.2 Localització dels receptors de les neurotrofines (TrkB, TrkC i p75^{NTR})

2.2.1 Localització del TrkB

Pel que fa a la localització del receptor TrkB (receptor del BDNF i de l'NT-4, en verd), s'ha immunomarcant amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau). S'observa que el TrkB es localitza a la placa motora del múscul P6 (Figures 24A i 24B), tenint una bona correspondència amb la marca de la syntaxina, concretament a l'axó preterminal (fletxa groga a la Figura 24A) i el terminal nerviós (àrea amb punts groguencs a la imatge co-localitzada de la Figura 24A sorgits del solapament de les marques de la syntaxina i el TrkB. Aquest resultat es confirma al realitzar el TS; en la Figura 24C s'observa com la marca verda del TrkB es troba en l'espai corresponent al terminal nerviós (fletxa groga imatge co-localitzada). A més a més, el TrkB també està present en el component postsinàptic, al voltant de la regió sinàptica (fletxes roses Figura 24A). Pel que fa a la presència del TrkB a la CS teloglial de la unió neuromuscular de nadó, podem apreciar que la marca d'S-100 (en vermell) es troba fora de les zones immunopositives pel TrkB i els nAChRs (fletxa blanca a la imatge co-localitzada de la Figura 24B), el que suggereix que el receptor TrkB no es troba a la cèl·lula teloglial. Això es consolida observant el tall semifí, on la marca vermella de la CS es situa en els espais buits de la marca en verd del TrkB (fletxa blanca Figura 24C). En el mateix TS s'observa com la marca verda del TrkB es situa per sota els nAChRs que estan marcats

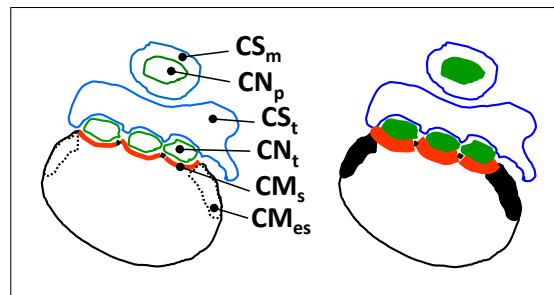
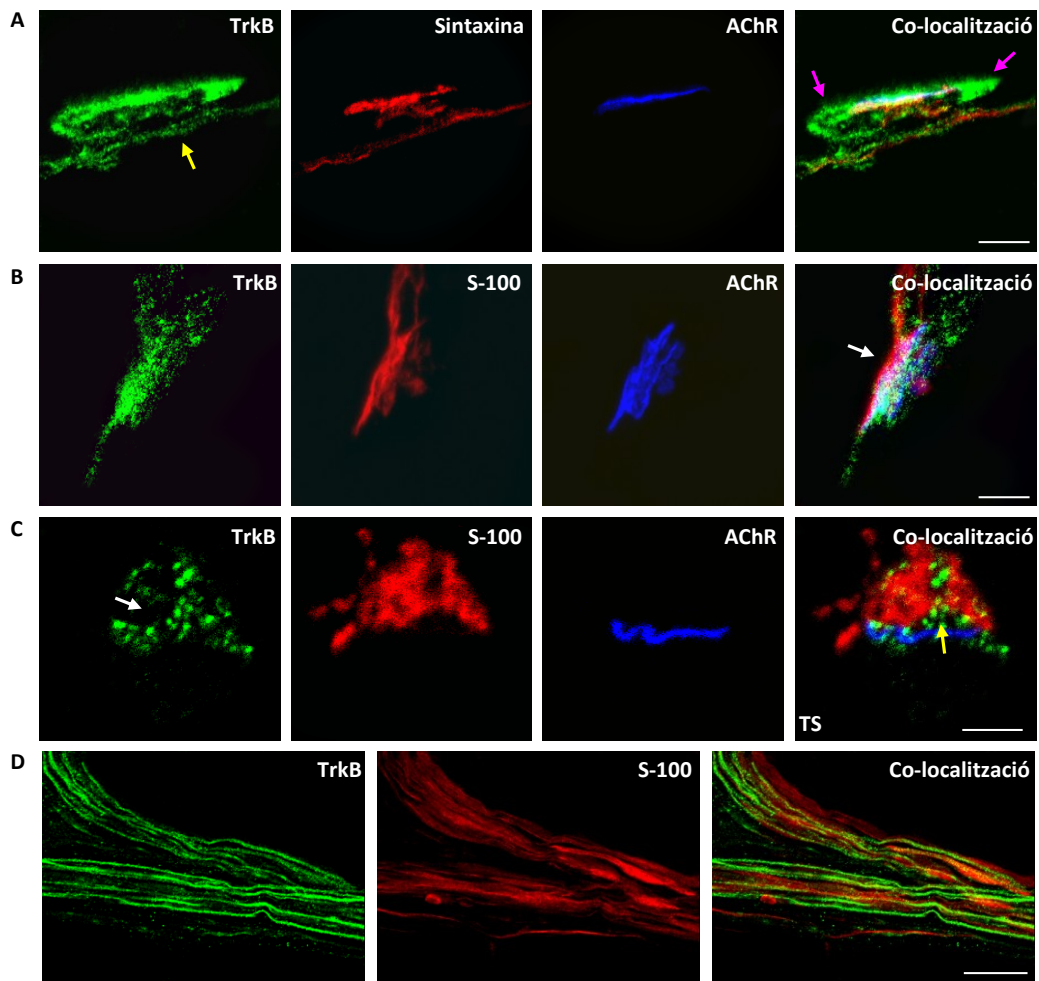


Figura 24. Triple marcatge del receptor TrkB (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P6. El TrkB té bona correspondència amb la marca de la syntaxina, és a dir a l'axó preterminal (fletxa groga 24A) i al terminal nerviós (àrea amb punts groguencs a la imatge co-localitzada de la Figura 24A). El TrkB es troba en l'espai corresponent al terminal nerviós (fletxa groga imatge co-localitzada 24C) i en el component postsinàptic, al voltant de la regió sinàptica (fletxes roses 24) positives pel TrkB i els nAChRs (fletxa blanca a la imatge co-localitzada 24B), suggerint que el TrkB no es troba a

la cèl·lula teloglial. En el TS, la marca vermella de la CS es situa en els espais buits de la marca en verd del TrkB (fletxa blanca 24C). El TrkB és present en els axons de les fibres nervioses intramusculars, però absent en la CS mielinogènica (24D). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor TrkB en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

en blau indicant també una localització postsinàptica. A la Figura 24D s'observa que la marca de TrkB és present en els axons de les fibres nervioses intramusculars, però absent en la CS mielinogènica degut a que la marca vermella de l'S-100 no es correpon amb la marca axonal molt més fina (en verd). Aparentment doncs, el receptor TrkB es situa principalment en el component pre i postsinàptic mentre que és absent a la CS teloglial i mielinogènica de la NMJ neonatal.

En les IHQs realitzades en múscul LAL adult, s'ha marcat el TrkB en verd, la sintaxina o l'S-100 en blau i els nAChRs en vermell. Les diferents imatges permeten veure com la correspondència entre la sintaxina i el TrkB és molt bona, situant-lo més intensament en el recorregut axonal (fletxa groga Figura 25A) i amb menys densitat al terminal nerviós. Aquest fet també s'observa en la imatge co-localitzada del tall semifí de la Figura 25B, on la marca verda del TrkB, es situa al centre dels botons sinàptics, evidenciats en aquest cas amb sintaxina. A la Figura 25C, imatge d'un tall semifí transversal, es reafirma la presència del TrkB en l'axó preterminal (ressaltat per la fletxa groga a la imatge del TrkB en verd) i també en els botons del terminal nerviós. El múscul també és immunoreactiu al receptor TrkB ja que s'evidencien dipòsits entre els plecs postsinàptics i a les àrees extrasinàptiques (fletxes roses imatges co-localitzades Figures 25B i 25C). Pel que fa a la CS, en la IHQ convencional (Figura 25A), no s'aprecia una marca de TrkB definida mentre que en els TSs, s'observa marca teloglial granular homogènia TrkB-positiva com assenyalava la fletxa blanca a la imatge

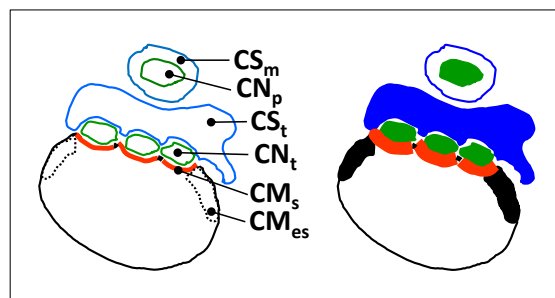
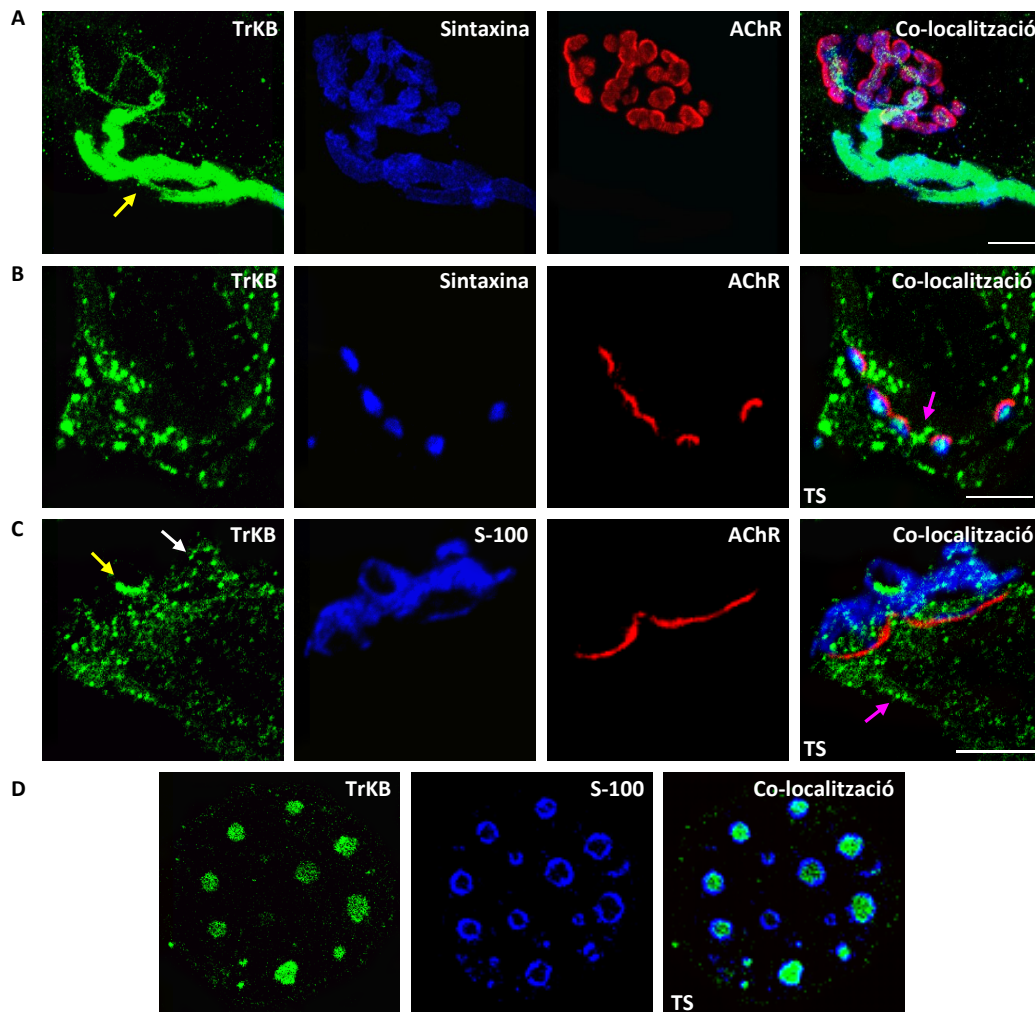


Figura 25. Triple marcatge del receptor TrkB (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs P30. S'observa correspondència entre la syntaxina i el TrkB, més intensament en el recorregut axonal (fletxa groga 25A) i amb menys densitat al terminal nerviós. A la Fig. 25C, es reafirma la presència del TrkB en l'axó preterminal (fletxa groga, 25C) i també en els botons del terminal nerviós. El múscul és immunoreactiu al TrkB ja que s'evidencien dipòsits entre els plecs postsinàptics i a les àrees extrasinàptiques (fletxes roses imatges co-localitzades 25B i 25C). Pel que fa a la CS, en la Fig. 25A, no s'aprecia

una marca de TrkB definida mentre que en els TSs, s'observa marca teloglial granular homogènia TrkB-positiva (fletxa blanca 25C). Manca marca de TrkB a la cèl·lula mielinogènica (25D). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor TrkB en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

25C on s'ha co-localitzat el TrkB amb l'S-100. Aquesta dèbil marca positiva del TrkB en la CS teloglial també es pot intuir en la Figura 25B, on per sobre del terminal nerviós (en aquest cas marcat amb syntaxina) s'observa un granulat que podria correspondre a la localització de la CS teloglial. No obstant, manca marca de TrkB a la cèl·lula mielinogènica com s'observa a la secció transversal de les fibres nervioses (Figura 25D). D'aquesta manera, s'arriba a la conclusió de que el receptor és present en els tres components de la NMJ.

2.2.2 Localització del TrkC

El receptor de l'NT-3, el TrkC, s'ha estudiat en músculs d'animal P6 on s'ha immunomarcant en verd, juntament amb la syntaxina o l'S-100 en vermell i els nAChRs en blau. S'ha vist que la marca del receptor TrkC presenta una zona verda més intensa que coincideix amb la marca del component presinàptic (syntaxina-positiu) i amb la marca blava dels nAChRs (Figura 26A). Per aclarir la localització d'aquest receptor en la NMJ, en el primer tall semifí (Figura 26B), s'aprecia una marca esfèrica (fletxa groga) que es troba entremig dels nAChRs en blau i la marca vermella de la CS teloglial, corresponent al botó sinàptic. La marca del TrkC, s'estén a la cèl·lula muscular més enllà de la placa motora tal i com assenyala la fletxa rosa a la imatge co-localitzada de la Figura 26A. Aquesta marca muscular extrasinàptica subsarcolèmica també s'aprecia al tall semifí de la Figura 26C (fletxa rosa de la imatge co-localitzada). Pel que fa a la CS teloglial, també és immunoreactiva al TrkC, com indiquen les fletxes blanques de les imatges dels talls semifins 26B i 26C, on s'observa una marca granular densa que co-

localitza amb la marca vermella de l'S-100. Per tant, es posa de manifest que el receptor TrkC es localitza en els tres components cel·lulars de la NMJ neonatal.

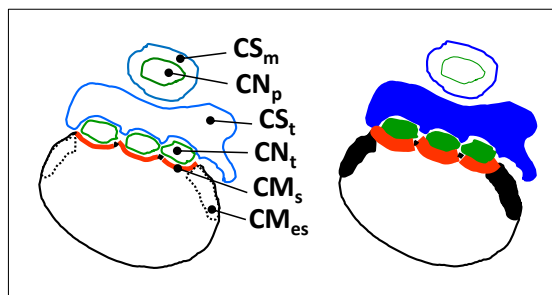
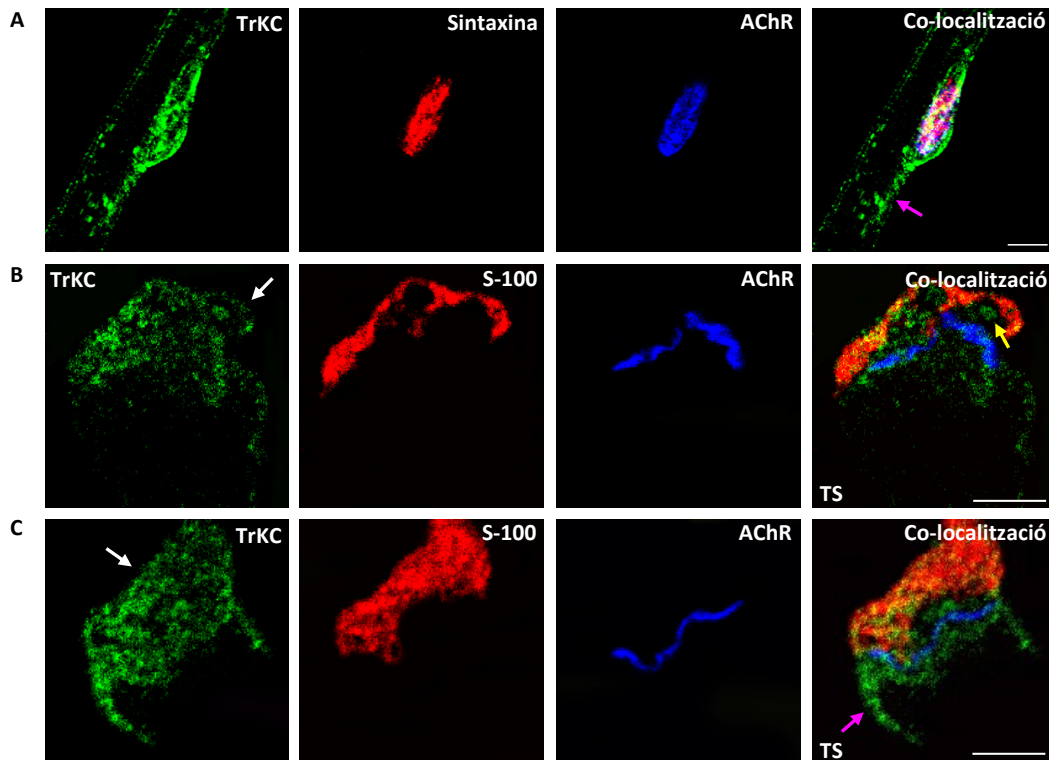


Figura 26. Triple marcatge del receptor TrkC (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P6. La marca del receptor TrkC presenta una zona verda més intensa que coincideix amb la marca del component presinàptic (syntaxina-positiu) i amb la marca blava dels nAChRs (26A). En el primer TS (26B), s'aprecia una marca rodona (fletxa groga) corresponent al botó sinàptic. La marca del TrkC, s'estén a la cèl·lula muscular més enllà de la placa motora tal i com assenyala la fletxa rosa a la imatge co-localitzada de la Fig. 26A. i al TS (26C). La CS telogial també és immunoreactiva al TrkC (fletxes blanques en

els TSs 26B i 26C). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor TrkC en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

En la NMJ adulta el receptor TrkC té bona co-localització amb els botons sinàptics positius per la syntaxina en vermell, i amb els nAChRs en blau tal com mostra la Figura 27A on es posa de manifest un granulat força dens que es correspon amb l'àrea sinàptica. Per especificar una mica més en la seva localització, es presenten dos talls semifins en els que s'ha marcat l'S-100 en vermell i els nAChRs en blau (Figura 27B i 27C). En els dos talls semifins s'aprecia que el perfil de la marca del receptor TrkC (en verd) és molt semblant a la marca vermella de l'S-100 corresponent a la CS teloglial (fletxa blanca Figura 27C). Per altra banda, l'àrea entre la CS teloglial i els nAChRs corresponent als botons sinàptics, presenta una reactivitat alta i definida pel TrkC. Un exemple d'això s'observa a la imatge co-localitzada de la Figura 27C, on les fletxes grogues assenyalen dos dels botons sinàptics TrkC-positius. L'àrea muscular subsinàptica també presenta marca granular fina clarament positiva pel TrkC que s'estén més enllà de la sinapsi subsarcolèmica (fletxa rosa Figura 27B). En resum, i de la mateixa manera que succeeix amb el nadó, s'observa la presència de TrkC en els tres components de la NMJ adulta: al terminal nerviós, a la CS teloglial i al component postsinàptic.

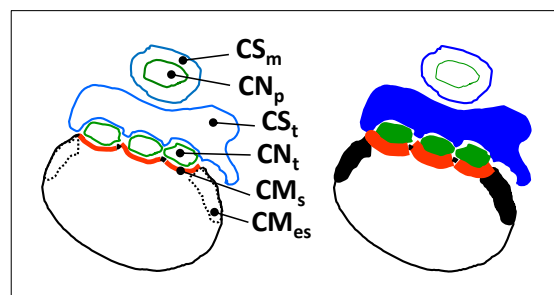
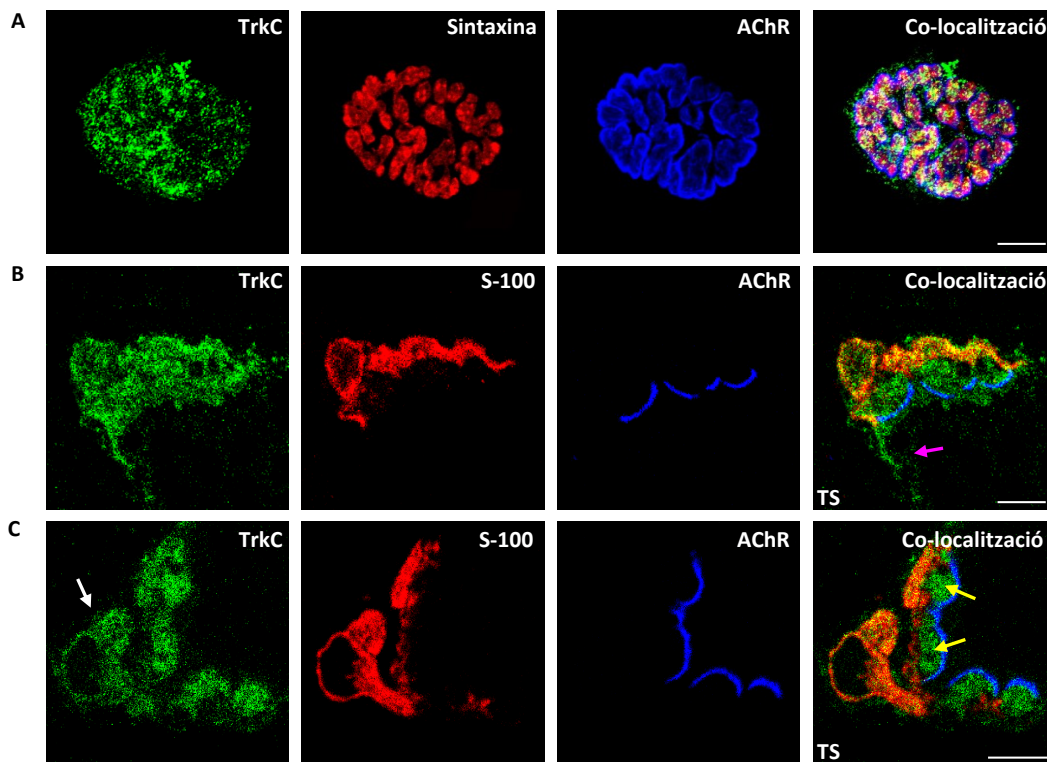
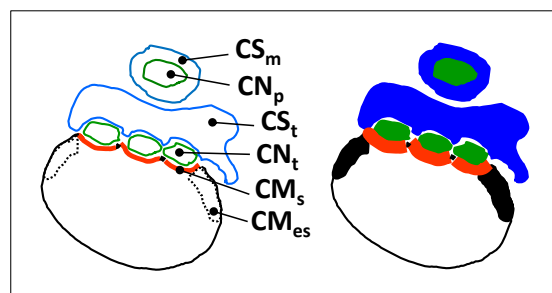
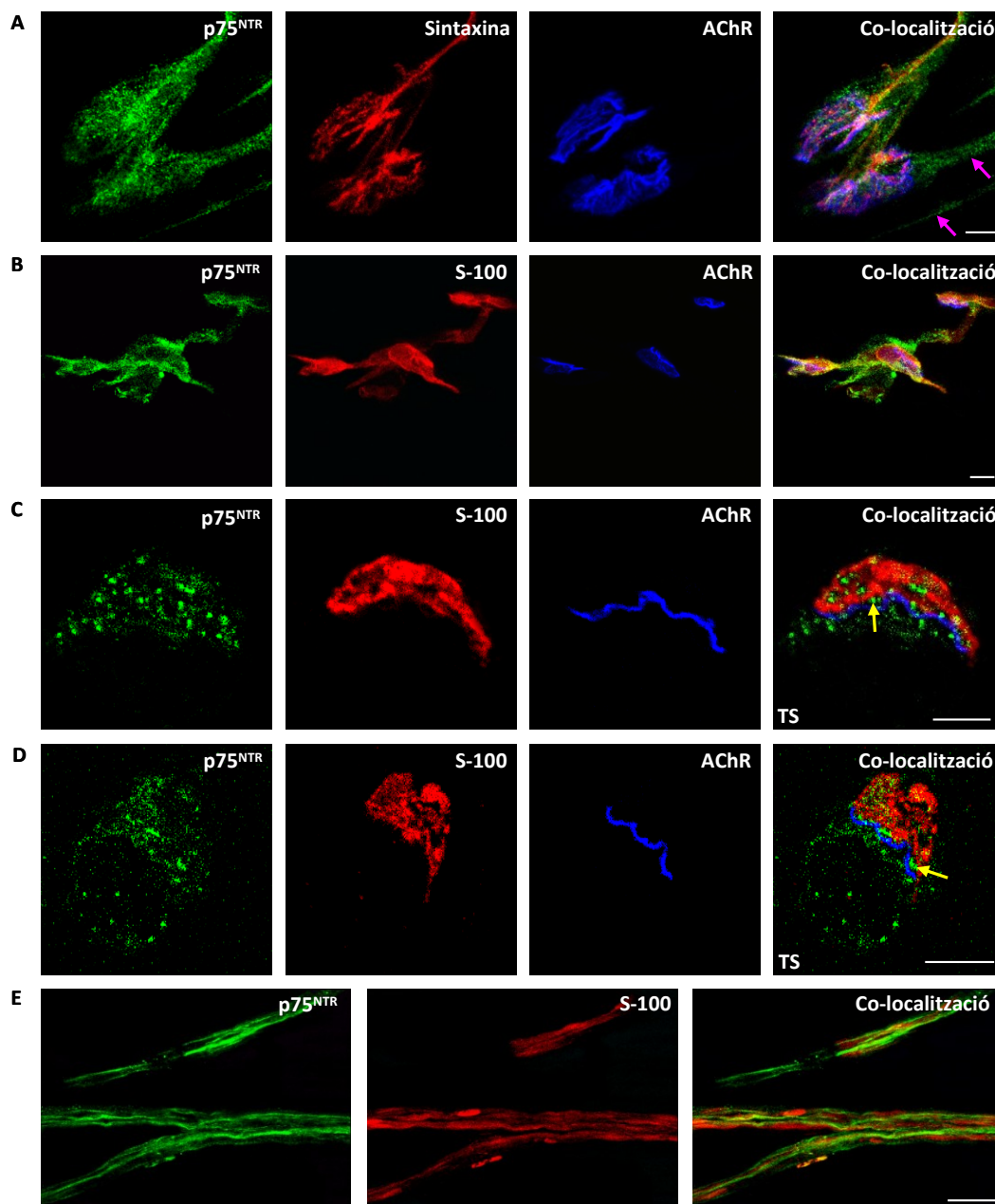


Figura 27. Triple marcatge del receptor TrkC (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P30. El receptor TrkC es troba a l'àrea sinàptica (27A). En els TSs s'observa com el perfil de la marca del receptor TrkC (en verd) és molt semblant a la marca vermella de l'S-100 corresponent a la CS teloglia (fletxa blanca 27C). L'àrea corresponent als botons sinàptics, presenta una reactivitat alta i definida pel TrkC (fletxes grogues imatge co-localitzada de la Fig. 27C). L'àrea muscular subsinàptica també presenta marca granular fina positiva pel TrkC que s'estén més enllà de la sinapsi subsarcolèmica (fletxa rosa 27B). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor TrkC en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglia/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.

2.2.3 Localització del p75^{NTR}

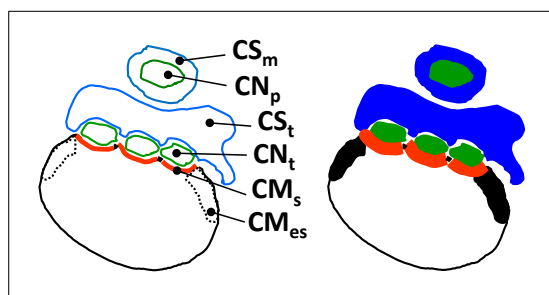
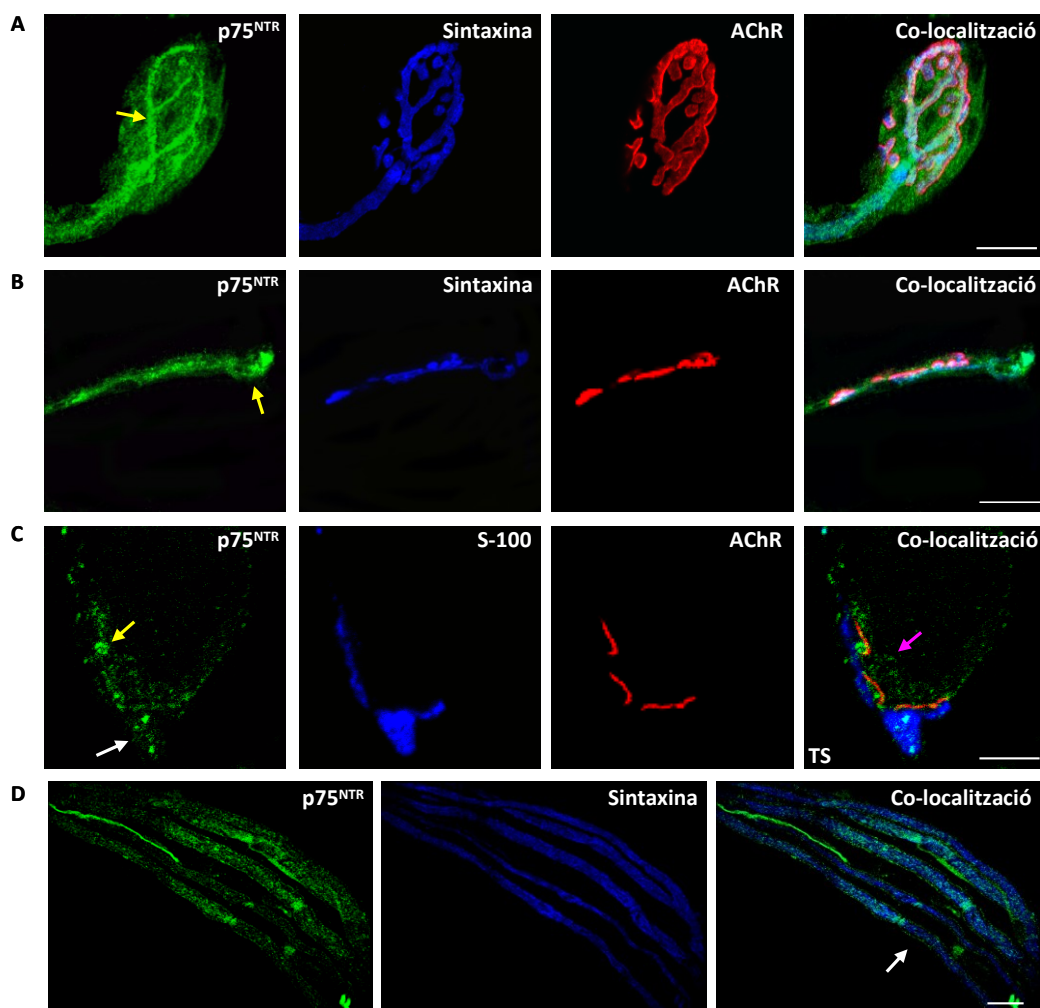
Per tal de localitzar el receptor p75^{NTR} (descriu de baixa afinitat per al BDNF, l'NT-4 i l'NT-3) a la NMJ neonatal, s'ha combinat també l'immunomarcatge del receptor (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau). En la primera imatge (Figura 28A), s'observa una marca positiva pel receptor en l'àrea sinàptica. Les fletxes roses a la mateixa figura co-localitzada, indiquen la presència de p75^{NTR} a la cèl·lula muscular extrasinàptica. A la imatge co-localitzada de la Figura 28B, s'aprecia una tonalitat groguenca, que sorgeix de la superposició del verd del receptor amb el vermell de l'S-100, d'aquesta manera doncs, el p75^{NTR} mostra bona correspondència amb la CS teloglial i melinogènica. Els talls semifins (Figura 28C i 28D), ens permeten corroborar els resultats adquirits amb les IHQ de les Figures 28A i 28B. En els dos casos, la marca granulada del receptor, es distribueix per sota dels nAChRs a la cèl·lula muscular, de manera més intensa per sobre dels nAChRs corresponent als botons sinàptics nerviosos (fletxes grogues), i també co-localitzant amb la marca d'S-100 corresponent la CS teloglial. En la Figura 28E, corresponent a un tram del tronc nerviós s'observa que la CS mielinogènica també és p75^{NTR} positiva, donat que s'observen alguns traços de color groguenc resultant de la superposició espacial dels colors. Així doncs, hi ha presència del receptor en els tres components de la NMJ neonatal.

Figura 28. Triple marcatge del receptor p75^{NTR} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en vermell) i els nAChRs (en blau) en músculs P6. Les fletxes roses a la Fig. 28A co-localitzada, indiquen la presència de p75^{NTR} a la cèl·lula muscular extrasinàptica. Les àrees groguenques a la imatge co-localitzada de la Fig. 28B, indiquen la bona correspondència del p75^{NTR} amb la CS teloglial i melinogènica. S'observa marca granulada del receptor per sota dels nAChRs a la cèl·lula muscular i per sobre els nAChRs corresponent als botons sinàptics nerviosos (fletxes grogues TSs 28C i 28D), i també co-localitzant amb la marca d'S-100 corresponent la CS teloglial. La CS mielinogènica també és p75^{NTR} positiva (fletxa blanca 28E). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor p75^{NTR} en la NMJ neonatal. Cèl·lula de Schwann mileinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.



En el cas de la NMJ adulta, s'ha marcat el receptor (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell). De la mateixa manera que succeeix amb el nadó, hi ha una especial intensitat del p75^{NTR} que es correspon amb la syntaxina, marcadora del terminal i preterminal nerviosos (fletxes grogues imatges Figures 29A i 29B). En el tall semifí es mostra la marca difusa en el múscul que s'intensifica per sota de l'àrea muscular corresponent als nAChRs (fletxa rosa Figura 29C). A la mateixa imatge també es mostren uns cúmuls granulats d'una mida força important i més intensos, corresponents als botons sinàptics (fletxa groga). S'observa una marca molt fina i dèbil, corresponent a la CS a nivell teloglial com es mostra en el tall semifí (fletxa blanca, Figura 29C); també s'observa una marca verda difusa envoltant la marca de la syntaxina que correspon a la CS mielinogènica com s'observa en la imatge corresponent a una secció d'una branca nerviosa (fletxa blanca, Figura 29D). D'aquesta manera, en l'adult també hi ha evidències que el receptor es troba en els tres components de la NMJ.

Figura 29. Triple marcatge del receptor p75^{NTR} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs P30. S'observa marca verda intensa del p75^{NTR} que correspon amb la syntaxina, marcadora del terminal i preterminal nerviosos (fletxes grogues imatges 29A i 29B). En el TS es mostra la marca difusa en el múscul que s'intensifica per sota de l'àrea muscular corresponent als nAChRs (fletxa rosa 29C). En la marca en verd es mostren uns cúmuls granulats d'una mida força important i més intensos, corresponents als botons sinàptics (fletxa groga 29C). La CS teloglial és immunoreactiva al p75^{NTR} (fletxa blanca 29C); també s'observa una marca verda difusa envoltant la marca de la syntaxina que correspon a la CS mielinogènica com s'observa en la imatge corresponent a una secció d'una branca nerviosa (fletxa blanca 29D). En el dibuix, es mostren acolorides les àrees on es localitza el receptor p75^{NTR} en la NMJ adulta. Cèl·lula de Schwann mielinogènica (**CS_m**) i teloglial/terminal (**CS_t**). Cèl·lula nerviosa preterminal (**CN_p**) i terminal (**CN_t**). Cèl·lula muscular sinàptica (**CM_s**) i extrasinàptica (**CM_{es}**). Barra d'escala: 10 µm.



3. EXPERIMENTS FUNCIONALS

Com ja s'ha descrit en la introducció, les NTs són alliberades per la fibra muscular postsinàptica i la cèl·lula de Schwann i en determinades condicions també per les terminacions nervioses. Tot i que inicialment, les NTs es van caracteritzar pels seus rols en la supervivència i diferenciació neuronal després del transport retrògrad (Barde i cols., 1982; Wang et al. 1995), més tard s'ha vist que també participen en aspectes del desenvolupament i funcionament local de la sinapsi, modulant l'activitat sinàptica (Wang i Poo, 1997), l'eficàcia sinàptica, mediant en la plasticitat activitat-dependent tant estructural com funcional, i també controlant altres aspectes de la sinaptogènesi (Fu i cols., 1997; Elmariah i cols., 2004). També s'han realitzat treballs que relacionen les NTs amb el manteniment de l'especialització postsinàptica mediada per la via BDNF/NT-4 (Gonzalez i cols., 1999). Altres estudis, demostren que el BDNF té una relació en la modulació de l'alliberament d'ACh, ja que incrementa l'activitat sinàptica espontània i evocada en les NMJ en cultius de *Xenopus laevis* (Poo i cols., 2001).

Per tal de valorar la possible implicació del BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 en el procés d'eliminació sinàptica en el desenvolupament i/o en el control local del funcionament de la NMJ, s'han realitzat diferents experiments electrofisiològics. Aquest tipus d'experiments, es realitzen amb la preparació neuromuscular del LAL, muntada a la camareta de registre com ja s'ha explicat a l'apartat de Material i mètodes, i després s'incuben en el bany les diferents proteïnes o substàncies d'interès com per exemple les diferents NTs, els efectes de les quals es volen avaluar.

Cal anotar que tot i que l'objectiu principal de la tesi és l'estudi de les NTs en el procés de sinaptogènesi i d'eliminació sinàptica, alguns dels experiments s'han dut a terme també en múscul LAL adult, amb la finalitat de tenir un punt de vista més global i comparatiu i conèixer així, de forma general el funcionament de les NTs en la NMJ. A continuació es mostren els resultats obtinguts mitjançant aquesta metodologia.

3.1 Efecte de les neurotrofines a la sinapsi neuromuscular

3.1.1 Efecte del BDNF a la sinapsi neuromuscular

Amb la intenció de valorar la possible implicació del BDNF, aquest s'ha aplicat de forma exògena per activar la via de senyalització que desencadena la seva unió amb els seus receptors TrkB i p75^{NTR}. Així s'han realitzat diferents experiments funcionals utilitzant la metodologia electrofisiològica per intentar situar el BDNF en el procés d'eliminació sinàptica que té lloc durant el desenvolupament i en el control del funcionament de la NMJ.

3.1.1.1 Corba dosidependent

Com és habitual, abans d'iniciar un estudi funcional i per a qualsevol substància nova amb la que es treballa, s'ha realitzat una corba dosidependent per conèixer la concentració a la que és convenient treballar. En aquest estudi dosidependent s'han contemplat diferents concentracions per al BDNF: 0.1-1-5-10-50 nM. S'ha vist, com es mostra a la Figura 30, que l'aplicació del BDNF al bany de la preparació neuromuscular neonatal durant 1 h, produeix un increment en l'amplada dels EPPs a les concentracions més altes (10 i 50 nM), tot i que l'increment és significatiu únicament en el cas de la dosi més alta (50 nM, $p < 0.01$).

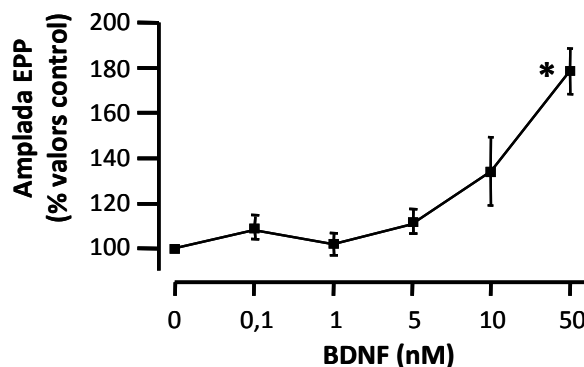


Figura 30. Corba dosidependent del BDNF en músculs neonatals. Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada de les sinapsis neonatals a una hora d'incubació a les diferents dosis testades. El BDNF 50 nM provoca un increment significatiu de l'amplada del 80%. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

En el cas del múscul adult, el BDNF (0.1-1-5-10-50 nM) a 1 h d'incubació no modifica la neurotransmissió evocada. (Figura 31)

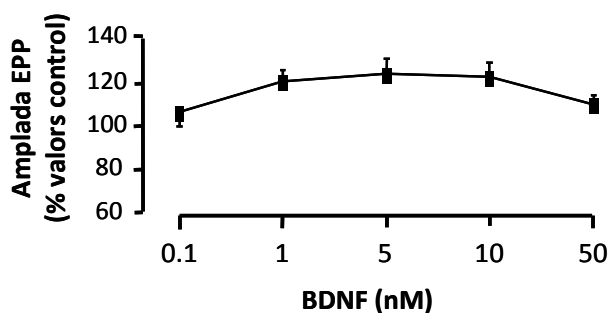


Figura 31. Corba dosidependent del BDNF en músculs adults. Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada de les sinapsis adultes a una hora d'incubació a les diferents dosis testades. Amb aquests temps d'incubació, el BDNF no modifica la neurotransmissió evocada en l'adult. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors inicials. En tots els casos $p > 0.05$.

3.1.1.2 Corba temps dependent

Veient que en el nadó la resposta evocada augmenta a la dosi alta 50 nM amb 1 h d'incubació, s'ha fet l'estudi temps dependent, pensant que potser és necessari més temps per veure un efecte a la dosi més baixa. D'aquesta manera s'ha incubat 2 i 3 h amb BDNF (10 i 50 nM) veient que a les 3 h (10 nM) potencia significativament la neurotransmissió evocada un 100% (Figura 32). Pel que fa a l'efecte obtingut a la dosi alta (50 nM, 1h) es manté igual les dues hores següents ($p > 0.05$ entre 1 i 3 h). Així

doncs, la potenciació aconseguida amb 1 h a la dosi alta (50 nM) és equivalent a l'obtinguda a les 3 h a la dosi baixa (10 nM, Figura 32).

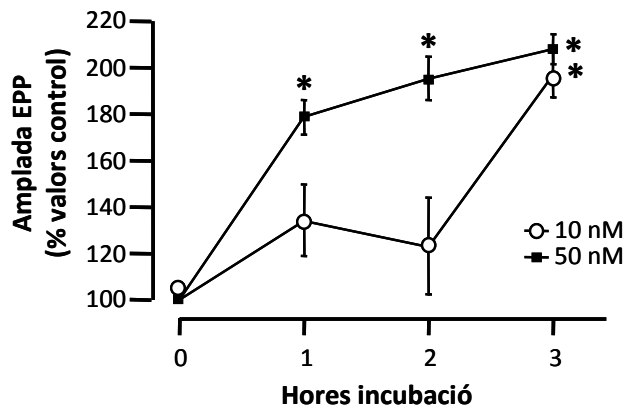


Figura 32. Corba temps dependent del BDNF en músculs neonatals. S'ha estudiat els canvis en l'amplada dels EPPs produïts pel BDNF a les dosis més altes (10 i 50 nM), a temps més llargs d'exposició (1, 2 i 3 h). La figura mostra com el BDNF 10 nM incrementa aproximadament un 100% significatiu l'amplada de l'EPP a les 3 h mentre que a la concentració 50 nM, l'increment és aproximadament un 80% i es dona a la hora, mantenint-se gairebé igual fins a les 3 h. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors control.

La corba dosidependent en l'adult (Figura 33), ens ensenya que a les 3 h d'incubació amb la dosi baixa (BDNF 10 nM) hi ha una potenciació significativa de la neurotransmissió d'un 70% aproximadament. Allargant la incubació fins a les 5 h, no s'evidencia cap canvi respecte a les 3 h ($p > 0.05$).

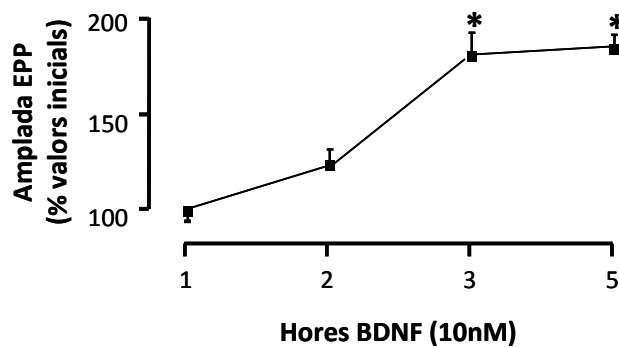


Figura 33. Corba temps dependent del BDNF en músculs adults. S'ha estudiat l'efecte del BDNF (10 nM) en la neurotransmissió evocada amb temps d'exposició majors (1, 2, 3 i 5 h). En el cas del múscul adult, l'efecte potenciador s'evidencia a les 3 h d'exposició, amb un increment d'un 80% mantenint-se fins a les 5 h sense canvis. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors inicials.

Per descartar un possible efecte del BDNF a nivell postsinàptic i garantir que la potenciació es deu a una afectació presinàptica, s'ha estudiat la resposta espontània (freqüència i amplada) i el potencial de membrana (PM). L'estudi s'ha realitzat amb músculs d'animals neonatals, per això s'ha afegit ClK (20-30 mM) al bany de la preparació, amb la finalitat d'obtenir una freqüència de mEPPs major. A la Figura 34 es pot veure com el BDNF (10 i 50 nM) no té cap efecte en el PM, i tampoc modifica l'amplada i freqüència dels potencials de placa miniatures espontànies (mEPPs). Per tot això, s'atorga un efecte presinàptic als canvis en la neurotransmissió provocats pel BDNF.

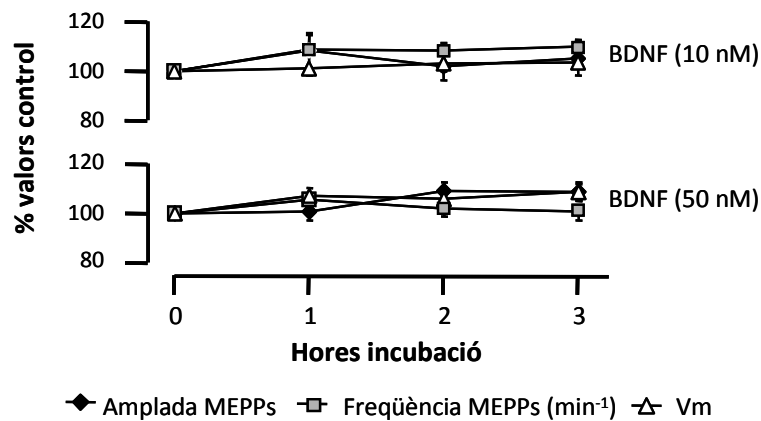


Figura 34. Estudi de l'efecte del BDNF en la neurotransmissió espontània (mEPP) en músculs neonatals. Les dues dosis testades (10 i 50 nM) no afecten el potencial de membrana (Vm), l'amplada ni la freqüència dels potencials de placa miniatures.

3.1.1.3 Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada de la sinapsi doble i simple

Com ja s'ha descrit anteriorment en l'apartat de Material i mètodes, en l'estudi funcional de la NMJ desenvolupament, es contempen dos tipus de sinapsis protagonistes del procés d'eliminació sinàptica: la sinapsi doblement innervada composta pel terminal que genera l'EPP petit i el terminal que genera l'EPP gran, i la sinapsi simple que serà la que haurà acabat per consolidar-se.

En treballs anteriors al nostre laboratori, s'ha demostrat que algunes de les molècules relacionades amb la senyalització en els dos terminals de la sinapsi doble, com són els autoreceptors muscarínics (mAChRs), les proteïnes cinases A (PKA) i C (PKC) i els canals de calci voltatge dependents (VDCCs), presenten diferents patrons d'expressió, funcionals i d'estequiometria. Parlant dels VDCCs, els canals tipus P/Q, N i L es troben en els dos terminals de la sinapsi doble-innervada, en canvi en la sinapsi simple es troben els canals tipus P/Q i N. Aquests canals de calci es troben diferentment acoblats a la neurotransmissió dels diversos terminals nerviosos (Santafé

i cols., 2001, 2002b). La PKC activa, promou la desconexió dels terminals nerviosos dèbils mentre que no afecta als terminals més madurs (l'EPP de la sinapsi simple i el terminal nerviós adult (Santafé i cols., 2007).

Vist l'efecte del BDNF en la neurotransmissió en els dos moments evolutius estudiats, i coneixent les diferències existents d'expressió i funcionalitat entre els terminals nerviosos, el següent objectiu plantejat ha estat investigar si els terminals nerviosos de la sinapsi doble i simple, són sensibles per igual davant del BDNF o pel contrari presenten diferències que ens puguin indicar una participació específica en l'eliminació sinàptica. Per a tal efecte, s'han valorat els canvis en l'amplada de la resposta evocada als temps (1 i 3 h) i a les dosis (10 i 50 nM) a les que s'ha obtingut resposta. A l'histograma de la Figura 35 s'observa el diferent curs temporal de l'increment en l'amplada dels EPPs de la sinapsi simple (70-90%), i en l'EPP petit i l'EPP gran de la sinapsi doble (~100% en els dos casos). Així doncs, el BDNF és capaç de potenciar la neurotransmissió en tots els contactes sinàptics independentment del nivell de maduració axonal que presenten (* $p < 0.05$ respecte valors inicials).

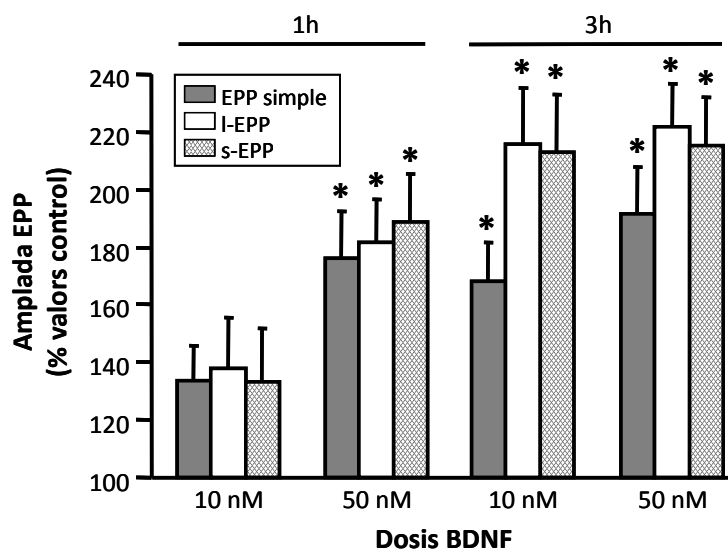


Figura 35. Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada en nadó. L'histograma mostra el curs temporal de l'efecte del BDNF a les dues dosis d'interès i als dos temps establerts. El BDNF 50 nM-1h, 10 nM-3 h i 50 nM-3 h potencien tots els terminals nerviosos (EPP petit, EPP gran i EPP simple) de les sinapsis neonatals. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * indica $p < 0.05$ respecte los valors control.

Amb la intenció d'estudiar la possible mediació per part del receptors del BDNF (TrkB i $p75^{NTR}$) en l'efecte potenciador que genera, s'han utilitzat dos compostos per tal de bloquejar-los i observar si el BDNF pot seguir exercint l'efecte potenciador esmentat. Pel TrkB s'ha fet servir la K-252a (200 nM, 1 h) i pel $p75^{NTR}$, l'anticòs blocador anti- $p75$ -192-IgG (5 μ g/ml, 1 h). En els dos casos, ha estat impossible reproduir l'efecte potenciador del BDNF en els terminals nerviosos (Figura 36). Per tant, el BDNF aplicat exògenament, actua mitjançant els dos receptors TrkB i $p75^{NTR}$ per a potenciar l'alliberament de l'ACh. A més a més, existeix un acoblament entre els dos receptors, donat que el bloqueig de cadascun d'ells per separat, provoca l'aboliment total de l'efecte potenciador del BDNF.

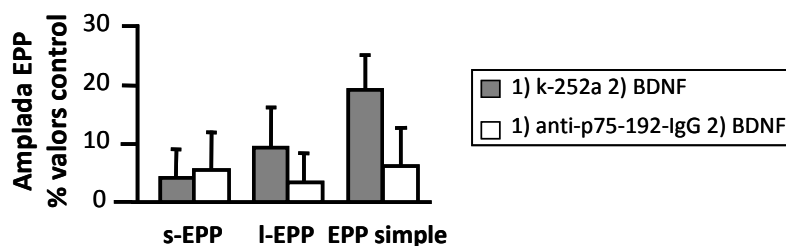


Figura 36. Bloqueig dels receptors del BDNF. L'histograma mostra la resposta dels diferents terminals nerviosos al BDNF, una vegada s'han bloquejat els receptors del BDNF: el TrkB amb la K-252a (200 nM) i el $p75^{NTR}$ amb l'anticòs anti- $p75$ -192-IgG (5 μ g/ml). El bloqueig previ dels receptors, eviten l'efecte del BDNF en els tres tipus de terminals nerviosos estudiats. Valors expressats en percentatge de canvi de l'amplada de l'EPP \pm SEM, en tots els casos $p > 0.05$, $n = 3-5$ músculs per cada tipus d'experiments i un mínim de 15 fibres per múscul.

A la Figura 37 es poden veure exemples dels registres electrofisiològics dels canvis en l'eficàcia sinàptica de la sinapsi simple (Figura 37a) i dels dos terminals de la sinapsi doble (l'EPP petit i l'EPP gran)(Figura 37c). També es mostra una sinapsi simple, que passa a ser doble pel reclutament d'una sinapsi silent (Figura 37b).

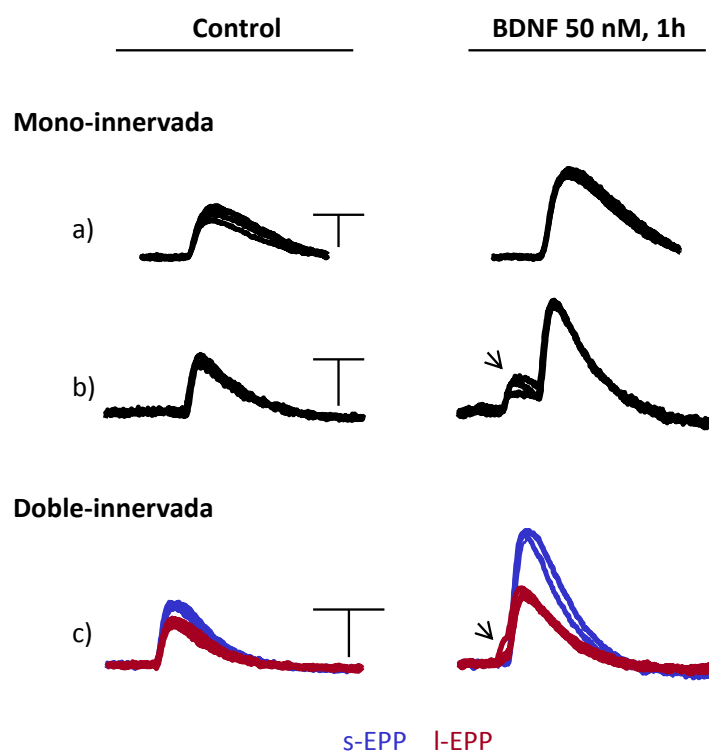


Figura 37. Exemples de registres d'EPPs en sinapsis immadures. a) Canvi en l'eficàcia d'una sinapsi mono-innervada després de l'incubació amb BDNF 50 nM-1 h. **b)** Potenciació d'una altra sinapsi simple, que es converteix en doble-innervada pel reclutament d'una sinapsi silent (fletxa). **c)** Exemple de la potenciació de l'EPP petit i gran d'una sinapsi doble que passa a ser triple pel reclutament d'un nou contacte sinàptic (fletxa). Els artefactes s'han eliminat per aconseguir claredat en els exemples. Barres horitzontals: 8 ms, barres verticals: 2,5 mVolts.

3.1.2 Efecte de l'NT-4 a la sinapsi neuromuscular

La segona NT objectiu d'estudi en aquest treball, és la neurotrofina-4 (NT-4) donat que comparteix amb el BDNF, l'alta afinitat per la unió al receptor TrkB. De la mateixa manera que amb el BDNF, i per valorar la possible implicació de l'NT-4 aplicada exògenament en el procés d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament i/o en el control local del funcionament de la NMJ, s'ha realitzat l'estudi dosidependent i temps-dependent en els tres terminals nerviosos de les NMJ neonatals i en l'adult.

3.1.2.1 Corba dosidependent i efecte en la neurotransmissió de la sinapsi doble i simple

En l'estudi dosidependent de l'NT-4 (2-4-12 nM), s'ha prè com a variable d'estudi els possibles canvis en l'amplada dels potencials de placa evocats en el nadó (EPP petit i EPP gran de la sinapsi doble i l'EPP simple) i en l'adult respecte els valors control.

Com s'observa en la Figura 38, la incubació de la preparació neuromuscular neonatal i adulta amb l'NT-4 durant 1 h a les tres concentracions testades, no modifica l'amplada dels potencials de placa evocats en el nadó ni en l'adult. Per tant, és possible que l'NT-4 no estigui implicat en la modulació de la neurotransmissió evocada en cap dels dos moments evolutius estudiats.

També s'ha realitzat l'estudi de l'afectació de la neurotransmissió espontània sense veure modificacions en la freqüència ($9.57\% \pm 6.52\%$) ni en l'amplada dels mEPPs ($6.61\% \pm 2.96$) (percentatge de variació, $p > 0.05$, $n = 3$ músculs, 15 fibres per múscul, resultats no graficats).

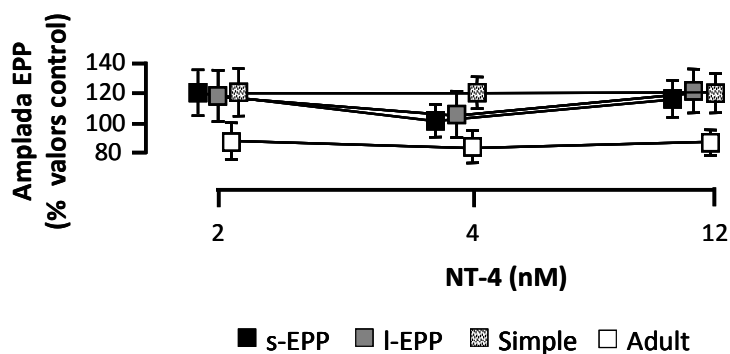


Figura 38. Corba dosiddependent de l'NT-4 en músculs neonatals i adults. Efecte del BDNF en la neurotransmissió evocada dels tres terminals nerviosos neonatals i en el terminal madur a 1 h d'incubació, a les diferents dosis testades. L'NT-4 amb aquest temps d'incubació, no exerceix cap canvi en l'amplada dels EPPs a cap de les dosis considerades. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors inicials. $p > 0.05$ en tots els casos.

3.1.2.2 Corba temps dependent

S'ha fet l'estudi temps dependent pensant que potser és necessari més temps d'incubació per veure un efecte de la NT, de la mateixa manera que ha succeït amb el BDNF. D'aquesta manera s'ha incubat 2 i 3 h a la dosi més baixa d'NT-4 (2 nM) i els resultats obtinguts es mostren a la Figura 39. Després de les 3 h, l'NT-4 (2 nM) potencia l'alliberament d'ACh en el múscul adult un 70% aproximadament. En canvi, en el cas del nadó, no hi ha cap canvi significatiu en l'amplada dels potencials de placa evocats, tot i que l'EPP simple de la sinapsi mono-innervada, presenta una certa tendència a l'increment de l'amplada.

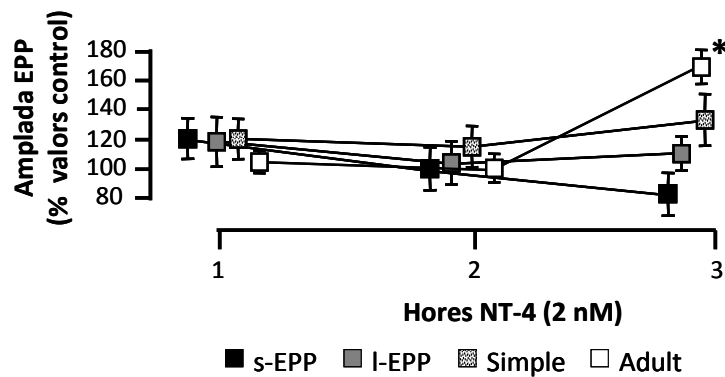


Figura 39. Corba temps dependent de l'NT-4 en músculs neonatals i adults. S'han estudiat els canvis en l'amplada dels EPPs produïts per l'NT-4 (2 nM) a temps més llargs d'exposició (1, 2 i 3 h). La figura mostra un increment significatiu en l'amplada del terminal madur a les 3 h. Els valors s'han expressat en mitjana ± SEM. n = 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors control.

Amb la intenció de conèixer si l'efecte progressiu de l'NT-4 pot estar responant a possibles demandes sinàptiques durant el procés de maduració sinàptica, s'han representat en un histograma (Figura 40) les dades obtingudes fins al moment, als diferents moments evolutius. El que s'observa és que la NMJ incrementa progressivament la sensibilitat a l'NT-4, presentant un increment gradual en l'alliberament d'ACh. Per tant, suggereix que l'NT-4 té un paper en la maduració o manteniment més que en el procés de desenvolupament en la NMJ.

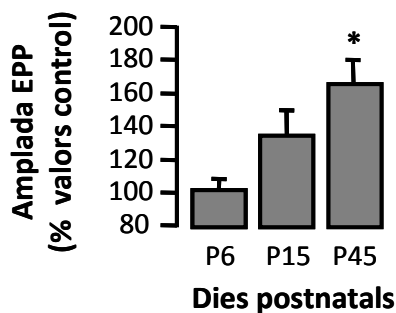


Figura 40. Representació de l'efecte creixent de l'NT-4. L'histograma mostra la sensibilitat gradual que va adquirint l'alliberament d'ACh a l'NT-4 (2 nM) a mesura que el sistema madura als dies P6, P15 i P45. El valor a l'edat P6 s'ha obtingut a partir de la mitjana dels registres dels EPPs petit i gran, i l'EPP simple. n = 5 músculs i mínim 15 fibres per cadascun. * : $p < 0.05$ respecte els valors control.

En la Figura 41, es mostren exemples de registres abans i després de la incubació amb l'NT-4 en múscul de nadó de dues setmanes i un altre en adult. Només en el cas de l'adult, podem observar un augment de l'amplada resultat de l'increment en l'alliberament de l'ACh.

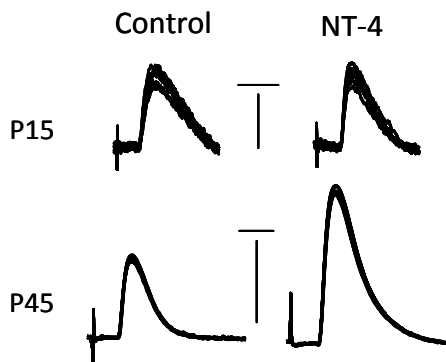


Figura 41. Exemples del canvi en l'amplada dels EPPs per l'NT-4. Comparació de la potenciació per l'NT-4 (2 nM) de l'amplada de l'EPP d'una sinapsi adulta, vers una sinapsi d'un animal de dues setmanes. Registre superior: barres verticals: 4 mVolts, barres horitzontals: 20 ms; Registre inferior: barres verticals: 20 mVolts, barres horitzontals: 4 ms.

Per tant, es pot afirmar que l'NT-4, tot i ser present a la NMJ en el període de desenvolupament postnatal com s'ha confirmat amb el Western Blot i la immunohistoquímica, no modula el procés de competició en l'eliminació sinàptica. I no és fins a l'edat adulta, que té un paper actiu en el control i manteniment de la NMJ.

3.1.3 Efecte de l'NT-3 a la sinapsi neuromuscular

La tercera i última NT objectiu d'estudi en aquest treball és l'NT-3, que comparteix el receptor de baixa afinitat $p75^{\text{NTR}}$ amb la resta de les NTs. Amb la finalitat d'estudiar la possible implicació de l'NT-3 en el procés d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament i/o en el control local del funcionament de la NMJ, s'han realitzat diferents experiments funcionals utilitzant la metodologia electrofisiològica. Els resultats que s'han obtingut es detallen a continuació.

3.1.3.1 Corba dosidependent

De la mateixa manera que amb les demás NTs, s'ha realitzat la corba dosidependent prenent les següents concentracions d'NT-3: 10-50-100-200 nM. L'NT-3 s'ha afegit al bany del múscul durant 1 h i després s'han valorat el contingut quàntic de la neurotransmissió evocada i la freqüència dels potencials de placa miniatures espontanis (mEPPs) en el múscul adult.

A la Figura 42 es mostra aquesta corba, on no s'aprecien canvis en cap dels paràmetres estudiats del múscul adult, a cap de les dosis d'NT-3 valorades. Per tant, l'NT-3 no exerceix cap efecte a 1 h d'incubació en el funcionament de la NMJ adulta.

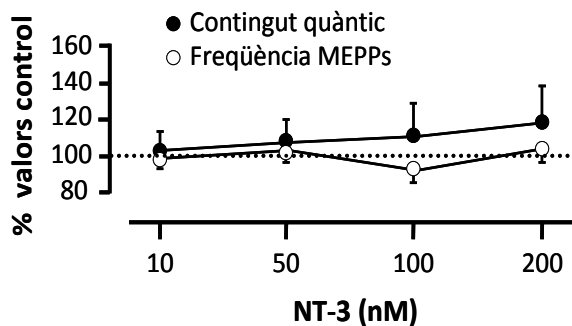


Figura 42. Corba dosidependent de l'NT-3 en músculs adults. S'han avaluat les diferències respecte els valors controls, en el contingut quàntic i la freqüència dels mEPPs en sinapsis adultes. S'han valorat diferents concentracions (10, 50, 100 i 200 nM) a 1 h

d'incubació. No s'han observat canvis en cap dels paràmetres estudiats. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * : $p < 0.05$ respecte els valors inicials. En tots els casos $p > 0.05$.

3.1.3.2 Corba temps dependent

Veient aquesta invariabilitat a 1 h de tractament, s'han valorat els mateixos paràmetres a les 3 h d'incubació a la dosi més alta (NT-3 200 nM; Figura 43), sense observar canvis altre cop, en el contingut quàntic i la freqüència dels mEPPs. D'aquesta manera, s'afirma que l'NT-3 no modula la neurotransmissió en la NMJ adulta.

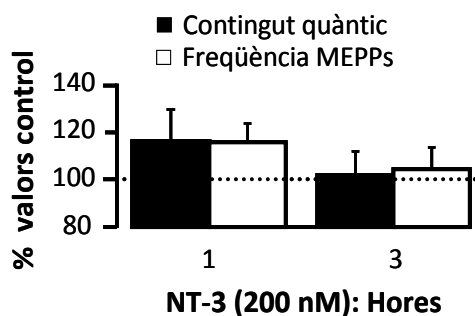


Figura 43. Corba temps dependent de l'NT-3 en músculs adults. S'han avaluat les diferències respecte els valors controls, en el contingut quàntic i la freqüència dels mEPPs en sinapsis adultes. S'han valorat dos temps d'incubació (1 i 3 h) de l'NT-3 (200 nM). No s'han observat canvis en cap dels paràmetres estudiats. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, *: $p < 0.05$ respecte els valors inicials. En tots els casos $p > 0.05$.

3.1.3.3 Efecte de l'NT-3 en la neurotransmissió de la sinapsi doble i simple

En l'estudi de l'efecte de l'NT-3 en músculs P6, s'han valorat les amplitudes dels EPPs petit i gran de la sinapsi doble i l'EPP simple de la sinapsi mono-innervada. Després d'1 h de tractament a la dosi alta (200 nM), l'NT-3 incrementa significativament l'amplada dels dos terminals de la sinapsi doble (l'EPP petit un 70% i EPP gran un 50%), mentre que no modifica el terminal simple més madur, així com tampoc la neurotransmissió en l'adult (Figura 44).

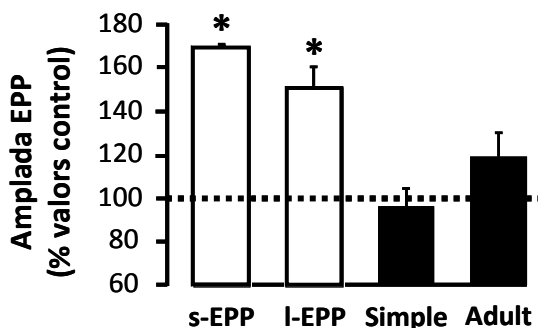


Figura 44. Efecte del l'NT-3 en la neurotransmissió evocada dels terminals immadurs i adults. L'histograma mostra els canvis en l'amplada dels EPPs dels terminals nerviosos immadurs (EPPs petit, gran i simple) i EPP d'adult. L'NT-3 (200 nM) a 1 h potencia la neurotransmissió ens els dos terminals estudiats de la sinapsi doble-innervada mentre que les sinapsis mono-innervada i adulta, no es veuen afectades. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul, * indica $p < 0.05$ respecte els valors control.

A la Figura 45 es poden veure diferents registres electrofisiològics que exemplifiquen aquests canvis en els EPPs. Concretament s'observa com els dos terminals nerviosos de la sinapsi doble es potencien, mentre que el terminal de la sinapsi mono-innervada, resta invariable davant de l'NT-3.

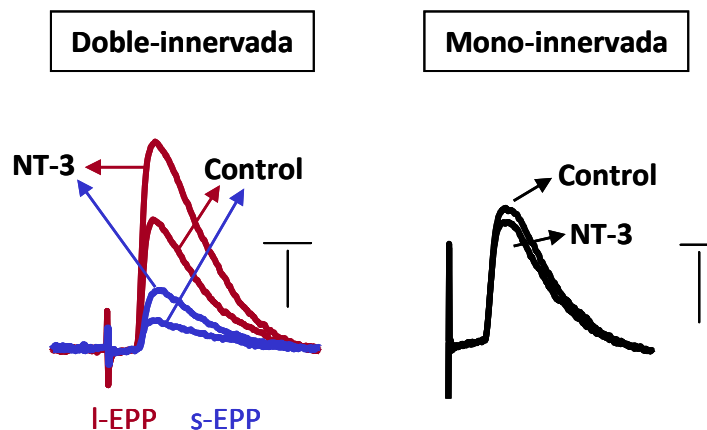


Figura 45. Exemples del canvi en l'amplada dels EPPs per l'NT-3. En el cas de la sinapsi dobleinnervada s'observa l'efecte potenciador de l'NT-3 (200 nM) per l'increment en l'amplada dels EPPs petit i gran a 1 h d'incubació. En el cas de la sinapsi mono-innervada no hi ha diferències respecte el control. Barres verticals: 5 mVolts, barres horitzontals: 5 ms.

En resum, els resultats exposats fins ara referents a l'estudi de la implicació de les diferents NTs BDNF, NT-4 i NT-3 en múscul *ex vivo* de rata postnatal i adulta, mostren una variabilitat important d'efectes. Concretament, el BDNF pot potenciar l'alliberament d'ACh en tots els terminals nerviosos durant el desenvolupament i en l'adult. Per altra banda, l'NT-4 potencia únicament els terminals madurs en l'adult tot i que es troba present en la NMJ postnatal. En quan a l'NT-3, incrementa la neurotransmissió únicament en els terminals nerviosos immadurs de les plaques doble-innervades, que es troben en competició axonal per establir-se durant el desenvolupament, tot i que l'NT-3 en l'edat adulta també s'ha localitzat a la placa

motora. Aquest efecte de les tres NTs, s'ha resumit en la Figura 46 que es presenta a continuació.

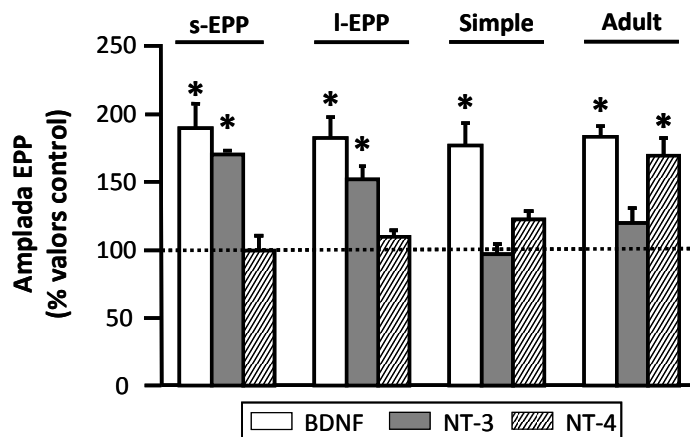


Figura 46. Histograma-resum dels efectes del BDNF, l'NT4 i l'NT3 en les amplades dels EPPs de les sinapsis immadures i adultes. S'han representat les modificacions en les amplades dels diferents terminals nerviosos després de la incubació amb BDNF (nadó: 50 nM, 1h i adult: 10 nM, 3 h), NT-4 (2 nM, 3 h) i NT-3 (200 nM, 1 h). S'observen les diferències entre les diferents NTs. Mentre el BDNF potencia a totes les edats evolutives, l'NT-3 ho fa en les sinapsis més immadures del nadó i l'NT-4 en l'edat adulta. Els valors s'han expressat en mitjana \pm SEM. * indica $p < 0.05$ respecte les amplades control.

3.2 Implicació del BDNF en el procés d'eliminació sinàptica

Donat que el BDNF sembla jugar un paper més general, afectant la neurotransmissió en totes les sinapsis, independentment del seu nivell de maduració (en el nadó i en l'adult), s'ha aprofundit en l'estudi de la implicació d'aquesta en el període de l'eliminació sinàptica durant el desenvolupament de la NMJ. Per a assolir tal objectiu s'han valorat els canvis en l'Índex de poli-innervació (PI), les modificacions de les distribucions de les NMJ en funció del número d'axons per fibra muscular, la

possible relació del BDNF amb la PKC i el VDCC tipus L i per últim una aproximació al comportament dels receptors del BDNF, el TrkB i el P75^{NTR}.

3.2.1 Efecte del BDNF en l'Índex de poli-innervació

L'estudi del PI pot proporcionar dades sobre el reclutament sinàptic de terminals silents, indicador del retràs en l'eliminació sinàptica, o bé al contrari l'acceleració d'aquest procés. Així, s'ha incubat el múscul neonatal amb BDNF per estudiar les possibles modificacions en el PI. A la Figura 47 es mostren els canvis observats en les diferents situacions experimentals. Es pot observar un increment significatiu (del 30-40% aproximadament) en el PI després d'1 h d'incubació a la dosi alta (50 nM) i després de 3 h en presència de BDNF 10 nM. Això indica que la NT és capaç de reclutar terminals nerviosos silents que es troben en procés de retracció i eliminació per a convertir-les en funcionals altre cop. Aquest efecte reclutador, es neutralitza amb la incubació prèvia de la K-252a (3.96 % \pm 1.25 de canvi, $p > 0,05$) però no amb l'anticòs anti-p75-192-IgG (30 % \pm 2.29, $p < 0,05$) el que suggereix algun tipus d'especialització de la via BDNF-TrkB en l'estabilització de les sinapsis silents, independent de l'alliberament del neurotransmissor.

Sorprenentment, a les 3 h d'incubació amb BDNF 50 nM, no s'observen canvis en el PI respecte els valors inicials a temps 0, el que fa pensar que els terminals nerviosos reclutats (1h, 50 nM) es perden després d'un període de temps, evidenciant l'efecte transitori del BDNF. També s'han realitzat experiments valorant el PI amb l'NT-4 i l'NT-3 però no s'han obtingut canvis significatius. Per tant aquest reclutament és específic pel BDNF.

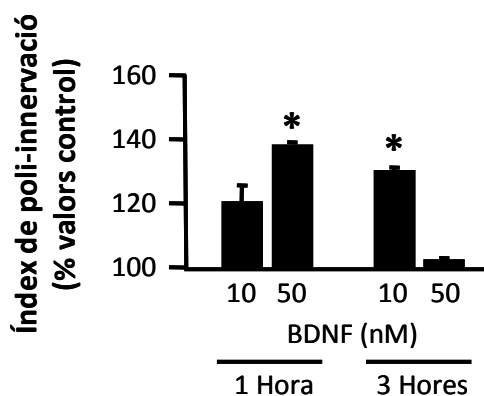


Figura 47. Efecte del BDNF en l'índex de poli-innervació. El PI incrementa després de la incubació amb BDNF 50 nM-1 h i després de BDNF 10 nM-3 h. Després d'incubar 3 h a la dosi alta no hi ha canvis en el PI respecte els valors inicials a temps 0. Aquests resultats suggereixen que l'efecte reclutador del BDNF és transitori. n= 5 músculs, mínim 15 fibres per múscul,*indica p < 0.05 respecte els valors control.

A la Figura 37 es mostren exemples de registre d'una fibra mono-innervada que es converteix en doble pel reclutament d'un contacte sinàptic silent (fletxa Figura 37b). També s'exemplifica el cas d'una doble que es converteix en triple pel mateix motiu (fletxa Figura 37c). Així, el BDNF és capaç de reclutar nous contactes sinàptics funcionals però després no s'estableixen com a definitius i s'acaben retraient i eliminant d'igual manera. Per tant, el BDNF pot captar contactes silents en vies d'eliminació i reduir la velocitat a la que es dona la desconexió d'alguns axons, però no prevenir-la.

3.2.2 Efecte del BDNF en la distribució de les plaques motores segons el número de contactes sinàptics

Com ja s'ha dit anteriorment, en el període de desenvolupament, les NMJ es troben multi-innervades i fins i tot no és difícil trobar una cèl·lula muscular innervada per cinc axons diferents. Amb el pas del temps, la situació final és la mono-innervació, per tant, els percentatges de sinapsis simples, dobles, triples i de més terminals nerviosos, van oscil·lant fins arribar a la maduresa on cada fibra muscular resta mono-innervada. Sabent que el BDNF incrementa el PI, s'ha volgut conèixer de quina manera es poden veure modificats aquests percentatges, és a dir, quin tipus de sinapsis incrementen en número i en detriment de quines altres.

A la Figura 48A i 48B, es mostren les distribucions dels percentatges de les NMJ sense tractar, a dos moments postnatsals que serviran de referent per a les situacions experimentals, avaluades amb animals P6-P7. Conèixer el perfil de la distribució en un moment anterior (als 2-3 dies postnatsals, P2-P3), permetrà observar i comparar si l'acció d'alguna de les drogues utilitzades, pot provocar la recuperació del perfil de la distribució. Així a P2-P3 (Figura 48A), s'observa un percentatge major de sinapsis dobles, triples i quàdruples a diferència de P6-P7 (Figura 48B), que de manera significativa presenten més sinapsis simples, degut al procés d'eliminació sinàptica ($p < 0.05$ respecte P2-P3, $n = 5$ músculs, mínim 15 fibres per múscul).

A la resta d'histogrames de la Figura 48, es mostren les distribucions dels percentatges de les diferents NMJ en cadascun dels tractaments realitzats (10 i 50 nM a 1 i 3 h). S'observa que el percentatge de les sinapsis simples és significativament menor ($*p < 0.05$ respecte P6-P7) que en el control P6-P7 en les situacions de la Figura 48D i 48E, degut a que algunes d'elles han passat a ser multi-innervades després del reclutament. També hi ha un increment paral·lel de les NMJ multi-innervades. Aquest patró implica per un costat la transició de les sinapsis dobles a triples o més, i per l'altre la transició de les simples a dobles. A més a més, comparant la distribució control a P2-P3 (Figura 48A) amb les distribucions a 10 nM 3 h (Figura 48D) i 50 nM 1 h (Figura 48E), es pot afirmar que els percentatges no difereixen ($p > 0.05$) Així, el reclutament axonal induït pel BDNF, restableix el número de contactes sinàptics, propis dels primers dies de desenvolupament (de 6-7 dies a 2-3 dies postnatsals). De la Figura 48C cal destacar que mentre el BDNF 10 nM 1 h no exerceix cap canvi significatiu en el PI i l'amplada dels EPPs, es comencen a veure alguns efectes inicials ja que el percentatge de les sinapsis triples (respecte el múscul P6-P7) incrementa significativament. En la situació BDNF 50 nM 3 h, l'efecte no es pot sostenir més i la distribució retorna completament a valors controls de 6-7 dies, recobrant altre cop la diferència significativa amb el percentatge de sinapsis simples respecte als 2-3 dies (Figura 48F).

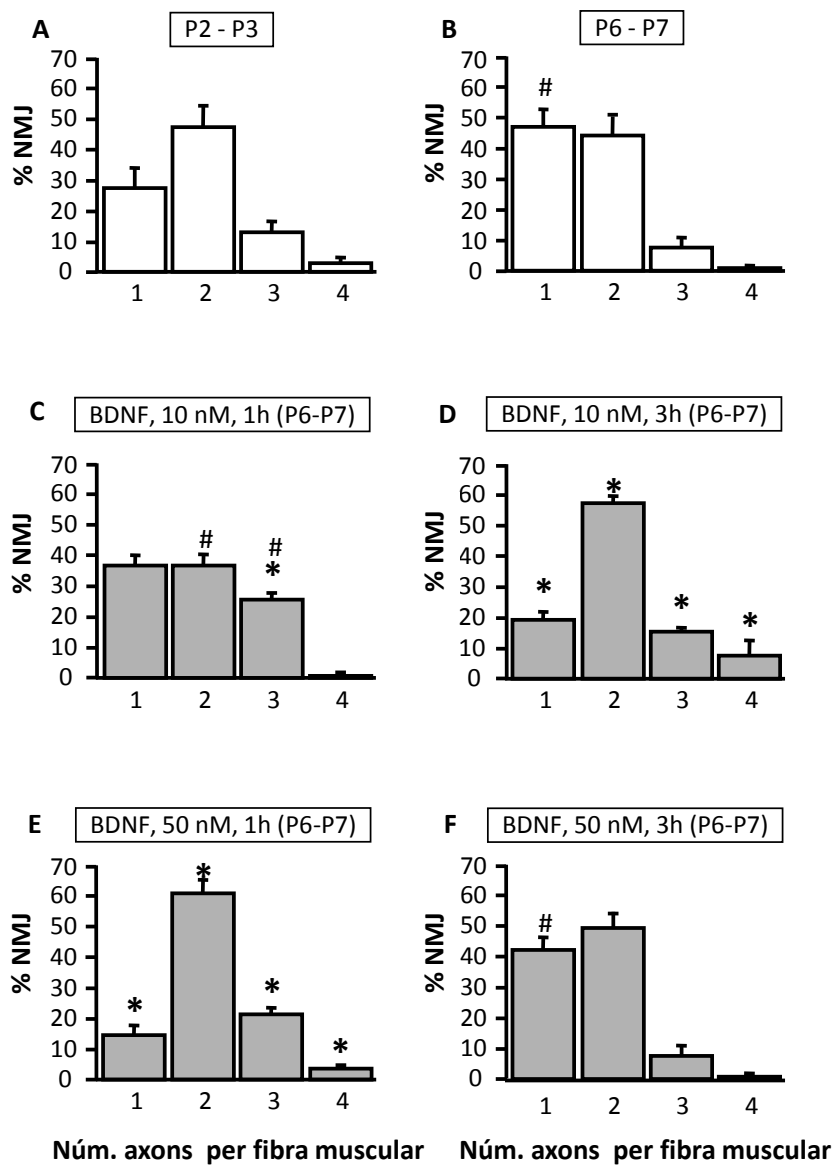


Figura 48. Distribució dels percentatges del número d'axons per fibra muscular en diferents tractaments de BDNF. A) Distribució control als 2-3 dies postnats. **B)** Distribució control als 6-7 dies postnats. A l'edat P6-P7 s'observa un increment significatiu de les sinapsis simples respecte el control P2-P3, degut al procés d'eliminació sinàptica. Després del tractament BDNF 10 nM-3 h **(D)** i BDNF 50 nM-1 h **(E)**, i degut al reclutament de nous terminals nerviosos, s'observa una reducció en el percentatge de sinapsis simples i l'increment de les NMJ de més de dos axons comparat amb el control a P6-P7 ($p < 0.05$). També s'observa que aquestes dues distribucions no presenten diferències envers el control a P2-P3 ($p > 0.05$) el que significa que s'ha tornat a estadis previs en el desenvolupament. Després de 3 h d'incubació a 50 nM **(F)**, no hi ha canvis respecte els valors control P6-P7, el que indica la desconexió final dels axons reclutats prèviament pel BDNF. Per cada tipus d'experiment, $n = 150-600$ sinapsis de 10-40 músculs neonatals. * indica $p < 0.05$, vs. P6-P7; # indica $p < 0.05$, vs. P2-P3.

Per tant, el BDNF permet el reclutament de contactes sinàptics silents, modificant la distribució dels percentatges de NMJ. No obstant, aquest efecte és transitori donat que a les 3 h d'incubació a la dosi alta, la distribució retorna als valors controls.

3.2.3 Relació entre el BDNF, la PKC i el VDCC tipus L

Amb els resultats obtinguts fins al moment, es descriu un rol del BDNF en la modulació de la neurotransmissió donat que potencia l'alliberament d'ACh en els diferents moments evolutius estudiats. Amb el BDNF també s'ha observat un efecte en el reclutament de nous contactes sinàptics funcionals (increment del PI un 30-40 %), reduint la velocitat a la que es dona la desconexió sinàptica. Per altra banda el BDNF modifica la distribució dels percentatges de NMJ, classificades segons el número de terminals nerviosos per fibra muscular. Encara és fosc com això succeeix i quines són les molècules implicades en aquests efectes. Tot i així, es pot pensar que el BDNF podria estar actuant sobre alguna o algunes de les molècules, com la PKC i els VDCCs descrites anteriorment, com a moduladores en el procés de l'eliminació sinàptica durant el període de desenvolupament.

En estudis previs en el nostre laboratori, s'ha relacionat la PKC (que és dependent de Ca^{2+}) i els VDCCs (Santafé i cols., 2001, 2002, 2007) en un mecanisme inhibitor de l'alliberament d'ACh, durant el procés d'eliminació sinàptica. Quan aquest mecanisme es troba actiu provoca una disminució de l'alliberament d'ACh i la desconexió funcional d'alguns dels contactes sinàptics. Pel contrari, en el moment en que aquesta via s'inactiva s'observa el reclutament de sinapsis silents en vies de retracció, incrementant el PI un 50%. Per tant, aquestes molècules ja descrites, podrien ser bones candidates a l'hora d'estudiar els possibles efectors de l'activitat del BDNF.

S'han escollit la PKC i el VDCC tipus L, donat que és l'únic canal de Ca^{2+} present únicament en els terminals nerviosos de la sinapsi doble-innervada, pel que el seu rol sembla ser específic en la competició axonal. Donada la transcendència del ió Ca^{2+} en la neurotransmissió i l'eliminació sinàptica, també s'ha estudiat si l'efecte del BDNF esdevé o requereix del Ca^{2+} , per això s'ha treballat amb medi d'alt Mg^{2+} . S'han fet experiments farmacològics modificant l'activitat de les diferents molècules estudiades (bloqueig de la PKC amb CaC, bloqueig del VDCC tipus L amb nitrendipina i baixa concentració de Ca^{2+} amb medi d'alt Mg^{2+}), per valorar posteriorment si el BDNF és capaç d'exercir el seu efecte modulador del PI i de les distribucions de les NMJ. Amb aquest tipus d'experiments realitzats amb dobles incubacions, es poden evidenciar efectes oclusors entre els diferents tractaments, donant idea de possibles relacions entre l'activitat de les diferents molècules, o descriure possibles efectors entre els diferents fenòmens.

A la Figura 49, es mostren les modificacions de les distribucions en les diferents situacions treballades. En l'histograma 49A, es mostren el control a P6-P7 amb el que es faran les comparacions posteriors. A la segona filera d'histogrames (49B) s'observen els efectes del BDNF (50 nM-1 h), de l'alt Mg^{2+} (500 μM), del bloqueig del VDCC tipus L amb la nitrendipina (1 μM -1 h) i del bloqueig de la PKC amb CaC (1 μM -1 h). Cal dir que les comparacions s'han fet respecte el control sense tractar (Figura 49A). En els experiments en els que s'ha realitzat un únic tractament amb el BDNF, elevant la concentració de Mg^{2+} , amb la nitrendipina (blocadora del canal L) o amb la Calfosteïna C (CaC, blocadora de la PKC), s'han obtingut efectes molt semblants en la distribució resultant. S'ha observat una disminució en el total de sinapsis simples (les més madures en el nadó), i un increment en el número de sinapsis més immadures com les dobles, triples i quàdruples (Figura 49B). Això és indicador d'un augment en el PI i per tant de reclutament de sinapsis silents com ja es porta comentant anteriorment.

En articles propis ja publicats, s'ha vist que els efectes de l'alt Mg^{2+} , la nitrendipina i la CaC en el reclutament axonal són perdurables en el temps (Santafé i cols., 2007) a diferència del BDNF, que permet canvis en la distribució de manera

temporal. A la Figura 49C es mostren les distribucions dels percentatges de les sinapsis una vegada ja s'han realitzat les dobles incubacions amb el BDNF. S'observa com el BDNF pot exercir el seu efecte per sobre de l'obtingut amb el medi d'alt Mg^{2+} i incrementar considerablement el PI, reflexat en la reducció del percentatge de sinapsis simples, i el paral·lel increment en el percentatge de sinapsis multi-innervades (Figura 49A). Per altra banda, la incubació prèvia amb nitrendipina o CaC anul·len el posterior efecte del BDNF. Així, únicament quan la primera incubació es realitza amb alt Mg^{2+} , el BDNF és capaç de reclutar contactes sinàptics silents (Figura 49B). Per a facilitar l'enteniment, ens els requadres es mostra el valor absolut del PI, que creix en les diferents situacions estudiades, el que és senyal del retard en el procés d'eliminació sinàptica (la diferència envers el PI del control P6-P7 és significatiu en tots els casos, $p < 0.05$).

Aquests resultats suggereixen, que la via de senyalització desencadenada pel BDNF pot estar relacionada amb l'activitat de les diferents molècules tractades (PKC i canal de calci L), ja que s'ha vist l'efecte ocluser entre aquests dos tractaments. Per tant, a l'hora d'apuntar possibles efectors de l'efecte potenciador de la neurotransmissió i reclutador de sinapsis silents del BDNF, podrien ser-ne candidats la PKC, el VDCC tipus L i molt possiblement els mAChRs, donat que s'ha descrit que es comporten de la mateixa manera en altres estudis realitzats (Santafé i cols., 2004). També s'extreu dels resultats, que en part, l'efecte del BDNF no és dependent de Ca^{2+} en la seva totalitat, ja que en situacions de baix Ca^{2+} , és capaç de seguir reclutant terminals nerviosos silents. Així, podria ser que el BDNF estigués actuant a diferents nivells, un d'ells independent del Ca^{2+} i l'altre dependent, donat que la PKC depèn del ió i el VDCC tipus L, li permet l'entrada.

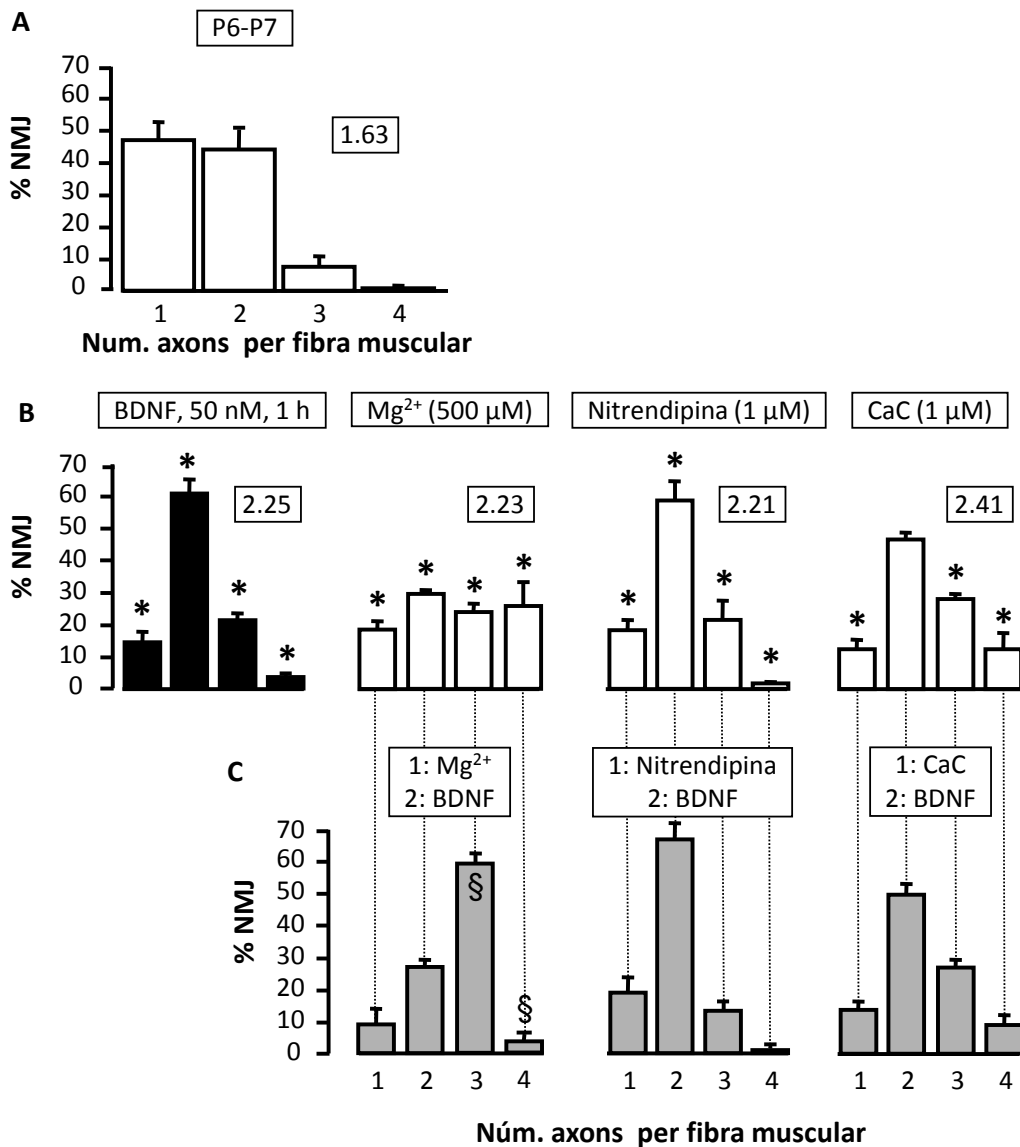


Figura 49. Efecte del BDNF en les distribucions, després de la manipulació de l'activitat de la PKC, la reducció de l'entrada de Ca²⁺ intracel·lular i el bloqueig del canal de calci tipus L. En l'histograma **A**) es mostren el control a P6-P7 amb el que es faran les comparacions posteriors. En els requadres s'especifica el PI. A la segona filera d'histogrames (**B**) s'observen els efectes del BDNF (50 nM), de l'alt Mg²⁺ (500 μM), del bloqueig del VDCC tipus L amb la nitrendipina (1 μM) i del bloqueig d la PKC amb CaC (1 μM) a 1 h i respecte el control (**A**). En el cas del BDNF, i com ja s'ha descrit anteriorment, hi ha un increment significatiu en el PI que es tradueix pel creixement en el número de les sinapsis dobles, triples i quàdruples, mentre que les simples disminueixen. El Mg²⁺ provoca l'increment de les sinapsis triples i quàdruples mentre que disminueixen les simples. La nitrendipina i la CaC aconseguen un canvi en la distribució i en el PI molt semblants al BDNF. A la tercera filera d'histogrames es mostren els resultats

obtinguts amb les dobles incubacions. Després de l'efecte del Mg^{2+} , el BDNF és capaç de reclutar més contactes silencis, incrementant el percentatge de sinapsis triples. En el cas del bloqueig previ de la PKC i el VDCC tipus L, aquest anul·la l'efecte reclutador del BDNF. * indica $p < 0.05$ respecte els valors controls a P6–P7. § indica $p < 0.05$ respecte la primera incubació.

3.2.4 Efecte del BDNF endogen en la neurotransmissió neonatal

Per concloure, s'ha volgut estudiar el paper del BDNF endogen, entenent-lo com a la NT fisiològica, produïda pel propi sistema, ja que fins ara els diferents experiments han estat duts a terme amb el BDNF comercial afegit al medi. Per estudiar el rol fisiològic del BDNF del sistema present a la NMJ neonatal, que havent vist els resultats anteriors, probablement estigui relacionat amb la transmissió i maduració sinàptiques durant el període de desenvolupament, s'han realitzat diferents experiments. Com ja s'ha vist en resultats anteriors, l'NT-4 no està implicada en la neurotransmissió neonatal, per tant, cal tenir en compte que aquests resultats fan referència al l'activitat del BDNF en tots els casos.

S'han bloquejat els seus dos receptors, el TrkB amb el compost químic K-252a i el $p75^{NTR}$ amb l'anticòs anti-p75-192-IgG, per a neutralitzar la via de senyalització mediada pels receptors TrkB i pel $p75^{NTR}$ respectivament. En aquets experiments, s'han valorat els mateixos terminals estudiats fins al moment: l'EPP petit i l'EPP gran de la sinapsi doble i l'EPP de la simple. Com es pot veure en la Figura 50, el fet d'impedir la unió del BDNF (NT-4 no implicada) al TrkB (K-252a) provoca uns canvis inesperats en la neurotransmissió, un increment en l'amplada de l'EPP gran de la sinapsi doble i de l'EPP simple, mentre que l'EPP petit no varia la seva activitat. Tanmateix, l'anticòs anti-p75-192-IgG redueix uniformement l'alliberament en tots els terminals nerviosos.

En una altra bateria d'experiments, s'ha utilitzat la proteïna de fusió TrkB-IgG que imita el receptor TrkB en funcions i capta el BDNF/NT-4 endògens, impeding-los la unió als receptors del sistema i la posterior senyalització. Com que la TrkB-IgG, està segrestant el BDNF i l'NT-4, s'està veient quina és la repercussió de la falta de

senyalització pels receptors TrkB i el p75^{NTR}. Els resultats mostren un increment significatiu en l'amplada de l'EPP gran, mentre que l'EPP petit i la simple no varien. Aquests resultats suggereixen que els receptors TrkB i p75^{NTR}, podrien estar desencadenant mecanismes diferents en les sinapsis postnatales depenent del seu nivell maduratiu.

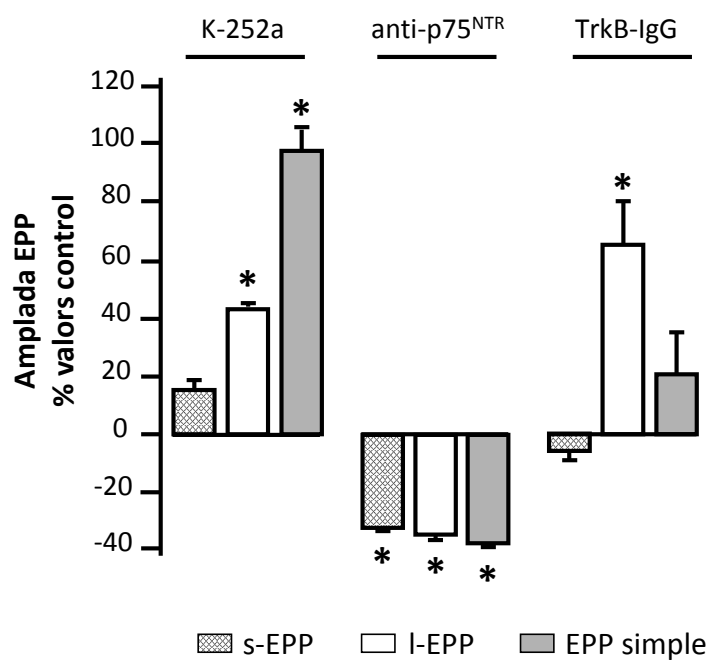


Figura 50. Efecte del BDNF endogen en la transmissió neuromuscular. S'ha bloquejat el receptor TrkB (K-252a, 200 nM) i el p75^{NTR} (anticòs anti-p75-192-IgG, 5 µg·ml⁻¹). També s'ha utilitzat la quimera TrkB-IgG (1µg·ml⁻¹) per a anul·lar les NTs BDNF i NT-4 del sistema. S'han valorat els canvis en la neurotransmissió de l'EPP petit i gran de la sinapsi doble-innervada i el terminal simple de la mono-innervada després de 3 h d'incubació. La prevenció farmacològica de l'acció del BDNF i l'NT-4 endògens, afecta de diferent manera els terminals de la sinapsi doble: mentre incrementa significativament l'amplada de l'EPP gran, l'EPP petit no presenta canvis en l'alliberament de l'ACh. Per altra banda, l'anticòs contra el p75^{NTR} redueix l'alliberació en tots els terminals nerviosos. Per cada tipus d'experiment n = 5 músculs amb un mínim de 15 fibres per múscul. * indica $p < 0.05$ respecte els valors control.

A més a més d'avaluar la neurotransmissió, també s'ha estudiat el PI, per això s'han realitzat incubacions d'1 h de durada amb cadascun dels compostos utilitzats, observant que ni la K-252a (variació màxima 2.60 %), ni l'anticòs anti-p75-192-IgG (variació màxima 8.27%), ni la proteïna de fusió TrkB-IgG (variació màxima 5.42%) modifiquen el PI (en tots els casos $p > 0.05$ respecte els valors inicials). A més a més, s'han realitzat experiments amb temps d'exposició superiors (3 h) per als diferents tractaments, i no s'han vist diferències respecte als valors obtinguts a 1 h.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

V- DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

El desenvolupament i el manteniment dels circuits neurals es troben estretament relacionats amb la teoria del suport neurotròfic. Les neurotrofines (NTs) són considerades proteïnes que tenen un paper clau modulant la supervivència de la cèl·lula nerviosa durant el desenvolupament, l'excitabilitat neuronal i l'eficàcia sinàptica (Gonzalez i Collins, 1997; Poo, 2001). El paper dels factors tròfics i dels seus receptors, en la modulació de l'alliberament i de l'eliminació sinàptica durant el desenvolupament i el manteniment de la sinapsi, no es coneix amb exactitud. Les cèl·lules musculars alliberen quantitats limitades de factors neurotròfics per mantenir la sinapsi, l'axó que en capti la major quantitat, serà el més actiu i fort, i per tant serà el que persistirà en el procés d'eliminació sinàptica (Snider i Lichtman, 1996). En aquesta tesi s'ha contribuït en l'estudi de la distribució de les NTs i els seus receptors en la NMJ, i en descriure una mica millor el seu paper en la regulació per un costat de la neurotransmissió neonatal i adulta, i per l'altre, la seva relació amb el procés d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament

1. Expressió i localització de les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 i els receptors TrkB, TrkC i p75^{NTR} en la sinapsi neuromuscular

Diferents grups d'investigadors, han utilitzat l'anàlisi per Northern blot, hibridació *in situ* i altres tècniques, per detectar l'mRNA de les NTs i els seus receptors. D'altres amb la utilització del Western blot i la immunohistoquímica (IHQ), han descrit l'expressió i presència de les proteïnes d'interès en el múscul i en el teixit nerviós de rates adultes i neonatals (Funakoshi i cols. 1993, 1995; Gonzalez i cols., 1999; Griesbeck i cols., 1995; Ip i cols., 2001; Pitts i cols., 2006). En quant a treballs que estudiïn la localització de les NTs i els seus receptors en el sistema neuromuscular, s'ha vist que no n'hi ha masses. Per tant, fins ara hi ha pocs estudis que hagin treballat amb la localització de les NTs en el sistema neuromuscular esquelètic, i encara n'hi ha

menys que ho facin de manera precisa en els diferents components cel·lulars de la NMJ.

Experimentalment, en aquesta tesi, mitjançant el Western blot s'ha estudiat l'especificitat dels anticossos utilitzats i la presència de les NTs i els seus receptors en els homogeneïtzats de múscul neonatal (P6-P7) i adult (P30-P45). A més a més, amb la utilització del la IHQ convencional i el processament per a l'obtenció de seccions semifines, s'ha pogut discernir en la localització de les tres NTs i els seus receptors, en els tres elements cel·lulars de la NMJ (el component presinàptic o cèl·lula nerviosa, el component postsinàptic o cèl·lula muscular i la cèl·lula glial o de Schwann). Aquesta metodologia s'utilitza amb regularitat en el nostre laboratori, i es té la certesa de que les tècniques emprades, proporcionen resultats fiables. Abans de realitzar les IHQs convencionals o per seccions semifines amb la finalitat de localitzar les diferents proteïnes d'interès, s'ha testat l'especificitat dels anticossos. Per a tal fi, s'han fet diversos controls, per tenir la garantia de que presenten immunoreactivitat específica per la proteïna d'interès i que no mostren unions inespecífiques. Per un costat s'han realitzat controls en els Western Blots, incubant la membrana únicament amb l'anticòs secundari (veure l'apartat 4.2 de Material i mètodes). En cap dels casos s'han observat unions inespecífiques. Per la tècnica de la IHQ convencional i també en les seccions semifines els controls han consistit en la incubació dels anticossos secundaris per les NTs al mateix temps que els anticossos utilitzats en el marcatge de l'S-100 (informació detallada a l'apartat 3. *Material i mètodes*). En cap dels casos s'han observat reaccions creuades. Per tant, els resultats obtinguts amb les tècniques de detecció de proteïnes - Western Blot- i de localització -IHQ convencional i per seccions semifines- poden ser considerats vàlids i reproduïbles.

En els resultats obtinguts amb el Western blot, en homogeneïtzats de cervell, medul·la i múscul d'animals postnatsals i també múscul d'animals adults, en tots els casos s'ha obtingut una banda (dues en el cas del BDNF i el TrkB) de pes molecular coincident amb el pes predit per la proteïna d'interès (Figura 17 de l'apartat de

Resultats). En el cas del BDNF s'ha obtingut una banda de 30 kDa corresponent a la NT immadura i una de 14 kDa corresponent al BDNF madur. Pel que fa al TrkB la banda de 145 kDa correspon al receptor complet, mentre que la de 95 kDa correspon a la forma segmentada.

Aquests resultats coincideixen amb els d'altres autors que també han utilitzat alguns dels mateixos anticossos, detectant les mateixes bandes en homogeneïtzats de cervell i de múscul (Sakuma i cols., 2001; Wiedemann i cols., 2006). Mitjançant les tècniques Northern Blot i la hibridació in situ, s'ha observat que el BDNF, l'NT-4 i l'NT-3, s'expressen en el soma de les motoneurons, en la cèl·lula muscular esquelètica de rata adulta i postnatal, a la cèl·lula de Schwann de l'arrel dorsal i en el nervi ciàtic (Acheson i cols., 1991; Koliatsos i cols., 1993; Griesbeck i cols., 1995; Gómez-Pinilla i cols., 2001; Liem i cols., 2001; Pitts i cols., 2006). En quant als receptors, TrkB, TrkC i p75^{NTR}, s'ha vist mitjançant la utilització de les mateixes tècniques que per les NTs, que s'expressen en la cèl·lula muscular neonatal i adulta, en la cèl·lula de Schwann mielinogènica, en la medul·la espinal i al nervi ciàtic entre d'altres (Bandtlow i cols., 1987; Ernfors i cols., 1988; Acheson i cols., 1991; Funakoshi i cols., 1993; Offenhauser i cols., 1995; Heumann i cols., 1987; Koliatsos et al. 1993; McKay i cols., 1996; Gonzalez i cols., 1999).

Pel que fa a la localització de les tres NTs i els seus receptors, la utilització de la IHQ ha permès dibuixar uns patrons de localització bastant precisos. No obstant, l'obtenció de les seccions transversals semifines, ha ajudat a discernir amb molta més precisió la localització de les NTs i els seus receptors. Els resultats obtinguts mostren per primera vegada la localització simultània de cada una de les NTs i dels seus receptors, juntament amb marcadors específics de les diferents àrees sinàptiques: el component nerviós, la cèl·lula muscular i la glia de la NMJ. Les diferents NTs i els seus receptors presenten diferències en alguns casos, en quan a la seva localització i a més a més, també presenten diferències en els dos moments evolutius que s'han estudiat (als 6-7 i 30-45 dies postnatsals). Així, el BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 en el nadó es localitzen en els components pre- i postsinàptic, mentre que en l'edat adulta es troben també en la

cèl·lula de Schwann (Figures 18-23 de l'apartat de Resultats). En quant a la localització dels receptors en l'edat postnatal, el TrkB es localitza en els components pre i postsinàptic, mentre que el TrkC i el p75^{NTR} s'han localitzat en els tres components de la NMJ. A diferència del nadó, en l'edat adulta, els tres receptors es localitzen en els tres components de la NMJ (Figures 24-29 de l'apartat de Resultats). Per tant, en el desenvolupament, la localització de les NTs es limita al component pre i postsinàptic, deixant entreveure que probablement la seva senyalització tindrà funcions específiques en aquest període del desenvolupament, controlant possiblement la relació terminal nerviós/cèl·lula muscular, l'alliberament de l'ACh i possiblement el procés de l'eliminació sinàptica. La localització del receptor TrkB també es troba restringida a la cèl·lula nerviosa i muscular, suggerint certa especialització de la via de senyalització BDNF/NT-4-TrkB en aquest període.

Analitzant treballs publicats, que estudien la localització de les NTs i els seus receptors en el sistema neuromuscular, no hi ha cap esquema clar, donada la disparitat de resultats, els diferents models utilitzats i la varietat d'anticossos existents. A més a més, no hi ha cap publicació que localitzi les NTs i els seus receptors a nivell dels components cel·lulars de la NMJ. En un treball, mitjançant la tècnica ELISA s'ha detectat la presència de BDNF en les regions sinàptiques i extrasinàptiques del diafragma adult a concentracions iguals. Ara bé, en el moment de localitzar el BDNF mitjançant la tècnica d'immunofluorescència en seccions transversals del diafragma, no l'han localitzat a la zona sinàptica de les fibres musculars adultes, amb el que aquests autors conclouen que el BDNF alliberat pel múscul, no actua com a senyal retrograda de supervivència per a les neurones motores, ni té cap funció en el remodelatge i la modulació de la neurotransmissió (Mousavi i Jasmin, 2006). Els mateixos autors, han intentat localitzar transcrits de mRNA mitjançant hibridació *in situ* en diafragma de rata de 10 dies, i no l'han detectat en l'àrea sinàptica (Mousavi i Jasmin, 2006). No obstant, en el SNC el BDNF i el TrkB s'han associat a les sinapsis (Bramham i Messaoudi, 2005). Pel que fa als nostres resultats per les tècniques d'IHQ convencionals i en seccions semifines, s'ha pogut demostrar la presència de BDNF en

les sinapsis d'animals adults i neonats. De manera més concreta, el BDNF s'ha vist present en els elements pre i postsinàptics del neonat i en el cas de l'adult, s'ha observat en els tres components de la NMJ.

L' NT4 és molt abundant en múscul esquelètic i s'ha vist que pot promoure el creixement axonal en nervi ciàtic i inhibir l'agrupament de nAChR que promou l'agrina durant el desenvolupament (Funakoshi i cols., 1995; Wang i Poo, 1997). Per tant, podem trobar diferents articles que parlen d'expressió de l'NT-4 en músculs i nervis (Sakuma i cols., 2001, 2002; Omura i cols., 2005). Mitjançant la tècnica d'IHQ (Sakuma i cols., 2002) van poder localitzar NT-4 en el citosol de les fibres musculars del múscul tibialis anterior d'adult. Els nostres resultats centrats en la NMJ, permeten la localització de l'NT-4 en el terminal nerviós i la cèl·lula muscular tant en animals adults com neonatals. A més a més en l'adult, l'NT-4 també es troba present en la CS.

L'NT-3 s'ha vist implicada en promoure la supervivència com en el cas del NGF (Lindsay, 1993), i l'activitat biològica durant la diferenciació de neurones sensorials, simpàtiques i motores en el sistema nerviós perifèric (Klein i cols., 1994). Algun treball afirma que l'NT-3 és la NT més abundant en el SNC durant el desenvolupament (Maisonpierre i cols., 1990). Mitjançant l'anàlisi per Northern blot s'ha detectat una expressió força elevada d'NT-3 en múscul durant el desenvolupament embrionari i una lleugera disminució en el naixement (Griesbeck i cols., 1995). Mitjançant la tinció X-gal, l'expressió d'NT-3 també s'ha demostrat en la cèl·lula muscular a totes les edats però de forma decreixent amb el desenvolupament, des del dia embrionari 19 fins a l'edat adulta (Hess i cols., 2007). L'NT-3 també s'ha localitzat mitjançant IHQ, en les cèl·lules musculars de diafragma de rates adultes a més a més de en d'altres teixits com en l'hipocamp o el pancrees (Kato-Semba i cols., 1996). En els nostres resultats l'NT-3 s'ha localitzat en l'àrea neuromuscular. Concretament en el nadó es situen en el component pre-i postsinàptic i en l'adult en els tres elements cel·lulars de la sinapsi.

Com ja s'ha comentat, l'acció de les NTs en el teixit neural es realitza majoritàriament a través de la interacció amb els seus receptors específics (d'alta i baixa afinitat TrkB, TrkC i p75^{NTR}). Hi ha treballs que han estudiat les diferències d'expressió d'aquests receptors en les rates adultes vers les més joves, i han observat mitjançant PCR, una disminució dels receptors Trk en els ganglis de les arrels dorsals i en motoneurons (Bergman i cols., 1999; Johnson i cols., 1999). No obstant, alguns autors han obtingut resultats negatius en l'intent de localitzar per immunoreactivitat els diferents receptors TrkA, TrkB, TrkC i p75^{NTR}, en els axons intramusculars o els terminals nerviosos en tibialis anterior, gastrocnemius i soleus (Sheard i cols., 2002).

Més concretament, mitjançant el Northern Blot i la hibridació in situ, el TrkB s'ha vist present en els components pre- i postsinàptics de la NMJ i també en la CS (Frisén i cols., 1993; Funakoshi i cols., 1993). Per altra banda, mitjançant tècniques immunoreactives, s'ha localitzat el receptor TrkB al voltant dels nAChRs de la cèl·lula muscular i en els axons preterminals en esternomastoid d'animals postnats i adults (Gonzalez i cols., 1999; Pitts i cols., 2006), o en les zones sinàptiques del múscul soleus (Sakuma i cols., 2001). Un altre grup ha localitzat el TrkB en les cèl·lules musculars, concretament en la membrana dels mitocondris musculars (Wiedemann i cols., 2006). Aquests resultats concorden amb els nostres, en els que mitjançant les IHQ, podem afirmar que el TrkB es troba en la cèl·lula pre- i postsinàptica en músculs d'animals neonatals, mentre que en els adults, es localitza en els tres elements de la NMJ.

Pel que fa al TrkC, s'ha observat la seva expressió mitjançant PCR i hibridació in situ en el nervi ciàtic i en la CS de rates postnats (Offenhäuser i cols., 1995). Pel que fa a la localització, mitjançant tècniques immunoreactives s'ha trobat en el teixit connectiu intra i perimusclar de teixits musculars en desenvolupament (Sheard i cols., 2002) i en la CS terminal i mielinogènica d'animals adults i neonatals (Pitts i cols., 2006; Hess i cols., 2007). Mitjançant IHQ el localitzen a la CS terminal i mielinogènica i en el terminal i preterminal nerviosos (Hess i cols., 2007). Amb els resultats obtinguts amb les nostres IHQs convencionals i per seccions semifines, el TrkC es localitza en els tres

components de la NMJ: el presinàptic, el postsinàptic i la CS, tant en el nadó com en l'adult.

Mitjançant assajos de Northern blot, s'ha vist que el receptor $p75^{\text{NTR}}$ s'expressa en el nervi ciàtic de rates adultes (Lomen-Hoerth i Shooter, 1995). Aquest receptor també ha estat localitzat en les membranes plasmàtiques de les fibres musculars (Wiedemann i cols., 2006). En el cas dels nostres resultats, el receptor de baixa afinitat es troba, de la mateixa manera que el TrkC, present en els tres elements de la NMJ neonatal i adulta.

Així doncs, aquest treball aporta precisió i confiança en la localització de les NTs BDNF, NT-4 i NT-3 i els seus receptors TrkB, TrkC i $p75^{\text{NTR}}$ a nivell cel·lular en la NMJ adulta i neonatal. Aquestes localitzacions observades, no permeten identificar quin és l'origen de les NTs i quina és la direccionalitat de la seva senyalització. El que sí que es pot afirmar, és que juntament amb els seus receptors, les NTs es troben distribuïdes de forma pràcticament ubiqua en les tres cèl·lules de la sinapsi, encara que amb alguna diferència entre els dos moments evolutius estudiats. Específicament, en el desenvolupament, la localització de les NTs es limita al component pre- i postsinàptic, suggerint un paper rellevant en la relació d'aquests dos components durant la sinaptogènesi. En canvi, en l'adult aquestes proteïnes es troben en tots els elements, dissenyant un patró de distribució ampli, el que fa pensar en una molt alta complexitat de relacions entre les cèl·lules sinàptiques.

2. Efecte de les Neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 en la transmissió sinàptica de la NMJ

Com ja s'ha dit anteriorment, s'observen diferències moleculars i funcionals entre l'axó que genera l'EPP gran (també anomenat terminal fort) i el que genera l'EPP petit (també anomenat terminal dèbil) en les sinapsis encara doblement innervades

durant l'eliminació sinàptica (Santafé i cols., 2002; Roux i cols., 2006). Aquestes diferències d'expressió i funcionals són les que en part, faciliten la retracció del terminal més inactiu i la consolidació del més actiu. Se sap que una mateixa motoneurona realitza diferents contactes sinàptics que poden seguir camins diferents i mentre alguns s'eliminen d'altres s'acaben establint. Per tant, es pensa en l'existència de diversos fenòmens locals a nivell de cada sinapsi individual, que estarien modulant aquest procés d'eliminació sinàptica, provocant l'eliminació o la consolidació dels terminals nerviosos procedents d'un mateix axó (Keller-Peck i cols., 2001). Alguns d'aquests factors locals poden ser les NTs, que han estat estudiades durant varies dècades des del descobriment del primer factor tròfic als anys 50 per Rita Levi-Montalcini, el NGF. Aquestes NTs duen a terme els seus efectes mitjançant la seva unió als receptors Trk i al $p75^{NTR}$, que quan s'activen desencadenen efectes locals en el terminal nerviós i també efectes retrògrads en els cossos neuronals. En el cas de la preparació neuromuscular del múscul LAL *ex vivo*, amb la que s'ha treballat al llarg d'aquesta tesi per a realitzar experiments funcionals, el soma neuronal s'ha eliminat i per tant no es poden produir efectes de senyalització retrògrada. L'estudi es basa doncs, en els efectes locals de les NTs en la NMJ en el desenvolupament i en l'edat adulta. Aquesta falta del soma neuronal no ha estat un impediment en l'obtenció de resultats en treballs d'altres autors, per exemple, l'aplicació del BDNF al soma de la motoneurona en cultiu no modifica la neurotransmissió, mentre que aplicat directament a nivell de la sinapsi (amb el soma preservat o eliminat) potencia l'alliberament d'ACh (Stoop i Poo, 1995).

En la primera bateria d'experiments que s'han dut a terme, s'ha valorat l'efecte de la incubació de les diferents NTs (BDNF, NT-4 i NT-3) en l'alliberament de l'ACh en animals postnats de 6-7 dies i en adults de 30-45 dies.

En quant als efectes del BDNF, els resultats mostren una potenciació en l'alliberament de l'ACh tant a l'edat postnatal com adulta. En l'estudi dels terminals nerviosos immadurs, s'ha vist que el BDNF potencia els tres tipus de terminals estudiats: l'EPP gran i l'EPP petit de la sinapsi doble i el terminal simple de la sinapsi

mono-innervada (Figura 35 de l'apartat de Resultats). En quan a l'estudi de la neurotransmissió adulta, els resultats mostren com el BDNF pot potenciar l'alliberament d'ACh a les 3 h d'exposició a la dosis baixa (10 nM) mantenint-se l'efecte a les 5 hores d'incubació. Hi ha autors però, que afirmen que el BDNF no té cap efecte en les NMJ adultes (Todd i cols., 2007), donat que mitjançant la tècnica d'immunofluorescència no localitzen el BDNF en l'àrea sinàptica del diafragma (Mousavi i Jasmin, 2006). Altres treballs recolzen aquesta idea, ens els que s'ha vist que 45 minuts d'incubació amb BDNF, no modifiquen l'alliberació espontània i evocada de preparacions neuromusculars adultes *ex vivo* (Pousinha i cols., 2006; Roux i cols., 2006) tot i que si que han descrit altres canvis a nivell molecular (Mantilla i cols., 2004; Roux i cols., 2006). Potser la utilització de temps superiors d'exposició, hagués evidenciat l'efecte potenciador del BDNF. Com es discutirà més endavant, els temps més llargs d'incubació podrien ser necessaris per la síntesi de proteïnes a nivell del terminal nerviós o potser per permetre que la NT penetri en els teixits.

No obstant, de la mateixa manera que nosaltres, altres autors observen una potenciació en l'alliberament per efecte del BDNF. Per exemple, en cultius de NMJ de *Xenopus laevis* en desenvolupament, s'ha vist que el BDNF produeix un increment en l'amplada de les corrents evocades en qüestió de minuts i que és dependent de l'activació del receptor Trk corresponent (Lohof i cols., 1993; Stoop i Poo, 1996). També s'ha observat aquest efecte potenciador del BDNF, en condicions d'increment de l'activitat elèctrica o en condicions de despolarització en cultius de NMJ de *Xenopus laevis* (Boulanger i Poo, 1999). En el nostre model, el múscul LAL no rep estímuls intrínsecs per part del nervi, però si que rep l'estimulació elèctrica per a la mesura de l'eficàcia sinàptica, que és molt semblant a la utilitzada pel grup de Poo, en la seva estimulació crònica.

Un altre treball parla de la influència de la senyalització BDNF-Trk, en l'agrupament dels nAChRs en el component postsinàptic (Gonzalez i cols., 1999) i també en l'expressió de proteïnes que modulen l'organització neuromuscular postsinàptica, com l'agrina i la NRG (Loeb i cols., 2002; Peng i cols., 2003). En els

resultats aquí exposats, s'ha exclòs l'efecte postsinàptic de les NTs, ja que s'ha observat que el BDNF, l'NT-4 i l'NT-3 no modifiquen l'amplada dels mEPPs als temps d'incubació de 3 hores utilitzats en aquesta tesi, per tant l'afectació del BDNF en la neurotransmissió s'entén a nivell del component presinàptic.

Se sap que el BDNF pot unir-se als receptors TrkB i al $p75^{NTR}$. Per tant, l'increment en l'alliberament de l'ACh, podria venir mediat per les vies de senyalització desencadenades pels dos receptors. Per investigar quin d'ells dos està mediant l'efecte del BDNF en els terminals immadurs, s'han utilitzat blocadors dels dos receptors. En el cas del TrkB, s'ha fet servir un compost químic anomenat K-252a i pel $p75^{NTR}$ s'ha utilitzat un anticòs, l'anti-p75-192-IgG. Els resultats mostren com el bloqueig de cadascun d'ells per separat, és capaç d'inhibir l'efecte potenciador del BDNF, que s'ha afegit posteriorment al medi d'incubació. Per tant, sembla que podria donar-se algun tipus d'acoblament entre ells dos, ja que quan un d'ells es bloqueja, l'altre no és capaç de mediar l'efecte del BDNF. Aquest acoblament entre el TrkB i el $p75^{NTR}$ produiria la potenciació observada. Hi ha autors que descriuen que els receptors Trk poden interaccionar amb el $p75^{NTR}$. Concretament, s'ha vist que la co-precipitació del $p75^{NTR}$ en cultiu de cèl·lules A293 que co-expressen els receptors $p75^{NTR}$ i Trk, provoca també la co-precipitació del TrkA, TrkB i el TrkC juntament amb el $p75^{NTR}$ (Bibel i cols., 1999). El mateix grup també ha vist com la co-expressió del $p75^{NTR}$ i el TrkB, provoca un increment en l'especificitat de l'activació del TrkB pel BDNF, comparat amb l'NT-4, el que podria explicar diferències entre els efectes de les dues NTs. De la mateixa manera que la co-expressió del TrkB amb el receptor de baixa afinitat, incrementa l'especificitat del TrkB pel BDNF, el mateix succeeix amb el TrkA i l'especificitat pel NGF (Barker, 2007). En un altre estudi, la interacció $p75^{NTR}$ -TrkB modula el creixement dendrític en cultius de cèl·lules PC12 (Hartmann i cols., 2004). Per tant, com altres autors han descrit anteriorment i es veu també en aquesta tesi es confirma que, els receptors TrkB i $p75^{NTR}$ poden treballar conjuntament en la NMJ.

Pel que fa als efectes de l'NT-4 a la preparació neuromuscular neonatal, no s'han produït canvis en la neurotransmissió de les diferents sinapsis estudiades,

independentment del moment de creixement que s'ha estudiat, ja que no s'ha modificat l'amplada de cap dels EPPs. No obstant, mitjançant la tècnica d'IHQ convencional i per talls semifins, l'NT-4 s'ha localitzat a la NMJ neonatal, concretament en el terminal i preterminal nerviosos i en la cèl·lula muscular subsinàptica (Figura 20). Tot i aquesta falta d'efecte a aquesta edat neonatal, hi ha autors que afirmen que la sobreexpressió d'NT-4 a la cèl·lula muscular postsinàptica de cultius de NMJ de *Xenopus laevis* en desenvolupament, provoca una potenciació de la resposta evocada i espontània (Wang i Poo 1997; Wang i cols., 1998). Per tant, l'NT-4 no pren part en la modulació de la neurotransmissió durant el procés de competició axonal, previ a l'eliminació sinàptica. No obstant, s'han realitzat experiments funcionals amb preparacions neuromusculars d'animals més madurs de 15 dies i també d'adults. Els resultats que s'han obtingut, mostren que no s'afecta la neurotransmissió a les dues setmanes de vida, però si s'observa una potenciació de l'alliberament de l'ACh en animals de 45 dies postnatsals a les 3 hores d'incubació. Per tant, la NT estaria relacionada amb l'alliberament en l'edat adulta, possiblement en tasques de manteniment. L'efecte s'ha observat a les 3 hores d'incubació, que és el mateix temps necessari pel BDNF per tal d'obtenir l'efecte potenciador en l'edat adulta. Això fa pensar en un mecanisme comú en l'edat adulta, el que és fàcil donat que aquestes dues NTs comparteixen el receptor d'alta afinitat TrkB.

Una de les possibles explicacions del perquè es requereixen aquests temps d'incubació per a observar resposta, podria ser la necessitat de la síntesi de proteïnes a nivell del terminal nerviós, donat que en la preparació treballada, el soma de la motoneurona és eliminat. És el cas d'un treball en el que s'ha vist que la potenciació pel BDNF de la neurotransmissió en cultius de NMJ de *Xenopus laevis*, requereix síntesi proteica a nivell dels terminals nerviosos (Zhang i Poo, 2002). Altres grups que treballen amb altres models, com per exemple en rodanxes d'hipocamp, també descriuen la necessitat d'exposicions perllongades al BDNF (2.5-8 hores) per a veure'n el seu efecte (Patterson i cols., 1996; Figuero i cols., 1996). Una altra explicació de la necessitat de temps d'incubació superiors és que el BDNF és una molècula, que podria

necessitar temps perllongats per a difondre en els teixits (Leibrock i cols., 1989). No obstant, en altres treballs realitzats en el nostre laboratori (Lanuza i cols., 2001; Santafé i cols., 2001) i també altres de grups que treballen amb el múscul LAL (Roux i cols., 2006), no mostren problemes d'accessibilitat amb molècules molt grans com la CaC, que té un pes molecular de 790.76 kDa (Santafé i cols., 2005), o pèptids com el β -amiloid de pes molecular 1060.27 kDa (Garcia i cols., 2008; Tomàs i cols., 2009), o inclús molècules amb reconeguda carga polar com la fasciculina i l'AChE (Santafé i cols., 2007).

En quant a l'NT-3, s'ha vist que potencia els terminals nerviosos immadurs protagonistes de la competició axonal en les plaques doble-innervades, que generen l'EPP petit i gran (Figura 44). Pel que fa a les sinapsis mono-innervada i adulta, no s'ha observat cap canvi. Aquests resultats reforcen els trobats per altres autors que també descriuen aquesta activitat potenciadora de la neurotransmissió que presenta l'NT-3. Lohof i col·laboradors (1993) van observar que l'aplicació d'NT-3 en NMJ de granota en cultiu, provocava un increment en les corrents espontànies i evocades. Resultats molt semblants els van obtenir altres grups en treballs posteriors realitzats també en cultius de NMJ de *Xenopus laevis* (Wang i cols., 1995; Xie i cols., 1997). L'NT-3 doncs sembla tenir un efecte en els terminals més immadurs de la NMJ neonatal, però no en l'edat adulta, ja que no s'ha observat cap modificació en la neurotransmissió en músculs P30-P45. Per tant, estem davant d'una NT que juga un rol en un moment molt concret del desenvolupament, afectant als dos terminals que es troben en el procés de competició axonal.

Així doncs, en resum, les tres NTs estudiades, el BDNF, l'NT-4 i l'NT-3, porten una direcció molt pròxima, donat que les tres tenen efectes potenciadors de la neurotransmissió. El que cal ressaltar és que ho fan en estadis del desenvolupament diferents. Així, com es mostra en el dibuix de la Figura 51, mentre que el BDNF actua en tots els nivells de l'evolució, l'NT-3 potencia els terminals nerviosos més immadurs i l'NT-4 únicament té efectes potenciadors en la neurotransmissió adulta.

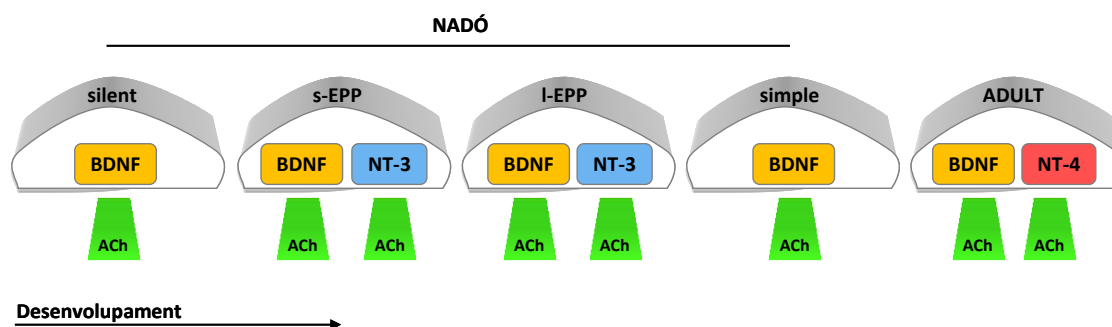


Figura 51. Efectes de les neurotrofines en els diferents terminals immadurs i madurs. El terminal nerviós silent recupera la seva funcionalitat, recobrant possibilitat d'alliberar ACh gràcies a la incubació amb el BDNF. En el cas dels dos terminals de la sinapsi doble-iinervada, l'EPP petit i l'EPP gran, els dos són sensibles al BDNF i a l'NT-3, potenciant l'alliberament significativament. En el cas de la sinapsi mono-innervada, s'observa una potenciació amb el BDNF. I en l'edat adulta, el BDNF segueix tenint el seu efecte potenciador a les 3 hores de la mateixa manera que succeeix amb l'NT-4.

El BDNF ha estat una de les NTs més estudiades fins al moment, probablement per ser una de les primeres que es va descriure, però també perquè s'ha vist que intervé en molts processos. En el nostre cas, amb els resultats obtinguts, es conclou que el BDNF és la única NT que es troba implicada per un costat amb la neurotransmissió i per l'altre amb el reclutament de sinapsis silents (com es discutirà més endavant). A més a més, és la única que promou canvis tant en el nadó com en l'adult, pel que s'extreu que és una de les NTs més implicades en el sistema neuromuscular. En canvi en el cas de l'NT-4, es pot parlar únicament d'un efecte en la neurotransmissió i solsament a l'edat adulta, el que suggereix un efecte en el manteniment de les sinapsis consolidades. Experiments en els que s'ha avaluat l'índex de poli-innervació (PI), han mostrat que no es troba implicada en el fenomen de reclutament de sinapsis silents. El mateix succeeix amb l'NT-3, que sent inefectiva en el control del PI, provoca canvis en la neurotransmissió. Aquest efecte s'observa solsament en els dos terminals de la sinapsi doblement innervada, suggerint que el seu rol es troba estretament lligat al procés de la competició axonal, tot i que amb els experiments realitzats no es pot concloure quin és.

3. Efecte del BDNF en el procés d'eliminació sinàptica de la NMJ

Una vegada s'ha avaluat l'efecte de les NTs en la neurotransmissió, cal analitzar la seva implicació en el procés d'eliminació sinàptica. De fet, que el BDNF i l'NT-3 puguin potenciar els terminals dèbils, ja marca una evidència en aquest sentit, ja que l'increment en l'alliberament d'ACh es pot entendre com un efecte contraposat a l'eliminació sinàptica, en que els terminals dèbils perden més força cada vegada fins que es retrauen. Un paràmetre d'estudi, que ens informa sobre els mecanismes que operen en el procés final de desconexió funcional, en l'eliminació de les sinapsis, és el PI. El PI és de relativa fàcil exploració, ràpida, controlada i més operativa que l'estudi de fenòmens de més llarga durada, com el retràs de l'eliminació dies després de tractar el múscul *in vivo* amb drogues blocadores o estimulants de molècules que es troben possiblement implicades, en l'eliminació sinàptica. Així, s'han estudiat els canvis en el PI promoguts per les NTs BDNF, l'NT-4 i l'NT-3.

El BDNF pot incrementar el PI després d'1 hora d'incubació a la dosis alta 50 nM (Figura 47). Curiosament, mitjançant el bloqueig dels receptors del BDNF per separat (TrkB i p75^{NTR}) s'evidencia que aquest efecte ve mediat per la via del TrkB, ja que el bloqueig del p75^{NTR}, no aboleix l'efecte reclutador que té el BDNF. També s'han fet incubacions de temps superiors, que han permès veure que l'efecte reclutador del BDNF és transitori, ja que després de 3 hores, el PI no presenta diferències respecte els valors controls. Pel que fa a l'NT-4 i a l'NT-3, no s'han observat canvis en el PI. Aquesta falta d'efecte de l'NT-4 en el PI podia ser esperable ja que no pren part en el control de la neurotransmissió en les sinapsis immadures, però pel que fa l'NT-3, es podia esperar un canvi en el PI que no s'ha reflectit, suggerint que el seu efecte es limita en la modulació de la neurotransmissió sent inefectiu en els terminals nerviosos silents. Un altre grup ha estudiat també, l'efecte de les NTs NT-3 i NT-4 en el fenomen de la poli-innervació. Concretament valoren els canvis en el número d'axons per sinapsi que provoca la sobreexpressió de l'NT-3 i l'NT-4 per part de la cèl·lula muscular. Observen que l'NT-3 i l'NT-4 no tenen cap efecte en el número de innervacions per placa motora tot i que les neurones expressen els seus receptors TrkB i TrkC (Nguyen i cols., 1998).

Aquests resultats coincideixen amb els nostres, ja que les dues NTs no provoquen cap modificació en el PI, tot i estar presents els respectius receptors.

Altres autors també han descrit un efecte del BDNF en el període d'eliminació sinàptica neuromuscular. Tincions argèntiques del múscul tensor de la fascia lata (*tensor fascia latae*) al qual se li ha administrat BDNF amb injecció subcutània des del dia P1 fins a P9, mostren com el BDNF evita o retrassa l'eliminació sinàptica, ja que els músculs tractats presenten un 40% més de fibres poli-innervades (Kwon i Gurney, 1996). Mitjançant registres electrofisiològics, s'ha comprovat però que no tots els terminals nerviosos són funcionals, per tant el BDNF és capaç d'estabilitzar també sinapsis silents. En aquest treball, l'efecte del BDNF també es descriu com a transitori, donat que arriba un moment que l'eliminació sinàptica segueix el seu curs i les fibres resten mono-innervades. En el cas del SNC també s'ha relacionat el BDNF amb un increment en el número de contactes sinàptics en hipocamp d'embrions de ratolins que sobreexpressen el BDNF (Aguado i cols., 2003).

Contemplant altres factor tròfics en aquest període de l'eliminació sinàptica, treballs realitzats amb el factor neurotròfic ciliar (CNTF de l'anglès *ciliary neurotrophic factor*) i el factor inhibidor dels leucòcits (LIF de l'anglès *leukemia inhibitor factor*), són capaços de retardar l'eliminació sinàptica durant un temps limitat, ja que després l'eliminació sinàptica segueix el seu curs (English i Schwartz, 1995; Kwon i Gurney, 1996). Un treball en el que la cèl·lula muscular del ratolí sobreexpressa el factor neurotròfic derivat de la glia (GDNF de l'anglès *glial derived neurotrophic factor*), mostra com incrementa el número de terminals nerviosos per sinapsi (Nguyen i cols., 1998). També s'ha descrit lo que possiblement sigui l'efecte reclutador del BDNF en el SNC, ja que amb dues hores incrementa el número de contactes sinàptics per axó terminal de *Xenopus laevis* en desenvolupament (Alsina i cols., 2001).

A més d'estudiar els canvis en el PI, s'ha investigat les modificacions en la distribució de les NMJ segons el número d'axons per fibra muscular. Després de la incubació amb el BDNF a P6-P7, les distribucions no presenten diferències respecte la distribució control a P2-P3 (Figura 48). Això indica que el BDNF es capaç de reclutar terminals nerviosos silents independentment del tipus de sinapsi on es trobin (sinapsis

simples, dobles, triples i quàdruples) i fins i tot retardar l'eliminació sinàptica fins a estadis anteriors. També s'observa que aquesta situació de reclutament, induïda pel BDNF (50 nM-3 hores), no s'allarga en el temps donat que la distribució recupera el perfil de la distribució control a P6-P7. Per tant, el BDNF pot reclutar terminals nerviosos silencis però de forma transitòria, indicant que el procés d'eliminació sinàptica i els mecanismes que la sustenten, tenen molta més força que els mecanismes mediat pel BDNF i pels factors neurotròfics CNTF i LIF citats abans.

4. Exploració del possible mecanisme d'acció del BDNF

Tot i que res es coneix de quins efectors o mecanismes es troben darrera el rol potenciador i reclutador del BDNF, és evident que participa d'alguna manera de la neurotransmissió neonatal. Donat que en treballs anteriors en el nostre laboratori, s'han descrit algunes de les molècules implicades en la neurotransmissió durant el desenvolupament i en l'adult, com són la PKC i els VDCCs (Lanuza i cols., 2002; Santafé i cols., 2001, 2002, 2007 i 2009), s'ha volgut investigar si alguna d'aquestes molècules es troba relacionada amb l'efecte del BDNF. Per a assolir tal objectiu es van realitzar experiments de dobles incubacions, valorant els canvis induïts en la distribució dels diversos tipus de sinapsis simples, dobles triples i quàdruples (Figura 49). Els experiments de dobles incubacions, permeten veure com una primera substància condiciona l'efecte d'una segona. Per tant, els experiments posen de rellevància efectes oclusors o potenciadors entre els diferents tractaments, donant idea de possibles relacions entre l'activitat de les diferents molècules implicades i identificant possibles efectors en els processos avaluats.

De la sèrie de molècules descrites anteriorment en el nostre laboratori, com a participants del procés d'eliminació sinàptica, s'ha treballat amb la PKC i amb el VDCC tipus L, donat que és l'únic que es troba exclusivament en els dos terminals nerviosos de la sinapsi doble-innervada, pel que el seu rol podria ser el més específic entre els

VDCCs en la competició axonal. A més a més, el canal L sembla estar relacionat amb la maduració sinàptica (Sugiura i Ko, 1997), la retracció axonal a través de proteases activades per Ca^{2+} (Zhu i Vrbova, 1992) i l'endocitosi de les vesícules sinàptiques (Perissinotti i cols., 2008). Pel que fa al canal N es troba parcialment implicat en el control de la neurotransmissió del terminal dèbil i no contribueix en el reclutament sinàptic (Santafé i cols., 2001).

En els experiments en els que es van realitzar un únic tractament amb el BDNF, elevant la concentració de Mg^{2+} , amb la nitrendipina (blocadora del canal L) o amb la Calfosteïna C (CaC, blocadora de la PKC), s'han obtingut efectes molt semblants en la distribució resultant. S'ha observat una disminució en el total de sinapsis simples (les més madures en el nadó), i un increment en el número de sinapsis més immadures (dobles, triples i quàdruples) (Figura 49B). Això és indicador d'un augment en el PI i per tant de reclutament de sinapsis silents com ja es porta comentant anteriorment. En treballs previs en el nostre laboratori ja s'ha descrit aquest efecte reclutador pel bloqueig de la PKC, permetent una disminució del número de les sinapsis simples i incrementant el número de sinapsis dobles i triples (Santafé i cols., 2007). El canal L també s'ha relacionat prèviament amb un increment en el PI pel reclutament adquirit amb el bloqueig amb la nitrendipina (Santafé i cols., 2002). En el mateix estudi també s'ha descrit que el medi d'alt Mg^{2+} també provoca un increment en el PI.

Per tant, el bloqueig de la PKC, del canal L, i la baixa disponibilitat del Ca^{2+} en el medi o el que és el mateix, la reducció de l'entrada de Ca^{2+} intracel·lular, evidencien una vegada més, que aquestes dues molècules i el ió Ca^{2+} , formen part d'un mecanisme d'actuació que funciona inhibint la neurotransmissió en els terminals dèbils (que són els que generen l'EPP petit). Encara que no es poden descartar altres explicacions, el mecanisme plausible podria ser el següent: el Ca^{2+} que entra pel canal L, activa la PKC que a la vegada inhibeix l'alliberament d'ACh en els terminals més dèbils. Arriba un moment en que aquests, perden la capacitat d'alliberar ACh pel que queden funcionalment deprimits. A partir d'aquest moment passen a anomenar-se

terminals nerviosos silents que acabaran per desconnectar-se morfològicament del component postsinàptic de la NMJ.

En el cas de les dobles incubacions (Figura 49C), incubant primerament amb els compostos per bloquejar la PKC, el canal L i amb alt Mg^{2+} i en segon lloc amb el BDNF, es va observar com el BDNF afegit en segon lloc, no realitza cap acció per sobre de la CaC ni la nitrendipina. Això suggereix que la via de senyalització desencadenada pel BDNF, està relacionada amb l'activitat de la PKC i el canal L, per l'efecte ocluser entre els tractaments. Pel que fa al medi d'alt Mg^{2+} , que per si sol desenvolupa una potent acció reclutadora, el BDNF pot encara reclutar alguns terminals nerviosos silents incrementant, per exemple, el número de sinapsis triples (veure Figura 49C). Aquests resultats suggereixen que l'efecte del BDNF no és dependent de Ca^{2+} en la seva totalitat, ja que en situacions en que la disponibilitat del Ca^{2+} disminueix, el BDNF és capaç de seguir reclutant terminals nerviosos silents. Així, el BDNF estaria actuant a diferents nivells, primerament estaria bloquejant l'activitat del mecanisme inhibitor mediat per la PKC i el VDCC tipus L (mecanisme que de trobar-se actiu promou la desconnexió dels terminals dèbils que generen l'EPP petit), i per l'altre desencadenant un mecanisme independent del Ca^{2+} que també resultaria amb el reclutament sinàptic.

Així doncs, fins ara s'ha vist que existeix molta similitud entre l'efecte del BDNF i el bloqueig de la PKC i el canal L, en el procés de reclutament sinàptic contrari al procés de l'eliminació sinàptica, ja que el BDNF recluta a nivells semblants als que s'obtenen bloquejant la PKC o el canal L (Santafé i cols., 2001, 2007). Per tant, donat que el bloqueig de la PKC i el canal L impedeixen un efecte posterior del BDNF, i que a més a més, els tractaments simples (BDNF, CaC i nitrendipina) exerceixen efectes molt semblants en les distribucions, es pot dir que el BDNF podria actuar bloquejant la via PKC-VDCCs en el seu paper reclutador.

Veient aquesta relació del BDNF amb la PKC i el canal L en el procés de reclutament, també s'ha volgut comparar l'efecte del BDNF en l'alliberament d'ACh (discutit en el segon apartat de la discussió) amb l'efecte de la PKC i el canal L en

aquesta mateixa variable. En aquest sentit, en el nostre laboratori s'ha descrit recentment (Santafé i cols., 2007) que el bloqueig de la PKC provoca una potenciació exclusivament en el terminal que genera l'EPP petit (per tant el terminal dèbil), sense afectar al terminal fort ni a les sinapsis mono-innervades. Això es podria explicar mitjançant el mecanisme inhibitor PKC-dependent, al qual està sotmès el terminal dèbil, que tindria com a finalitat la desconexió d'aquests terminals febles. Quan la PKC es bloqueja, aquest mecanisme inhibitor perd la seva funció, permetent que el terminal dèbil incrementi l'eficàcia sinàptica, el que es podria traduir amb aquest increment en l'alliberament de l'ACh.

En quant a l'estudi del paper del VDCC tipus L en l'alliberament d'ACh dels terminals immadurs, els resultats mostren que la nitrendipina (blocadora del canal L) produeix un increment en l'amplada de l'EPP petit mentre que inhibeix l'EPP gran de la sinapsi doble exclusivament, quedant la sinapsi simple sense canvis. Amb aquests resultats s'evidencia la diferència de rol del canal L en el terminal dèbil i en el terminal fort. Mentre que el Ca^{2+} que entra pel canal L té la finalitat d'activar el mecanisme inhibitor en el terminal dèbil (mediat per la PKC), el Ca^{2+} que entra pel canal L en els terminals forts, ajuda a la seva consolidació (Santafé i cols., 2009).

Així, pel que fa als canvis en els terminals estudiats, hi ha diferències entre els tres tractaments. El BDNF potencia genèricament tots els terminals, mentre que la nitrendipina (que bloca el canal L) afecta de manera distinta a l'EPP petit i el l'EPP gran de les sinapsis dobles sense afectar a la sinapsi simple. El bloqueig de la PKC amb CaC, únicament afecta a l'EPP petit i no pren partit en la modulació de la neurotransmissió del terminal que genera l'EPP gran ni en la del terminal únic de la sinapsi simple. Aquesta disparitat de rols no és d'estranyar perquè amb la maduració sinàptica, algunes molècules implicades en l'alliberament, disminueixen la seva expressió mentre que d'altres canvien el rol que tenen, com la PKC que es troba inhibint l'EPP petit, però no afecta l'EPP gran, ni l'EPP simple ni a l'adult ja que en aquests casos no està acoblada al control de l'alliberament. La PKC únicament s'acobla en l'alliberament

d'aquests terminals en un medi d'alt Ca^{2+} (Santafé i cols., 2006, 2007). Els mAChRs són altres molècules que també pateixen canvis amb el transcurs del desenvolupament. Són cinc els tipus d'mAChRs (M1-M5) i s'ha descrit prèviament en el nostre laboratori (Santafé i cols., 2003, 2004; Garcia i cols., 2005) que presenten expressió i funcionalitat variables en els diferents terminals nerviosos. Alguns exemples dels canvis són la pèrdua de lligam del mAChR M2 amb el canal N i el canvi del seu paper estimulador inicial, per a inhibir l'alliberament en l'adult (Santafé i cols., 2003, 2004); la desaparició de l'M4 en el terminal fort durant la competició axonal (Santafé i cols., 2004); la pèrdua de la relació entre l'M1 i els VDCCs tipus N i L, per després en l'edat adulta adquirir un rol estimulador (Santafé i cols., 2003, 2004), i la desaparició dels VDCCs tipus L i N en l'edat adulta. Tots aquests canvis indiquen l'especificitat del mecanisme de l'eliminació sinàptica que inclou totes aquestes molècules.

En la Figura 52, s'han representat els canvis en el PI i en la neurotransmissió obtinguts amb el BDNF i els resultats propis ja publicats (Santafé i cols., 2009) sobre l'efecte de la CaC i la nitrendipina, amb la finalitat de facilitar la comparació entre ells. Només es mostra l'amplada de l'EPP petit donat que és el que es troba sota el mecanisme inhibitor, amb el qual creiem que es troba vinculat el BDNF. Aquest mecanisme inhibitor és el mateix que provoca la desconexió dels terminals nerviosos silents, i el que d'alguna manera, permet el reclutament en situacions de bloqueig de la PKC i el canal L entre d'altres.

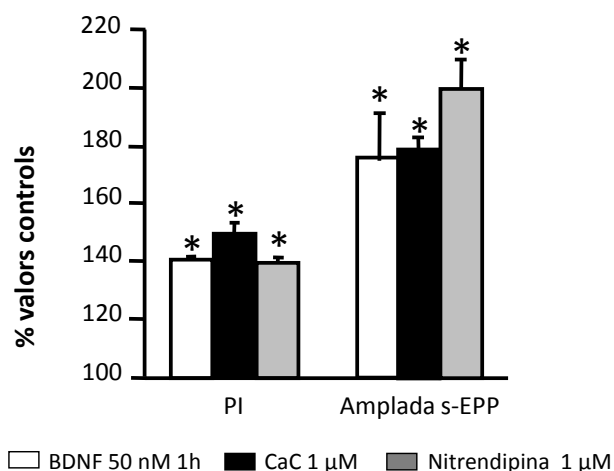


Figura 52. Comparativa dels canvis en el PI i en l'amplada de l's-EPP per efecte del BDNF, del bloqueig de la PKC (CaC) i del bloqueig del canal de calci tipus L (nitrendipina). S'observa com els canvis en el PI són molt semblants, estant els tres entre un increment del 40-50% respecte els valors controls. Pel que fa a l'amplada de l'EPP petit, en les tres situacions s'observa un increment significatiu comprès entre el 80-100% respecte els valors controls (* significa $p < 0.05$ en tots els casos).

Per tant, el BDNF promou la potenciació de l'alliberament d'ACh, oposant-se també al mecanisme inhibitor mediat per la PKC i el canal L i dependent de Ca^{2+} que quan es troba actiu en els terminals dèbils, disminueix la seva eficàcia fins a que aquests perden la seva funcionalitat. Per altra banda, el BDNF promou el reclutament sinàptic, oposant-se a aquest mecanisme inhibitor present tot i que no actiu, en els terminals silencis, permetent la seva reactivació i funcionalitat.

Treballs d'altres grups, ja han relacionat anteriorment les NTs amb la PKC. Per exemple el NGF pot estimular la PKC en diversos models cel·lulars com en les cèl·lules PC12 (Wooten i cols., 1992) o en neuroblastomes humans (Söderholm i cols., 2001). La PKC, també s'ha relacionat amb l'activitat del BDNF (Patapoutian i Reichardt, 2001; Reichardt, 2006) i amb la supervivència de les neurones del gangli espiral de la còclea, en aquest cas per efecte del BDNF i l'NT-3 (Lallemend i cols., 2005).

Per concloure doncs, sabem que el bloqueig dels VDCCs (Santafé i cols., 2002) i el bloqueig de la PKC (Santafé i cols., 2007) desemmascaren terminals nerviosos silents que poden recobrar l'alliberament d'ACh. A més a més, aquestes dues molècules formen part d'un mecanisme mediat pel Ca^{2+} , que es troba obrant en els terminals dèbils promovent la seva desconexió en el procés de competició axonal. S'ha vist que l'aplicació del BDNF i el bloqueig de la PKC, del canal L i la manipulació del Ca^{2+} , tenen efectes molts semblants, provocant per un costat l'increment en l'alliberament en els terminals dèbils durant el desenvolupament, i per l'altre el reclutament de terminals nerviosos silents abans que siguin eliminats definitivament. Aquest reclutament però és transitori, el que suggereix la possibilitat de que el BDNF exogen, estigui posant de manifest l'existència d'una via inefectiva donat que la poca producció de BDNF (que és activitat-dependent) en els terminals pocs actius, no pot contrarestar el mecanisme inhibitor de la PKC-VDCCs. Es proposa doncs que el BDNF s'oposa al mecanisme inhibitor mediat per PKC-VDCCs en els del terminals dèbils i en els terminals silents.

5. Activitat del BDNF endogen en la neurotransmissió de les NMJ en desenvolupament

Fins al moment, els experiments que s'han realitzat amb el BDNF i amb les altres NTs, han estat amb la NT aplicada al medi exògenament. Amb la finalitat d'investigar quin és el rol del BDNF fisiològic, entenent-lo com a la NT produïda pel sistema, s'han realitzat experiments de bloqueig dels receptors del BDNF: el TrkB que és d'alta afinitat i el $p75^{NTR}$ que és el de baixa afinitat. Com ja s'ha vist anteriorment, l'NT-4 no té cap efecte en la neurotransmissió dels terminals nerviosos immadurs, per tant, els resultats obtinguts en aquest apartat, s'interpreten com la modificació de les vies desencadenades per la unió BDNF-TrkB i BDNF- $p75^{NTR}$. S'han valorat els canvis en la neurotransmissió i en el PI després de bloquejar el TrkB amb K-252a, i el $p75^{NTR}$ amb l'anticòs anti-p75-192-IgG. A més a més d'aquests dos blocadors s'ha fet servir un

tercer compost amb la intenció de captar el BDNF endògen del sistema, per impedir la seva unió als receptors i la posterior senyalització. Aquest tercer compost és una proteïna de fusió anomenada TrkB-IgG.

Pel que fa a l'estudi del PI, cap dels tres compostos utilitzats (K-252a, anti-p75-192-IgG i TrkB-IgG) el modifiquen. En l'estudi de l'alliberament d'ACh en els terminals nerviosos que generen l'EPP petit i l'EPP gran en la sinapsi doble-innervada i la sinapsi simple, s'han obtingut resultats diversos en cada un dels tractaments efectuats. Com es mostra en la Figura 50, el bloqueig del receptor de baixa afinitat $p75^{NTR}$ amb l'anticòs anti-p75-192-IgG, afecta als tres terminals estudiats per igual, inhibint-los. Això suggereix que en el seu funcionament normal, el BDNF endogen unit al receptor $p75^{NTR}$ pot estar afavorint o facilitant l'alliberament d'ACh en els tres terminals nerviosos estudiats, ja que el seu bloqueig amb l'anticòs provoca un decrement en l'alliberament. Aquesta lectura dels resultats, concorda amb els experiments realitzats amb el BDNF exogen en els que l'activitat dels dos receptors és necessària per a observar la potenciació en la neurotransmissió.

Contràriament als resultats obtinguts amb el bloqueig del $p75^{NTR}$, el bloqueig del receptor TrkB amb la K-252a, provoca un increment en l'alliberament dels terminals més madurs que són l'EPP gran i l'EPP simple. Això suggereix que el BDNF fisiològic mitjançant el receptor TrkB, té un rol inhibidor en els terminals més madurs. Aquests resultats són sorprenents donat que en la valoració del BDNF exogen, s'ha vist que l'activitat del TrkB és necessària per promoure la potenciació de la neurotransmissió. A més a més, aquest receptor TrkB és el mediador en el reclutament dels terminals nerviosos silents (mentre que el receptor $p75^{NTR}$ no s'hi troba vinculat).

Una altra lectura alternativa dels resultats obtinguts en la valoració del BDNF endogen, i en definitiva d'entendre la dinàmica dels experiments és la següent. Bloquejar el receptor TrkB és una manera d'avaluar quina és la funció que realitza aquest en el sistema, però per altra banda, és una manera de veure què és el que està fent el receptor $p75^{NTR}$ que és l'únic que queda actiu. De la manera que fins ara s'ha

interpretat l'efecte del BDNF endogen, s'ha conclòs que el receptor TrkB es podria trobar inhibint l'alliberament en el terminal fort de la sinapsi doble i en la sinapsi simple ja que el seu bloqueig permet una potenciació en aquests terminals. Ara es podria afegir doncs, que aquesta potenciació podria vindre mediada pel $p75^{NTR}$ perquè és el receptor que queda disponible per al BDNF. Això corrobora els resultats obtinguts amb el bloqueig del receptor $p75^{NTR}$ en els que ja s'ha vist que aquest receptor es comporta com facilitador de l'alliberament perquè quan es bloqueja, s'observa una inhibició de l'alliberament en els tres terminals estudiats; per això es conclou que el $p75^{NTR}$ actua facilitant l'alliberament. Per altra banda, el bloqueig del $p75^{NTR}$ és una manera d'avaluar què succeeix quan el TrkB és l'únic que es troba actiu, i es corrobora que en aquesta situació, inhibeix l'alliberament.

En l'última situació experimental, la utilització de la proteïna de fusió TrkB-IgG es tradueix amb l'impediment de la senyalització mediada pel TrkB i el $p75^{NTR}$ alhora, ja que immobilitza el BDNF/NT-4 endògens (recordant que aquesta última NT no pren part en el control de la neurotransmissió neonatal), per tant evidenciant quin és el còmput dels efectes dels dos receptors. Els resultats obtinguts són curiosos donat que l'únic canvi que s'ha observat és la potenciació de l'EPP gran generat pel terminal fort de la sinapsi doble-innervada. Per tant, el còmput resultant dels efectes del BDNF endogen en els dos receptors resulta en una inhibició selectiva únicament en el terminal fort, que a la vegada se sap que és el terminal que acabarà per consolidar-se donat que és el més actiu. Això suggereix, que en aquest període del desenvolupament en que el terminal dèbil va perdent eficàcia sinàptica i el terminal fort la va guanyant, el BDNF adquireix un paper possiblement momentani. Aquest paper és contrari al que es podia esperar, una vegada vist que el BDNF exogen potencia tots els terminals. Diem que és possiblement momentani, perquè en el terminal simple, no s'ha vist cap canvi en l'alliberament, el que indica que el BDNF fisiològic no es troba modulant l'alliberament en el terminal simple. Una possible explicació d'aquest fenomen inesperat, és que en aquest moment del desenvolupament, el terminal fort estigui desenvolupant-se en altres aspectes que no són l'alliberament, com per exemple el

creixement del terminal sobre l'àrea del component postsinàptic que és més gran, una vegada el terminal dèbil va perdent protagonisme i retirant-se de la cèl·lula muscular.

Per tant, si es comparen els resultats obtinguts amb el BDNF exogen i endogen, s'aprecien algunes diferències. Per un costat, el BDNF fisiològic està realitzant efectes diferent segons el receptor que estigui activant, i per l'altre, el BDNF aplicat exògenament, provoca una potenciació bastant important i no selectiva en tots els terminals nerviosos immadurs (a més a més de l'adult).

Aquesta disparitat d'efectes entre el BDNF propi del sistema i l'exogen es podria explicar de diferents maneres alternatives. Una d'elles podria ser la diferència de concentracions del BDNF, ja que el BDNF exogen tot i no ser una concentració molt alta, ho és més probablement que la produïda pel sistema. A més, segurament no és tant important la diferència de concentració com ho és l'àrea o domini a la qual té accés la NT, en els diferents contactes sinàptics. Mentre que el BDNF aplicat exògenament està arribant a tots els nivells de totes les sinapsis i en definitiva, també en la totalitat del múscul, el BDNF fisiològic no s'expressa i es troba en totes les sinapsis o contactes individuals (feble, fort i simple) per igual i a la mateixa concentració. Per tant, no és el mateix valorar l'efecte del BDNF exogen que el fet d'impedir la senyalització a nivell del receptor i avaluar quina és la seva resposta. Així els resultats obtinguts amb el BDNF exogen no tenen perquè entendre's com una contradicció dels resultats obtinguts en la valoració del paper del BDNF endogen, ja que són els resultats obtinguts de valorar dos processos diferents.

Ja s'ha comentat que les NTs s'expressen de manera activitat-dependent (Gall i Isackson, 1989; Funakoshi i cols., 1995; Xie i cols., 1997), per tant, el terminal dèbil de la sinapsi doble-innervada al ser menys actiu estaria tenint menys aportació de NTs, probablement el número de receptors també sigui menor, i com a conseqüència ha de ser menys sensible a les NTs. Aquest argument podria donar resposta parcial a la falta d'efecte vist en l'EPP petit amb la incubació de la K-252a i la TrkB-IgG, ja que si el BDNF

no es troba actuant en aquests terminals, com és d'esperar un bloqueig dels seus receptors no ha d'evidenciar cap canvi.

Pel que fa a l'activitat dels dos receptors també s'observen diferències. En el cas del BDNF endogen ja s'ha vist que el p75^{NTR} estaria fent un efecte potenciador o facilitador de la neurotransmissió en els tres terminals estudiats, mentre que el TrkB estaria fent un paper inhibidor de l'alliberament únicament en els terminals més madurs (EPP gran i EPP simple). Aquest efecte inhibidor del BDNF en aquests terminals deu anar acompanyat d'altres fenòmens que d'alguna manera tenen més força, i que afavoreixen l'estabilitat i consolidació del terminal fort i manteniment de la sinapsi simple.

En el cas de la potenciació pel BDNF exogen, tant el TrkB com el p75^{NTR} han d'estar disponibles per a evidenciar-la, perquè com ja s'ha vist, el bloqueig d'un d'ells per separat aboleix l'increment en l'alliberament d'ACh en tots els terminals nerviosos. Aquesta sinèrgia entre els dos receptors també s'evidencia amb el tractament amb TrkB-IgG, on s'obtenen resultats diferents al bloqueig de cadascun dels receptors per separat. Ja s'ha dit abans que altres autors parlen de la possibilitat de que aquests dos receptors treballin en conjunt (Bibel i cols., 1999; Hartmann i cols., 2004).

Per altra banda, quan s'estudia el PI, l'increment significatiu que s'observa promogut pel BDNF, es pot bloquejar amb la incubació prèvia de la K-252a, però no amb l'anticòs anti-p75-192-IgG. Això suggereix, que d'alguna manera la via BDNF-TrkB presenta una especialització que promou l'estabilitat de les sinapsis silents, mentre que el p75^{NTR} no està intervenint en aquest procés.

Aquesta complexitat en els resultats, en els que les vies de senyalització desencadenades per un o altre receptor tenen efectes diferents, és una mostra més de que el mecanisme que controla la neurotransmissió durant el procés de l'eliminació sinàptica és molt complex. Són moltes les molècules que en prenen part, molècules que com ja s'ha dit anteriorment, poden fins i tot presentar canvis en l'expressió i en el seu rol, amb el transcurs de la maduració sinàptica (Santafé i cols., 2003, 2004, 2007).

Per tant, no seria estrany contemplar que podria succeir el mateix amb les NTs i els seus receptors. Primerament els receptors de les NTs poden expressar-se de diferent manera en els terminals nerviosos que es troben competint (el dèbil i el fort) i en el terminal simple. I en segon lloc, poden estar exercint efectes diferents, en cadascun dels terminals estudiats. Aquesta variabilitat de resposta també s'ha vist en d'altres models com en cultius de NMJ de granota, on una única molècula de pro-BDNF (que també es coneix com BDNF immadur), pot produir una potenciació o una depressió, i contribuir a estabilitzar o eliminar els terminals presinàptics, depenent del seu procés proteolític en les sinapsis (Yang i cols., 2009).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

VI- CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

I - Les neurotrofines BDNF, NT-4 i NT-3 són presents en la NMJ amb el següent patró de localització:

I-i. En la sinapsi neuromuscular neonatal es situen en els components pre- i postsinàptic.

I-ii. En l'edat adulta es troben en els components pre- i postsinàptic, i en la cèl·lula de Schwann.

II- Els receptors de les neurotrofines TrkB, TrkC i p75^{NTR} es localitzen a la NMJ amb la següent distribució:

II-i. En la sinapsi neonatal, el TrkB es troba en els components pre- i postsinàptic, mentre que el TrkC i el p75^{NTR} en les tres cèl·lules sinàptiques.

II-ii. En l'edat adulta, els tres receptors es troben en els tres elements de la sinapsi neuromuscular.

III- El BDNF potencia l'alliberament d'ACh en els tres terminals immadurs estudiats (EPP petit, EPP gran i EPP simple) i també en l'edat adulta. Aquest efecte requereix la disponibilitat dels dos receptors TrkB i p75^{NTR}.

IV- En l'edat postnatal, l'NT-4 no modifica la neurotransmissió i no exerceix cap funció en el mecanisme de la competició axonal dels dos terminals de la sinapsi doble-innervada, com tampoc en el PI. Tot i així, la NMJ esdevé progressivament sensible a l'NT-4, ja que en l'edat adulta, es troba implicada en la modulació de la neurotransmissió, potenciant l'alliberament d'ACh.

V- L'NT-3 potencia l'alliberament d'ACh en els terminals dèbil i fort de la sinapsi doble-innervada, mentre no modifica la sinapsi simple ni adulta. Això suggereix que l'NT-3 pot tenir un rol en el mecanisme de competició axonal durant l'eliminació sinàptica, donat que únicament es veuen afectats els terminals més immadurs. Per altra banda, l'NT-3 no modifica el PI, per tant no retarda ni accelera el procés d'eliminació sinàptica.

VI- El BDNF recluta terminals nerviosos silents de manera transitòria independentment de si corresponen a sinapsis simples o múltiples innervades. El mecanisme d'acció del BDNF s'oposa al mecanisme mediat per la PKC i el VDCC tipus L, que actua en els terminals nerviosos dèbils i silents per afavorir i mantenir la seva desconexió funcional.

VII- La via de senyalització desencadenada per la unió del BDNF endogen al p75^{NTR} promou un mecanisme potenciador inespecífic de la neurotransmissió que afecta a tots els tipus de terminals neonatals estudiats. Contràriament, el TrkB sembla estar relacionat amb un mecanisme inhibidor de la neurotransmissió únicament en el terminal més fort de la sinapsi doblement innervada. L'aparent funcionament del BDNF en l'eliminació sinàptica, sembla més complex del que s'havia pensat en un principi amb la valoració de l'efecte del BDNF exogen.

VII- BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Abbs ET. and Joseph DN. (1981). The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-diaphragm preparations. *Br J Pharmacol.* 73 (2):481-483.

Acheson A., Barker PA., Alderson RF., Miller FD., Murphy RA. (1991). Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron.* 7(2):265-275.

Aguado F., Carmona MA., Pozas E., Aguiló A., Martínez-Guijarro FJ., Alcantara S., Borrell V., Yuste R., Ibañez CF., Soriano E. (2003). BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development.* 130 (7):1267-1280.

Aguayo AJ., Clarke DB., Jelsma TN., Kittlerova P., Friedman HC., Bray GM. (1996). Effects of neurotrophins on the survival and regrowth of injured retinal neurons. *Ciba Found Symp.* 196:135-144. Review.

Alsina B., Vu T., Cohen-Cory S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci.* 4 (11):1093-1101.

Andres-Barquin PJ. (2002). Santiago Ramón y Cajal and the Spanish school of neurology. *Lancet neurol.* 1 (7):445-452.

Angaut-Petit D., Molgo J., Connold AL., Faille L. (1987). The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neurosci. Letters.* 82: 83-88.

Arenson MS. (1989). Muscarinic inhibition of quantal transmitter release from the magnesium-paralysed frog sartorius muscle. *Neuroscience.* 30 (3):827-836.

Arenson MS. and Evans SC. (2001). Activation of protein kinase C increases acetylcholine release from frog motor nerves by a direct action on L-type Ca²⁺ channels and apparently not by depolarisation of the terminal. *Neuroscience.* 104 (4):1157-1164.

Atchison WD. (1989). Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther.* 251 (2):672-678.

Auld DS. and Robitaille R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *Neuroscientist.* 9 (2):144-157. Review.

Bajjalieh SM. and Scheller RH. (1995). The biochemistry of neurotransmitter secretion, *J. Biol. Chem.* 270:1971-1974.

Balice-Gordon RJ. and Thompson W.J. (1988). The organization and development of compartmentalized innervation in rat extensor digitorum longus muscle. *J. Physiol.* 398:211-231.

Balice-Gordon RJ. and Lichtman JW. (1993). In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 13 (2):834-855.

Balice-Gordon RJ. (1996). Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Curr Biol.* 6 (9):1054-1056. Review.

Bandtlow CE., Heumann R., Schwab ME., Thoenen H. (1987). Cellular localization of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization. *EMBO J.* 6 (4):891-899.

Barbacid M. (1994). The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 25 (11):1386-1403. Review.

Barde YA., Edgar D., Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1 (5)549-553.

Barde YA., Edgar D., Thoenen H. (1983). New neurotrophic factors. *Annu Rev Physiol.* 45:601-12. Review.

Barde YA. (1989). Trophic factors and neuronal survival. *Neuron.* 2 (6):1525-1534.

Barker PA. (2007). High affinity not in the vicinity? *Neuron.* 53 (1):1-4.

Bennett MK., Calakos N., Kreiner T., Scheller RH. (1992a). Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex. *J Cell Biol.* 116 (3):761-775.

Bennett MK., Calakos N., Scheller RH. (1992b). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science.* 257 (5067):255-259.

Benoit P. and Changeux JP. (1975). Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle. *Brain Res.* 99 (2):354-358.

Bergman E., Fundin BT., Ulfhake B. (1999). Effects of aging and axotomy on the expression of neurotrophin receptors in primary sensory neurons. *J Comp Neurol.* 410:368-386.

Bhattacharyya A., Watson FL., Bradlee TA., Pomeroy SL., Stiles CD., Segal RA. (1997). Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J Neurosci.* 17 (18):7007-7016.

Bibel M., Hoppe E., Barde YA. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 18 (3):616-622.

Birnbaumer L., Campbell KP., Catterall WA., Harpold MM., Hofmann F., Horne WA., Mori Y., Schwartz A., Snutch TP., Tanabe T. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 13 (3):505-506.

Bishop DL., Misgeld T., Walsh MK., Gan WB., Lichtman JW. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron.* 44 (4):651-61.

Blöchl A. and Thoenen H. (1995). Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci.* 7 (6):1220-1228.

Boulanger LM. and Poo MM. (1999). Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci.* 2 (4):346-351.

Bowersox SS., Miljanich GP., Sugiura Y., Li C., Nadasdi L., Hoffman BB., Ramachandran J., Ko CP. (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *J Pharmacol Exp Ther.* 273 (1):248-256.

Bramham CR. and Messaoudi E. (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 76 (2):99-125.

Broadie KS. (1995). Genetic dissection of the molecular mechanisms of transmitter vesicle release during synaptic transmission. *J Physiol Paris.* 89 (2):59-70. Review.

Brown MC., Jansen JK., Van Essen DC. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in newborn rats and its elimination during maturation. *J Physiol.* 261:387-422.

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.* 339: 439-450.

Buffelli M., Busetto G., Cangiano L., Cangiano A. (2002). Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (20):13200-13205.

Buffelli M., Burgess RW., Feng G., Lobe CG., Lichtman JW., Sanes JR. (2003). Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature.* 424 (6947):430-434.

Busetto G., Buffelli M., Tognana E., Bellico F., Cangiano A. (2000). Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 20 (2):685-695.

Byrne JH. and Kandel ER. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci.* 16 (2):425-435. Review.

Calakos N. and Scheller RH. (1996). Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiol Rev.* 76 (1):1-29. Review.

Callaway EM., Soha JM., Van Essen DC. (1987). Competition favouring inactive over active motor neurons during synapse elimination. *Nature.* 328 (6129):422-426.

Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94 (24):13279-13286.

Castonguay A., Lévesque S., Robitaille R. (2001). Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res.* 132:227-240. Review.

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

Catterall WA. (1999). Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Adv Neurol.* 79:441-456. Review.

Catterall WA. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:521-555. Review.

Catterall WA., Perez-Reyes E., Snutch TP., Striessnig J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57 (4):411-425.

Chao MV. and Hempstead BL. (1995). p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18 (7):321-326.

Chao MV. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 4 (4):299-309.

Cohen S., Levi-Montalcini R., Hamburger V. (1954). A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 40 (10):1014-1028.

Coleman P., Federoff H., Kurlan R. (2004). A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology.* 63 (7):1155-1162.

Colman H., Nabekura J., Lichtman JW. (1997). Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science.* 275 (5298):356-361.

Connold AL., Evers JV., Vrbová G. (1986). Effect of low calcium and protease inhibitors on synapse elimination during postnatal development in the rat soleus muscle. *Brain Res.* 393 (1):99-107.

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

Courteaux R. (1973). Motor endplate structure. In *Structure and Function of Muscle*, Vol. 2 ed. GH Bourne, pp.483-530. New York: Academic.

Crowley C., Spencer SD., Nishimura MC., Chen KS., Pitts-Meek S., Armanini MP., Ling LH., McMahon SB., Shelton DL., Levinson AD., et al. (1994). Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell.* 76 (6):1001-1011.

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 (13):4953-4965.

Dai X., Lercher LD., Clinton PM., Du Y., Livingston DL., Vieira C., Yang L., Shen MM., Dreyfus CF. (2003). The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. *J Neurosci.* 23 (13):5846-5853.

Dale HH., Feldberg W., Vogt M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol.* 86 (4):353-380.

Dalton VS., Roberts BL., Borich SM. (2009). Brain derived neurotrophic factor and trk B mRNA expression in the brain of a brain stem-spinal cord regenerating model, the European eel, after spinal cord injury. *Neurosci Lett.* 461 (3):275-279.

Davidson JN., Gardner M., Hutchinson, WC., Mc-Indoe WM., Raymond and Shaw. (1949). Non-nucleic acid protein-bound phosphorus. *Biochem J.* 44 (3).

Day NC., Wood SJ., Ince PG., Volsen SG., Smith W., Slater CR., Shaw PJ. (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel α 1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *J Neurosci.* 17:6226-6235.

Diamond J. and Miledi R. (1962). A study of fetal and newborn rat muscle fibres. *J Physiol.* 162:393-408.

Dluzen DE., Gao X., Story GM., Anderson LI, Kucera J, Walro JM. (2001). Evaluation of nigrostriatal dopaminergic function in adult +/+ and +/- BDNF mutant mice. *Exp Neurol.* 170 (1):121-128.

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

Edelman AM., Blumenthal DK., Krebs EG. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem.* 56:567-613. Review.

Ekström PA., Bergstrand H., Edström A. (1992). Effects of protein kinase inhibitors on regeneration in vitro of adult frog sciatic sensory axons. *J. Neurosci. Res.* 31 (3):462-469.

Elmariah S., Hughes EG., Joo OE., Balice-gordon R. (2004). Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biology.* 1 (4):339-349.

Engel AG., Walls TJ., Nagel A., Uchitel O. (1990). Newly recognized congenital myasthenic syndromes: I. Congenital paucity of synaptic vesicles and reduced quantal release. II. High-conductance fast-channel syndrome. III. Abnormal acetylcholine receptor (AChR) interaction with acetylcholine. IV. AChR deficiency and short channel-open time. *Prog Brain Res.* 84:125-137.

Engel AG. (1994). The neuromuscular junction. In *Myology: Basic and Clinical*, Vol. 1, ed. AG.

English AW. and Schwartz G. (1995). Both basic fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor promote the retention of polyneuronal innervation of developing skeletal muscle fibers. *Dev Biol.* 169 (1):57-64.

Ernfors P., Hallböök F., Ebendal T., Shooter EM., Radeke MJ., Misko TP., Persson H. (1988). Developmental and regional expression of beta-nerve growth factor receptor mRNA in the chick and rat. *Neuron.* 1 (10):983-996.

Ernfors P., Henschen A., Olson L., Persson H. (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron.* 2 (6):1605-1613.

Ernfors P., Wetmore C., Olson L., Persson H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 5 (4):511-526.

Ernfors P., Lee KF., Jaenisch R. (1994a). Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature.* 368 (6467):147-150.

Ernfors P., Lee KF., Kucera J., Jaenisch R. (1994b). Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell.* 77 (4):503-512.

Ertel EA., Campbell KP., Harpold MM., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch TP., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien RW., Catterall WA. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25 (3):533-535.

Erzen I., Cvetko E., Obreza S., Angaut-Petit D. (2000). Fiber types in the mouse levator auris longus muscle: a convenient preparation to study muscle and nerve plasticity. *J Neurosci Res*. 59 (5):692-697.

Escandón E., Soppet D., Rosenthal A., Mendoza-Ramírez JL., Szönyi E., Burton LE., Henderson CE., Parada LF., Nikolics K. (1994). Regulation of neurotrophin receptor expression during embryonic and postnatal development. *J Neurosci*. 14 (4):2054-2068.

Fagerlund MJ. and Eriksson LI. (2009). Current concepts in neuromuscular transmission. *Br J Anaesth*. 103 (1):108-114. Review.

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

Fariñas I., Jones KR., Tessarollo L., Vigers AJ., Huang E., Kirstein M., de Caprona DC., Coppola V., Backus C., Reichardt LF., Fritsch B. (2001). Spatial shaping of cochlear innervation by temporally regulated neurotrophin expression. *J Neurosci*. 21 (16):6170-6180.

Favero M., Lorenzetto E., Bidoia C., Buffelli M., Busetto G. and Cangiano A. (2007). Synapse formation and elimination: role of activity studied in different models of adult muscle reinnervation. *J Neurosci Res*. 85:2610– 2619.

Favero M., Massella O., Cangiano A., Buffelli M. (2009). On the mechanism of action of muscle fibre activity in synapse competition and elimination at the mammalian neuromuscular junction. *European Journal of Neuroscience*. 29:2327–2334.

Feng Z. and Ko CP. (2008). The role of glial cells in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci*. 1132:19-28.

Figurov A., Pozzo-Miller LD., Olafsson P., Wang T., Lu B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 381 (6584):706-709.

Fitzsimonds RM. and Poo MM. (1998). Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiol Rev*. 78 (1):143-170.

Flucher BE. and Daniels MP. (1989). Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43kd protein. *Neuron*. 3:163-175.

Fox MA., Ho SP., Smyth N., Sanes JR. (2008). A synaptic nidogen: Developmental regulation and role of nidogen-2 at the neuromuscular junction. *Neural Development*. 3:24.

Frisén J., Verge VM., Fried K., Risling M., Persson H., Trotter J., Hökfelt T., Lindholm D. (1993). Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci*. 90 (11):4971-4975.

Fu KY., Ip CF., Lai O., Tsim WK., Ip Y. (1997). Muscle-derived neurotrophin-3 increases the aggregation of acetylcholine receptors in neuron-muscle co-cultures. *Developmental Neuroscience*. 8 (18):3895-3900.

Fukunaga K. and Miyamoto E. (1998). Neuronal plasticity and protein phosphatase. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 3 (8):1062-71. Review.

Funakoshi H., Frisen J., Barbany G., Timmusk T., Zachrisson O., Verge VM., Persson H. (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol*. 123 (2):455-465.

Funakoshi H., Belluardo N., Arenas E., Yamamoto Y., Casabona A., Persson H., Ibanez CF. (1995). Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science*. 268 (5216):1495-1499.

Gall CM. and Isackson PJ. (1989). Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor. *Science*. 245 (4919):758-671.

Ganguly DK. and Das M. (1979). Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature*. 278 (5705):645-646.

Garcia N., Santafé MM., Salon I., Lanuza MA. and Tomàs J. (2005). Expression of muscarinic acetylcholinereceptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histol Histopathol*. 20:733-743.

Garcia N., Santafé MM., Tomàs M., Lanuza MA., Tomàs J. (2008). Short-term effects of beta-amyloid₂₅₋₃₅ peptide aggregates on transmitter release in neuromuscular synapses. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67 (3):250-259.

Georgiou J. and Charlton MP. (1999). Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia*. 27 (2):101-109.

Glass DJ., Nye SH., Hantzopoulos P., Macchi MJ., Squinto SP., Goldfarb M., Yancopoulos GD. (1991). TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell*. 66 (2):405-413.

Gómez-Pinilla F., Ying Z., Opazo P., Roy RR., Edgerton VR. (2001). Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. *Eur J Neurosci.* 13 (6):1078-1084.

Gómez-Pinilla F., Ying Z., Roy RR., Hodgson J., Edgerton VR. (2004). Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. *J Neurophysiol.* 92 (6):3423-32.

Gonzalez M. and Collins WF. (1997). Modulation of motoneuron excitability by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurophysiol.* 77 (1):502-6.

Gonzalez M., Ruggiero FP., Chang Q., Shi YJ., Rich MM., Kraner S., Balice-Gordon RJ. (1999). Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron.* 24:567-583.

Gordon T. (2009). The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus.* 26(2):E3.

Gordon T. (2010). The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *J Commun Disord.* *En premsa.*

Gotow T. (1992). The cytoplasmic structure of the axon terminal. *Prog Neurobiol.* 39 (5):443-74.

Götz R., Köster R., Winkler C., Raulf F., Lottspeich F., Scharl M., Thoenen H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature.* 372 (6503):266-269.

Gray DB., Brusés JL. and Pilar GR. (1992). Developmental switch in the pharmacology of Ca₂₁ channels coupled to acetylcholine release. *Neuron.* 8:1-20.

Griesbeck O., Parsadanian AS., Sendtner M., Thoenen H. (1995). Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res.* 42 (1):21-33.

Grob PM., Ross AH., Koprowski H., Bothwell M. (1985). Characterization of the human melanoma nerve growth factor receptor. *J Biol Chem.* 260 (13):8044-8049.

Hallböök F., Ibáñez CF., Persson H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron.* 6 (5):845-858.

Hammarberg H., Piehl F., Risling M., Cullheim S. (2000). Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat. *J Comp Neurol.* 426 (4):587-601.

Hartmann M., Brigadski T., Erdmann KS., Holtmann B., Sendtner M., Narz F., Lessmann V. (2004). Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci.* 117 (24):5803-5814.

Hemmings HC Jr., Nairn AC., McGuinness TL., Huganir RL., Greengard P. (1989). Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *FASEB J.* 3 (5):1583-1592. Review.

Hempstead BL., Martin-Zanca D., Kaplan DR., Parada LF., Chao MV. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature.* 350 (6320):678-683.

Hempstead B. (2006). Dissecting the diverse actions of pro and mature neurotrophins. *Current Alzheimer Research.* 3 (1):19-24.

Henderson CE., Camu W., Mettling C., Gouin A., Poulsen K., Karihaloo M., Rullamas J., Evans T., McMahon SB., Armanini MP., Berkemeier L., Phillips HS., Rosenthal A. (1993). Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature.* 363:266-270.

Hess DM., Scott MO., Potluri S., Pitts EV., Cisterni C., Balice-Gordon RJ. (2007). Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses. *J Comp Neurol.* 501 (4):465-482.

Heumann R., Lindholm D., Bandtlow C., Meyer M., Radeke MJ., Misko TP., Shooter E., Thoenen H. (1987). Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84 (23):8735-8739.

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

Hilgenberg L. and Miles K. (1995). Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *J Cell Sci.* 108:51-61.

Hofer M., Pagliusi SR., Hohn A., Leibrock J., Barde YA. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 9 (8):2459-2464.

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

Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde YA. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature.* 344 (6264):339-341.

Holgado-Madruga M., Moscatello DK., Emler DR., Dieterich R., Wong AJ. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci.* 94 (23):12419-12424.

Hong SJ and Chang CC. (1995). Calcium channel subtypes for the sympathetic and parasympathetic nerves of guinea-pig atria. *Br J Pharmacol.* 116 (1):1577-1582.

Huang EJ. and Reichardt LF. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24:677-736.

Hubbard JI. and Wilson DF. (1973). Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *J Physiol.* 228:307-325.

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

Ip FC., Cheung J., Ip NY. (2001). The expression profiles of neurotrophins and their receptors in rat and chicken tissues during development. *Neurosci Lett.* 301 (2):107-110.

Ip NY., Ibáñez CF., Nye SH., McClain J., Jones PF., Gies DR., Belluscio L., Le Beau MM., Espinosa R., Squinto SP., Persson H., Yancopoulos GD. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89 (7):3060-3064.

Iwasaki S. and Takahashi T. (1998). Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol.* 509 (2):419-423.

Iwasaki S., Momiyama A., Uchitel OD., Takahashi T. (2000). Developmental changes in calcium channel types mediating central synaptic transmission. *J Neurosci.* 20 (1):59-65.

Jansen JK. and Fladby T. (1990). The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals. *Prog Neurobiol.* 34(1):39-90. Review.

Jansen P., Giehl K., Nyengaard JR., Teng K., Lioubinski O., Sjoegaard SS., Breiderhoff T., Gotthardt M., Lin F., Eilers A., Petersen CM., Lewin GR., Hempstead BL., Willnow TE., Nykjaer A. (2007). Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury. *Nat Neurosci.* 10 (11):1449-1457.

Jena BP. (2009). Membrane fusion: role of SNAREs and calcium. *Protein Pept Lett.* 16 (7):712-717.

Jia M., Li M., Dunlap V., Nelson PG. (1999). The thrombin receptor mediates functional activity-dependent neuromuscular synapse reduction via protein kinase C activation in vitro. *J Neurobiol.* 38 (3):369-381.

Jing S., Tapley P., Barbacid M. (1992). Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron.* 9 (6):1067-1079.

Johnson D., Lanahan A., Buck CR., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M., Chao M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell.* 47 (4):545-554.

Johnson H., Hoëkfelt T., Ulfhake B. (1999). Expression of p75NTR, TrkB and TrkC in non-manipulated and axotomized motoneurons of aged rats. *Mol Brain Res.* 69:21-34.

Jordan CL. (1996). Ciliary neurotrophic factor may act in target musculature to regulate developmental synapse elimination. *Dev Neurosci.* 18 (3):185-198.

Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos SJ. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *FEBS J.* 274 (15):3799-3845. Review.

Kang HJ. and Schuman EM. (1995). Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Physiol Paris.* 89 (1):11-22.

Kaplan DR., Hempstead BL., Martin-Zanca D., Chao MV., Parada LF. (1991). The Trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science.* 252 (5005):554-558.

Katoh-Semba R., Kaisho Y., Shintani A., Nagahama M., Kato K. (1996). Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J Neurochem.* 66 (1):330-337.

Katz B. and 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. (1966). *Nerve, muscle and synapse.* New York: McGraw-Hill.

Katz B. and Miledi R. (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J Physiol.* 207 (3):789-801.

Katz B. and Miledi R. (1979). Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 205:369-378.

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.* 97 (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.

Kleiman RJ., Tian N., Krizaj D., Hwang TN., Copenhagen DR., Reichardt LF. (2000). BDNF-Induced potentiation of spontaneous twitching in innervated myocytes requires calcium release from intracellular stores. *J Neurophysiol*. 84 (1):472-483.

Klein R., Parada LF., Coulier F., Barbacid M. (1989). TrkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J*. 8 (12):3701-3709.

Klein R., Conway D., Parada LF., Barbacid M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*. 61 (4):647-656.

Klein R., Nanduri V., Jing SA., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones KR., Reichardt LF., Barbacid M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*. 66 (2):395-403.

Klein R., Lamballe F., Bryant S., Barbacid M. (1992). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron*. 8 (5):947-956.

Klein R., Silos-Santiago I., Smeyne RJ., Lira SA., Brambilla R., Bryant S., Zhang L., Snider WD., Barbacid M. (1994). Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates the muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature*. 368 (6468):249-51.

Kolbeck R., Jungbluth S., Barde YA. (1994). Characterisation of neurotrophin dimers and monomers. *Eur J Biochem*. 225 (3):995-1003.

Koliatsos VE., Clatterbuck RE., Winslow JW., Cayouette MH., Price DL. (1993). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*. 10 (3):359-367.

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.

Kupfer C. and Koelle GB. (1951). A histochemical study of cholinesterase during formation of the motor end plate of the albino rat. *J Exp Zool*. 116 (3):397-413.

Kwon YW., Abbondanzo SJ., Stewart CL., Gurney ME. (1995). Leukemia inhibitory factor influences the timing of programmed synapses withdrawal from neonatal muscles. *J Neurobiol*. 28 (1):35-50.

Kwon YW. and Gurney ME. (1996). Brain-derived neurotrophic factor transiently stabilizes silent synapses on developing neuromuscular junctions. *J Neurobiol.* 29 (4):503-516.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lallemend F., Hadjab S., Hans G., Moonen G., Lefebvre PP., Malgrange B. (2005). Activation of protein kinase C β 1 constitutes a new neurotrophic pathway for deafferented spiral ganglion neurons. *J Cell Sci.* 118 (19):4511-4525.

Lamballe F., Klein R., Barbacid M. (1991). TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell.* 66 (5):967-979.

Lanuza MA., Li MX., Jia M., Kim S., Davenport R., Dunlap V., Nelson PG. (2000). Protein kinase C-mediated changes in synaptic efficacy at the neuromuscular junction in vitro: the role of postsynaptic acetylcholine receptors. *J Neurosci Res.* 61 (6):616-625.

Lanuza MA., Garcia N., Santafe M., Nelson PG., Fenoll-Brunet MR., Tomàs 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 (4):330-340.

Lanuza MA., Garcia N., Santafé M., González CM., Alonso I., Nelson PG., Tomàs J. (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res.* 67 (5):607-617.

Lanuza MA., Garcia N., González CM., Santafé MM., Nelson PG., Tomas J. (2003). Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J Neurosci Res.* 73 (1):10-21.

Lanuza MA., Gizaw R., Vilorio A., González CM., Besalduch N., Dunlap V., Tomàs J., Nelson PG. (2006). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor in myotube-cholinergic neuron cocultures. *J Neurosci Res.* 83 (8):1407-1414.

Lanuza MA., Besalduch N., Garcia N., Sabaté M., Santafé MM., Tomàs J. (2007). Plastic-embedded semithin cross-sections as a tool for high-resolution immunofluorescence analysis of the neuromuscular junction molecules: Specific cellular location of protease-activated receptor-1. *J Neurosci Res.* 85 (4):748-7456.

Le Novère N. and Changeux JP. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol.* 40 (2):155-172.

Lee FS., Kim AH., Khursigara G., Chao MV. (2001). The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol.* 11 (3):281-6.

Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde YA. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* 341 (6238):149-152.

Lessmann V. (1998). Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol.* 31 (5):667-674. Review.

Levi-Montalcini R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 237:1154-1162.

Lewin GR. and Barde YA. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 19:289-317. Review.

Lewin SL., Utey DS., Cheng i cols., (1997). Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope.* 107:992-999.

Li X., Franz J., Lottspeich F., Götz R. (1997). Recombinant fish neurotrophin-6 is a heparin-binding glycoprotein: implications for a role in axonal guidance. *Biochem J.* 324 (2):461-466.

Lichtman JW. and Colman H. (2000). Synapse elimination and indelible memory. *Neuron.* 25 (2):269-78. Review.

Liem RS., Brouwer N., Copray JC. (2001). Ultrastructural localisation of intramuscular expression of BDNF mRNA by silver-gold intensified non-radioactive in situ hybridisation. *Histochem Cell Biol.* 116 (6):545-551.

Lima R de F., Prado VF., Prado MA., Kushmerick C. (2010). Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem.* 113 (4):943-951.

Lin MJ. and Lin-Shiau SY. (1997). Multiple types of Ca²⁺ channels in mouse motor nerve terminals.. *Eur J Neurosci.* 9 (4):817-823.

Lindsay RM. (1993). Brain-derived neurotrophic factors: an NGF-related neurotrophin, in Neurotrophinc factors. Ed. Loughlin SE. and Fallon JF., pp 257-284. Academic Press, San Diego.

Loeb JA. and Fischbach GD. (1997). Neurotrophic factors increase neuregulin expression in embryonic ventral spinal cord neurons. *J Neurosci.* 17 (4):1416-1424.

Loeb JA., Hmadcha A., Fischbach GD., Land SJ., Zakarian VL. (2002). Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors. *J Neurosci.* 22 (6):2206-2214.

Lohof AM., Ip NY., Poo MM. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature.* 363 (6427):350-353.

Lomen-Hoerth C. and Shooter EM. (1995). Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J Neurochem.* 64 (4):1780-1789.

Losavio A. and Muchnik S. (1997). Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol.* 273:1835-1841.

Lu B. and Figurov A. (1997). Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci.* 8 (1):1-12.

Lu B. and Je HS. (2003). Neurotrophic regulation of the development and function of the neuromuscular synapses. *J Neurocytol.* 32 (5-8):931-941. Review.

Maisonpierre PC., Belluscio L., Friedman B., Alderson RF., Wiegand SJ., Furth ME., Lindsay RM., Yancopoulos GD. (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 5 (4):501-509.

Mantilla CB., Zhan WZ., Sieck GC. (2004). Neurotrophins improve neuromuscular transmission in the adult rat diaphragm. *Muscle Nerve.* 29 (3):381-386.

Martin-Zanca D., Oskam R., Mitra G., Copeland T., Barbacid M. (1989). Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol.* 9 (1):24-33.

Masliah E., Crews L., Hansen L. (2006). Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9 (3):91-99. Review.

Mason I. (2000). The RET receptor tyrosine kinase: activation, signalling and significance in neural development and disease. *Pharm Acta Helv.* 74 (2-3):261-264. Review.

McAllister AK., Katz LC., Lo DC. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:295-318. Review.

McCann CM., Nguyen QT., Santo Neto H., Lichtman JW. (2007). Rapid synapse elimination after postsynaptic protein synthesis inhibition in vivo. *J Neurosci.* 27 (22):6064-6067.

McKay SE., Garner A., Caldero J., Tucker RP., Large T, Oppenheim RW. (1996). The expression of trkB and p75 and the role of BDNF in the developing neuromuscular system of the chick embryo. *Development*. 122 (2):715-724.

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

Mellor H. and Parker PJ. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*. 332:281-292.

Meyer M., Matsuoka I., Wetmore C., i cols., (1992). Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*. 119:45-54.

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

Montal M. and Opella SJ. (2002). The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1565:287-293.

Mousavi K. and Jasmin BJ. (2006). BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci*. 26 (21):5739-5749.

Nelson PG., Lanuza MA., Jia M., Li MX. and Tomàs J. (2003). Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. *J of Neurocytol*. 32:803-816.

Nelson PG. (2005). Activity-dependent synapse modulation and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res*. 2 (5):497-506. Review.

Nguyen QT., Parsadonian AS., Snider WD., Lichtman JW. (1998). Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science*. 279 (5357):1725-1729.

Nichols CG. and Lopatin AN. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol*. 59:171-191.

Nilsson AS., Fainzilber M., Falck P., Ibáñez CF. (1998). Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett*. 424 (3):285-290.

Nishizuka Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258:607-614.

Nishizuka Y. (1995). Protein Kinase C and lipid signalling for sustained cellular responses. *FASEB J*. 9:484-496.

Nonomura T., Kubo T., Oka T., Shimoke K., Yamada M., Enokido Y., Hatanaka H. (1996). Signaling pathways and survival effects of BDNF and NT-3 on cultured cerebellar granule cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 97(1):42-50.

Novikov L., Novikova L., Kellerth JO. (1997). Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience.* 79:765-774.

Nowycky MC., Fox AP., Tsien RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 316 (6027):440-443.

Nykjaer A., Lee R., Teng KK., Jansen P., Madsen P., Nielsen MS., Jacobsen C., Kliemann M., Schwarz E., Willnow TE., Hempstead BL., Petersen CM. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature.* 427 (6977):843-848.

Nykjaer A., Willnow TE., Petersen CM. (2005). p75^{NTR}-live or let die. *Curr Opin Neurobiol.* 15 (1):49-57. Review.

Obermeier A., Lammers R., Wiesmüller KH., Jung G., Schlessinger J., Ullrich A. (1993). Identification of Trk binding sites for SHC and phosphatidylinositol 3'-kinase and formation of a multimeric signaling complex. *J Biol Chem.* 268 (31):22963-22966.

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

Offenhäuser N., Böhm-Matthaei R., Tsoulfas P., Parada L., Meyer M. (1995). Developmental regulation of full-length trkC in the rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci.* 7 (5):917-925.

Ogata T. (1988). Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Arch Histol Cytol.* 51:385-424.

Omura T., Sano M., Omura K., Hasegawa T., Doi M., Sawada T., Nagano A. (2005). Different expressions of BDNF, NT-3, and NT-4 in muscle and nerve after various types of peripheral nerve injuries. *J Peripher Nerv Syst.* 10 (3):293-300.

Oppenheim RW., Yin QW., Prevet D., Yan Q. (1992). Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature.* 360 (6406):755-757.

Patapoutian A. and Reichardt LF. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 11 (3):272-280.

Patterson SL., Abel T., Deuel TA., Martin KC., Rose JC., Kandel ER. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*. 16 (6):1137-1145.

Patton BL., Cunningham JM., Thyboll J., Kortessmaa J., Westerblad H., Edström L., Tryggvason K., Sanes JR. (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci*. 4 (6):597-604.

Peng HB., Yang JF., Dai Z., Lee CW., Hung HW., Feng ZH., Ko CP. (2003). Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J Neurosci*. 23 (12):5050-5060.

Penner R. and Dreyer F. (1986). Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch*. 406 (2):190-197.

Perissinotti PP., Giugovaz Tropper B., Uchitel OD. (2008). L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*. 27 (6):1333-1344.

Perrini S., Henriksson J., Zierath JR., Widegren U. (2004). Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes*. 53 (1):21-24.

Personius KE. and Balice-Gordon RJ. (2000). Activity-dependent editing of neuromuscular synaptic connections. *Brain Res Bull*. 53 (5):513-522.

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

Personius KE., Chang Q., Mentis GZ., O'Donovan MJ., Balice-Gordon RJ. (2007). Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (28):11808-11813.

Pitts EV., Potluri S., Hess DM., Balice-Gordon RJ. (2006). Neurotrophin and Trk-mediated signaling in the neuromuscular system. *Int Anesthesiol Clin*. 44 (2):21-76.

Poo MM. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2: 24–32.

Pousinha PA., Diogenes MJ., Ribeiro JA., Sebastião AM. (2006). Triggering of BDNF facilitatory action on neuromuscular transmission by adenosine A2A receptors. *Neurosci Lett*. 404 (1-2):143-147.

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

Protti DA. and Uchitel OD. (1993). Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport*. 5 (3):333-336.

Protti DA., Reisin R., Mackinley TA., Uchitel OD. (1996). Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology*. 46 (5):1391-1396.

Purves D., Snider WD., Voyvodic JT. (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature*. 336 (6195):123-128. Review.

Ramer MS., Duraisingam I., Priestley JV., McMahon SB.. (2001). Two-tiered inhibition of axon regeneration at the dorsal root entry zone. *J Neurosci*. 21 (8):2651-2660.

Redfern PA. (1970). Neuromuscular transmission in new-born rats. *J Physio*. 209:701-709.

Reichardt LF. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361 (1473):1545-1564. Review.

Ribchester RR. and Taxt T. (1983). Motor unit size and synaptic competition in rat lumbrical muscles reinnervated by active and inactive motor axons. *J Physiol*. 344:89-111.

Ribchester RR. and Barry JA. (1994). Spatial versus consumptive competition at polyneuronally innervated neuromuscular junctions. *Exp Physiol*. 79 (4):465-494. Review.

Riccio A., Pierchala BA., Ciarallo CL., Ginty DD. (1997). An NGF-TrkA-mediated retrograde signal to transcription factor CREB in sympathetic neurons. *Science*. 277 (5329):1097-1100.

Ridge RM. and Betz WJ. (1984). The effect of selective, chronic stimulation on motor unit size in developing rat muscle. *J Neurosci*. 4 (10):2614-2620.

Riley CP., Cope TC., Buck CR. (2004). CNS neurotrophins are biologically active and expressed by multiple cell types. *J Mol Histol*. 35: 771-783.

Rizo J. and Rosenmund C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol*. 15 (7):665-674.

Robitaille R., Garcia ML., Kaczorowski GJ., Charlton MP. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of neurotransmitter release. *Neuron*. 11:645-655.

Rodriguez-Tébar A., Dechant G., Barde YA. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*. 4 (4):487-492.

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

Roux PP. and Barker PA. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog in Neurobiol*. 67:203-233.

Roux S., Saint Cloment C., Curie T., Girard E., Mena FJ., Barbier J., Osta R., Molgó J., Brûlet P. (2006). Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci*. 24 (6):1546-1554.

Sakuma K., Watanabe K., Sano M., Uramoto I., Nakano H., Li YJ., Kaneda S., Sorimachi Y., Yoshimoto K., Yasuhara M., Totsuka T. (2001). A possible role for BDNF, NT-4 and TrkB in the spinal cord and muscle of rat subjected to mechanical overload, bupivacaine injection and axotomy. *Brain Res*. 907 (1-2):1-19.

Sakuma K., Watanabe K., Totsuka T., Sano M., Nakano H., Nakao R., Nishikawa JJ., Sorimachi Y., Yoshimoto K., Yasuhara M. (2002). The reciprocal change of neurotrophin-4 and glial cell line-derived neurotrophic factor protein in the muscles, spinal cord and cerebellum of the dy mouse. *Acta Neuropathol*. 104 (5):482-92.

Salpeter M. (1987). *The vertebrate neuromuscular junction*. ed. Alan R Liss, Inc., New York.

Salpeter MM., Marchaterre M., Herris R. (1988). Distribution of extrajunctional acetylcholine receptors on a vertebrate muscle: evaluated by using a scanning electron microscope autoradiographic procedure. *J Cell Biol*. 106:2087-2093.

Sandoval-Romero A. and Félix-Grijalva R. (2003). Cerebellar ataxia and absence epilepsy: genes, channels, neurons and mice *Rev Neurol*. 37 (5):447-453.

Sanes JR., Engvall E., Butkowski R., Hunter DD. (1990a). Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*. 111 (4):1685-1699.

Sanes JR., Hunter DD., Green TL., Merlie JP. (1990b). S- laminin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol*. 55: 419-430.

Sanes JR. and Lichtman JW. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*. 22:389-442. Review.

Sanes JR., and Lichtman JW. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*. 2 (11):791-805.

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 (3):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 (1):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. *European Journal of Neuroscience*. 17:119-127.

Santafé MM., Salon I., Garcia N., Lanuza MA., Uchitel OD., Tomàs J. (2004). Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neuroscience*. 123:61-73.

Santafé MM., Lanuza MA., Garcia N., Tomàs J. (2005). Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat. *Synapse*. 57 (2):76-84.

Santafé MM., Lanuza MA., Garcia N., Tomàs J. (2006). Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *Eur J Neurosci*. 23 (8):2048-2056.

Santafé MM., Garcia N., Lanuza MA., Tomàs J. (2007). Protein kinase C activity affects neurotransmitter release at polyinnervated neuromuscular synapses. *J Neurosci Res*. 85 (7):1449-1457.

Santafé MM., Garcia N., Lanuza MA., Tomàs M., Besalduch N., Tomàs J. (2009). Presynaptic muscarinic receptors, calcium channels, and protein kinase C modulate the functional disconnection of weak inputs at polyinnervated neonatal neuromuscular synapses. *J Neurosci Res*. 87 (5):1195-1206.

Sardari S., Pourmorad F., Tiemoa A., Nam NH., Parang K. (2003). Protein kinases and their modulation in the central nervous system. *Curr Medicinal Chemistry*. 3 (4):341-364.

Schinder AF. and Poo M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 23 (12):639-645. Review.

- Schlessinger J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225.
- Schuman EM. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 9 (1):105-109. Review.
- Searl TJ. and Silinsky EM. (1998). Increases in acetylcholine release produced by phorbol esters are not mediated by protein kinase C at motor nerve endings. *J Pharmacol Exp Ther.* 285 (1):247-251.
- Sheard PW., MUSAAD K., Duxson MJ. (2002). Distribution of neurotrophin receptors in the mouse neuromuscular system. *Int J Dev Biol.* 46 (4):569-575.
- Sheng ZH., Rettig J., Takahashi M., Catterall WA. (1994). Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron.* 13 (6):1303-1313.
- Slater CR., Lyons PR., Walls TJ., Fawcett PR, Young C. (1992). Structure and function of neuromuscular junctions in the vastus lateralis of man. A motor point biopsy study of two groups of patients. *Brain.* 115 (2):451-478.
- Snider WD. and Lichtman JW. (1996). Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol Cell Neurosci.* 7 (6):433-42.
- Sobue G., Yamamoto M., Doyu M., Li M., Yasuda T., Mitsuma T. (1998). Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75^{NGFR}, Trk, TrkB, and TrkC) in human peripheral neuropathies. *Neurochem Res.* 23 (6):821-829.
- Söderholm H., Olsson A., Lavenius E., Rönstrand L., Nånberg E. (2001). Activation of Ras, Raf-1 and protein kinase C in differentiating human neuroblastoma cells after treatment with phorbol ester and NGF. *Cell Signal.* 13 (2):95-104.
- Soppet D., Escandon E., Maragos J., Middlemas DS., Reid SW., Blair J., Burton LE., Stanton BR., Kaplan DR., Hunter T., Nikolics K., Parade LF. (1991). The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell.* 65 (5):895-903.
- Spafford JD., Chen L., Feng ZP., Smit AB., Zamponi GW. (2003). Expression and modulation of an invertebrate presynaptic calcium channel alpha1 subunit homolog. *J Biol Chem.* 278 (23):21178-21187.
- Squinto SP., Stitt TN., Aldrich TH., Davis S., Bianco SM., Radziejewski C., Glass DJ., Masiakowski P., Furth ME., Valenzuela DM., Distefano PS., Yancopoulos GD. (1991). TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell.* 65 (5):885-893.
- Stanley EF. (1993). Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron.* 11 (6):1007-1011.

Stephens RM., Loeb DM., Copeland TD., Pawson T., Greene LA., Kaplan DR. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*. 12 (3):691-705.

Stoilov P., Castren E., Stamm S. (2002). Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 290 (3):1054-1065.

Stoop R. and Poo MM. (1995). Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science*. 267 (5198):695-699.

Stoop R. and Poo MM. (1996). Synaptic modulation by neurotrophic factors: differential and synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci*. 16 (10):3256-3264.

Straub V. and Campbell KP. (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*. 10 (2):168-175. Review.

Sudhof TC. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*. 375: 45-653.

Sudhof TC. (2004). The synaptic vesicle cycle, *Annu. Rev. Neurosci*. 27:509-547.

Sugiura Y., Woppmann A., Miljanich GP., Ko CP. (1995). A novel ω -conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J. Neurocytol*. 24:15-27.

Sugiura Y. and Ko CP. (1997). Novel modulatory effect of L-type calcium channels at newly formed neuromuscular junctions. *J Neurosci*. 17 (3):1101-1111.

Swope SL., Moss SJ., Raymond LA., Haganir RL. (1999). Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 33:49-78. Review.

Tanaka C. and Nishizuka Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*. 17:551-567. Review.

Tarabal O., Calderó J., Esquerda JE. (1996). Intramuscular nerve sprouting induced by CNTF is associated with increases in CGRP content in mouse motor nerve terminals. *Neurosci Lett*. 219 (1):60-4.

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.

Teng HK., Teng KK., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida RD., Kermani P., Torkin R., Chen ZY., Lee FS., Kraemer RT., Nykjaer A., Hempstead BL. (2005). ProBDNF induces

neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{NTR} and sortilin. *J Neurosci.* 25 (22):5455-5463.

Thoenen H. and Stöckel K. (1975). Ortho- and retrograde axonal transport: importance for the function of adrenergic neurones. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2:1-5.

Thoenen H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 14 (5):165-170. Review.

Thoenen H. (2000). Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res.* 128:183-191. Review.

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 WJ. (1983). Lack of segmental selectivity in elimination of synapses from soleus muscle of new-born rats. *J Physiol.* 335:343-352.

Thompson WJ. (1985). Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. *Cell Mol Neurobiol.* 5(1-2):167-182.

Timmusk T., Belluardo N., Metsis M., Persson H. (1993). Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci.* 5 (6):605-613.

Tomàs J., Lanuza MA., Santafé M.M, Fenoll-Brunet MR., Garcia N. (2000). Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol Histopathol.* 15:43-52.

Tomàs M., Garcia N., Santafé MM., Lanuza M., Tomàs J. (2009). Protein kinase C involvement in the acetylcholine release reduction induced by amyloid-beta (25-35) aggregates on neuromuscular synapses. *J Alzheimers Dis.* 18 (4):877-884.

Tonchev AB., Boneva NB., Kaplamadzhiev DB., Kikuchi M., Mori Y., Sahara S., Yamashima T. (2008). Expression of neurotrophin receptors by proliferating glia in postischemic hippocampal CA1 sector of adult monkeys. *J Neuroimmunol.* 205 (1-2):20-4.

Todd KJ., Auld DS., Robitaille R. (2007). Neurotrophins modulate neuron-glia interactions at a vertebrate synapse. *Eur J Neurosci.* 25 (5):1287-96.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 (9):4350-4354.

Tresch MC. and Kiehn O. (2002). Synchronization of motor neurons during locomotion in the neonatal rat: predictors and mechanisms. *J Neurosci.* 22 (22):9997-10008.

Tsui-Pierchala BA. and Ginty DD. (1999). Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci.* 19 (19):8207-8218.

Uchitel OD., Protti DA., Sanchez 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 Natl Acad Sci USA.* 89 (8):3330-3333.

Urbano FJ., Depetris RS., Uchitel OD. (2001). Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflugers Arch.* 441 (6):824-831.

Urbano FJ., Rosato-Siri MD., Uchitel OD. (2002). Calcium channels involved in neurotransmitter release at adult, neonatal and P/Q-type deficient neuromuscular junctions. *Mol Membr Biol.* 19 (4):293-300

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 USA.* 100 (6):3491-3496.

Urbano FJ., Pagani MR., Uchitel OD. (2008). Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *J Neuroimmunol.* 201-202:136-144. Review.

Van Essen DC., Gordon H., Soha JM., Fraser SE. (1990). Synaptic dynamics at the neuromuscular junction: mechanisms and models. *J Neurobiol.* 21 (1):223-249. Review.

Wang T., Xie K., Lu B. (1995). Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci.* 15 (7 Pt 1):4796-4805.

Wang XH. and Poo MM. (1997). Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron.* 19 (4):825-835.

Wang X., Berninger B., Poo M. (1998). Localized synaptic actions of neurotrophin-4. *J Neurosci.* 18 (13):4985-4992.

Waters J. and Smith SJ. (2000). Phorbol esters potentiate evoked and spontaneous release by different presynaptic mechanisms. *J Neurosci.* 20 (21):7863-7870.

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 Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 335 (6):605-612.

Wiedemann FR., Siemen D., Mawrin C., Horn TF., Dietzmann K. (2006). The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. *Int J Biochem Cell Biol.* 38 (4):610-620.

Wehrman T., He X., Raab B., Dukipatti A., Blau H., Garcia KC. (2007). Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron.* 53 (1):25-38.

Wooten MW., Seibenhener ML., Soh Y., Ewald SJ., White KR., Lloyd ED., Olivier A., Parker PJ. (1992). Characterization and differential expression of protein kinase C isoforms in PC12 cells. Differentiation parallels an increase in PKC beta II. *FEBS Lett.* 298 (1):74-78.

Wyatt RM. and Balice-Gordon RJ. (2003). Activity-dependent elimination of neuromuscular synapses. *Journal of Neurocytology* 32:777-794.

Xie K., Wang T., Olafsson P., Mizuno K., Lu B. (1997). Activity-dependent expression of NT-3 in muscle cells in culture: implications in the development of neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 17 (9):2947-2958.

Yamada M., Ohnishi H., Sano S., Nakatani A., Ikeuchi T., Hatanaka H. (1997). Insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 are tyrosine-phosphorylated and associated with phosphatidylinositol 3-kinase in response to brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *J Biol Chem.* 272 (48):30334-30339.

Yamakage M. and Namiki A. (2002). Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels. *Can J Anaesth.* 49 (2):151-164. Review.

Yamamoto M., Sobue G., Yamamoto K., Terao S., Mitsuma T. (1996). Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75^{NGFR}, TrkA, TrkB, and TrkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem Res.* 21 (8):929-938.

Yang F., Je HS., Ji Y., Nagappan G., Hempstead B., Lu B. (2009). Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *J Cell Biol.* 185 (4):727-741.

Yee WC., Pertronk A., Alderson K., Yuan CM. (1988). Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. *J. Neurocytol.* 17:649-656.

Yin Q., Kemp GJ., Frostick SP. (1998). Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *J Hand Surg.* 23:433-437.

Zhang X. and Poo MM. (2002). Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon. *Neuron*. 36 (4):675-688.

Zhu PH. and Vrbová G. (1992). The role of Ca^{2+} in the elimination of polyneuronal innervation of rat soleus muscle fibres. *Eur J Neurosci*. 4 (5):433-437.

VIII- APORTACIONS CIENTÍFIQUES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

Del treball realitzat en aquesta tesi, s'han presentat comunicacions científiques a congressos nacionals i internacionals i s'han escrit els següents articles:

Articles científics

Santafé MM., Garcia N., Lanuza M.A., Tomàs M., Besalduch N., Tomàs J. (2009). **Presynaptic muscarinic receptors, calcium channels, and protein kinase C modulate the functional disconnection of weak inputs at polyinnervated neonatal neuromuscular synapses.** J Neurosci Res. 87:1195–1206.

Garcia N., Santafé MM., Tomàs M., Lanuza MA., Besalduch N., Tomàs J. (2010). **Involvement of neurotrophin-3 (NT-3) in the functional elimination of synaptic contacts during neuromuscular development.** Neurosci Lett. 473 (2):141-145.

Garcia N., Santafé MM., Tomàs M., Lanuza MA., Besalduch N., Tomàs J. (2010). **Neurotrophin-4 couples to locally modulated ACh release at the end of neuromuscular synapse maturation.** Neurosci Lett. 468 (1):72-74.

Garcia N., Santafé MM., Tomàs M., Lanuza MA., Besalduch N., Tomàs J. (2010). **Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the functional elimination of synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development.** J Neurosci Res. 88 (7):1406-1419.

Garcia N., Tomàs M., Santafé MM., Lanuza MA., Besalduch N., Tomàs J. (2010). **Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase B receptor, and p75^{NTR} receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction.** J Peripher Nerv Syst. 15 (1):40-49.

Garcia N., Santafé MM., Tomàs M., Lanuza MA., Besalduch N., Priego M., Tomàs J. (2010). **The glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) does not acutely change**

acetylcholine release in developing and adult neuromuscular junction. (2010).
Neurosci Lett. 480: 127–131.

Tomàs J., Santafé MM., Lanuza MA., García N., Besalduch N, Tomàs M. (2010). **Silent synapses in neuromuscular junction development.** J Neurosci Res. *Acceptat.*

Garcia N., Tomàs M., Santafe MM., Besalduch N., Lanuza MA. and Tomàs J. **The interaction between tropomyosin-related kinase b receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals.** J Neurosci. *Acceptat.*

Comunicacions a congressos

García N., Tomàs M., Cabrero J., Málaga X., Olivé S., Santafé MM., Lanuza MA., Tomàs J. **Localització immunohistoquímica de factors neurotròfics (BDNF, NT-3, NT-4, GDNF, CNTF) i dels seus receptors (p75^{NTR}, TrkB, TrkC, GFR-alpha 1, CNTFR) en sinapsis neuromusculars en rates adultes i recent nascudes.** VI Simposio de Neurobiologia experimental. Sociedad Catalana de Biología. Barcelona, 2006.

Tomàs M., Santafé MM., Lanuza M., Ortiz N., Besalduch N., Garcia N., Tomàs J. **Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) involvement in the functional elimination of redundant synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development.** 6th Forum of European Neuroscience. Ginebra, 2008.

Tomàs M., Santafé MM., Lanuza M., Ortiz N., Besalduch N., Garcia N., Tomàs J. **Implicació del Brain derived neurotrophic factor (BDNF) en l'eliminació funcional de contactes sinàptics redundants en la sinapsi neuromuscular poliinnervada durant el desenvolupament.** VII Simposio de Neurobiologia experimental. Societat Catalana de Biologia. Barcelona, 2008.

Tomàs M., Garcia N., Santafé MM., Lanuza M., Ortiz N., Besalduch N., Tomàs J.
Implicación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la eliminación funcional de los contactos sinápticos en las sinapsis neuromusculares poliinervadas durante el desarrollo. XIII Congreso Sociedad Española de Neurociencia. Tarragona, 2009.

Tomàs M., Santafé MM., Garcia N., Lanuza MA., Besalduch N., Ortiz N., Tomàs J.
Diferential effect of exogenously added neurotrophin-3 and -4 in postnatal synapse elimination at the neuromuscular junction. 7th Forum of European Neuroscience. Amsterdam, 2010.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

IMPLICACIÓ DE LES NEUROTROFINES EN EL DESENVOLUPAMENT I CONSOLIDACIÓ DE LES SINAPSIS NEUROMUSCULARS

Marta Tomas Marginet

978-84-693-8856-3/T.1949-2010