



RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.

Denise Fischer Hubert

Dipòsit Legal: T 65-2016

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Mercedes Priego Luque

**RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI
NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ
AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA**

TESIS DOCTORAL

dirigida per:

Dra. Neus Garcia Sancho

Dr. Manel Santafé Martínez

Dr. Josep M. Tomàs Ferré



Unitat d'Histologia i Neurobiologia

Departament Ciències Mèdiques Bàsiques

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus, 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Unitat d'Histologia i Neurobiologia
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

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

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

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

FAIG CONSTAR que aquest treball, titulat "Receptors d'adenosina i sinapsi neuromuscular: localització i relació amb l'alliberament de l'acetilcolina", que presenta Mercedes Priego Luque per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat i que compleix els requisits per poder optar a la Menció Internacional.

Reus, 4 de Setembre del 2015

Els codirectors de la tesi doctoral

Dra. Neus Garcia Sancho

Dr. Manel Santafé Martínez

Dr. Josep M. Tomàs Ferré

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

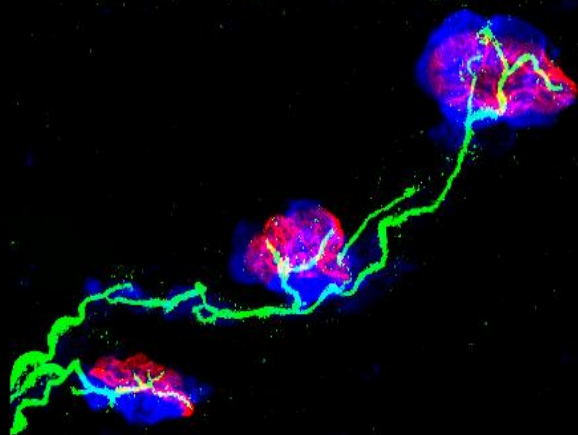
Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada en la Unitat d'Histologia i Neurobiologia del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili, sota la codirecció de la Dra. Neus Garcia Sancho, el Dr. Manel Santafé Martínez i el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

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

Als meus pares,

al meu germà i la Violeta

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Agraïments

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

En aquestes línies m'agradaria expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que heu participat durant la realització d'aquesta tesi i que m'heu acompanyat durant aquest camí. Sense el vostre suport, aquest treball hauria sigut impossible.

En primer lloc, al Dr Josep Tomàs, per confiar en mi des del principi fins al final. Gràcies per donar-me l'oportunitat de treballar en aquesta Unitat i poder aprendre tot el que he après a nivell professional i personal durant aquests anys.

A la Dra. Garcia, Neus. Que dir-te... gràcies per tot el que he après al teu costat, que no és poc. Per tornar en confiar i creure en mi, per la teva comprensió, ànims i suport incondicional en els moments bons i dolents. Pels teus consells, per trobar sempre un moment per parlar amb mi i ajudar-me sempre que ho he necessitat, per la teva total implicació personal i professional. Per ser en alguns moments una mica "estricte i exigent" i fer que hem superi dia a dia. Mil gràcies Neus!

Al Dr. Santafé, Manel, gràcies per co-dirigir-me la tesi, per ensenyar-me tot el que he après d'electrofisiologia, per la teva paciència, pels teus consells, per dedicar-me el teu temps i la teva ajuda en tot el que he necessitat. Gràcies per ser tant atent amb mi, per tenir-me en consideració, pel teu suport en tot el que he fet i per acollir-me com ho has fet en el laboratori. Pels cafès de bon matí i pels dinars pre-seminaris de neuro dels divendres.

A la Dra. Lanuza, Maria Àngel, gràcies per tot el que he après al teu costat, per ser tan complaent amb mi, per dedicar-me el teu temps, ajudar-me en tot el que he necessitat i per les estones compartides. Mil gràcies!

A la Dra Fenoll, Rosa, gràcies per ser tan amable, complaent i preocupar-te per mi. Per ajudar-me, donar-me suport i ànims quan ho he necessitat. Al Dr. Ortiz i a la Dra Morlà per ajudar-me en tot el que he necessitat.

A la Dra. Marta Tomàs gràcies per l'ajuda prestada durant el màster i en el laboratori, amb els animals i amb les pràctiques sempre ho he necessitat, has sigut de molta ajuda.

Agraïments

A Irina, gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por tus "ironías" y por compartir la complejidad del mundo de la electrofisiología conmigo. Como no mencionar a Aída y a Cuca por los buenos momentos pasados en el laboratorio. No hem podia oblidar dels fisios! D'en Ramon Margalef, el Marc Bosque i el Marc Sisquella (vaja trio!). Gràcies pels bons moments, els riures que m'heu fet passar i per donar una mica de color al laboratori. Ha sigut molt fàcil treballar al vostre costat.

A la Silvia gràcies per estar disposada a ajudar-me en tot el que he necessitat, per la teva amabilitat, per la teva paciència i per dedicar-me el teu temps. Mil gràcies!

Als alumnes interns que han passat per la Unitat durant els meus anys de doctorat: a la Laura Zamora, la Laura Pérez, la Marta Pastor, la Desa Cervera, la Paula Cotino, la Sandra Villalba i en Néstor. Gràcies per la vostra implicació en la Unitat i per les ganes d'aprendre, escoltar-me i deixar-vos ensenyar.

A la Unitat de Farmaco, de Lípids i al CRB gràcies per facilitar-me la feina amb els complicats Westerns blots i ajudar-me en tot el que he necessitat. A Paula gracias por todo, tus ánimos, por el día tan estupendo que pasamos en *Cardiff Bay* y por las ricas comidas Galesas. Y también, a Esther Rodríguez y Anabel por vuestra ayuda. ¡Muchas gracias!

A Amparo, Esperanza y Juan, gracias por toda la ayuda que me habéis prestado en todo momento con los animales siempre que la he necesitado. Sin vosotros el trabajo hubiera sido mucho más difícil. Habéis sido una parte importante durante este camino, muchas gracias.

A la Montse i a l'Imma, gràcies per ajudar-me en tot el que he necessitat, sobretot en les tasques tan complicades de burocràcia. Sense vosaltres hauria sigut tot molt complicat.

Gràcies al Jose Luis i al Joan, per la vostre amabilitat i paciència que heu tingut en tot moment. Per facilitar-me les coses sempre que he tingut algun problema en les pràctiques, a l'hora de reservar un aula o deixar-me alguna clau quan ho he necessitat.

Als Serveis científic-tècnics, Mercè, Núria i Rita. Gràcies per tota la vostra ajuda en tot el que he necessitat i pel vostre treball. La vostra tasca ha sigut important.

A los becarios que me habéis acompañado durante el doctorado. A Laura LLuis, Núria Taltavull, Vane, Mónica Muñoz, Nacho, Keithy, Margara, Marta, Adela, Katihuska, Daisy y Jordi. También, a Xavi, Edu y Marcel aunque no seáis becarios de la URV ha sido como si lo fueseis. Gracias por los buenos momentos de risas que hemos pasado juntos. Por los “Lizarranes”, por el “*Mongui & Commander day*” (ese “supertartatxo” tan rico), por esos “becari night’s” tan divertidos. Y por supuesto por las divertidas “Reus Pintxo Party” sin la vuestra colaboración, esfuerzo y talento culinario no hubiera sido tan divertido ni posible. A Silvia Navarro por las conversaciones profundas e interesantes que dieron tanto de sí. Por último, a las alemanas Sabrine y a Christine por los momentos tan divertidos compartidos.

A part de la URV vull donar les gràcies a les persones que han format part de la meva experiència predoctoral gal·lesa.

Firstly, I would like to express my gratitude to Professor Yves Barde for accepting me in his lab for four months there I had the opportunity to work with very qualified personnel. I have learned a lot and the experience was deeply fulfilling. It has been a very enriching situation for me.

Al Dr. Chacón, Pedro gracias por acogerme en el laboratorio desde el primer día hasta el último durante mi estancia predoctoral en Cardiff. Por todo lo que he aprendido a tu lado, que no ha sido poco, por la paciencia que has tenido conmigo, por dedicarme todo el tiempo del mundo, por ayudarme en todo lo que he necesitado, por lo generoso y bondadoso que has sido conmigo. ¡Mil gracias! In addition, I would like to express many thanks to Dr. Xinsheng, Dr. Stephane, Katharina, Spyros, Laura and Sven. Thank you for your help. It has been a pleasure to work with you and to meet you. Thank you for a lovely day out in Caerphilly, the nice days of world championship, salsa nights and for my farewell party. I will never forget you.

Agraïments

A Eva, Laia, Susana, Laura y Marta. Gracias por los días de turismo galés que hemos pasado juntas, por las “ladies night”, por las risas y por los buenos momentos compartidos. A Pilar, por las ilustrativas y divertidas noches de salsa que hacían que la semana fuera más amena. Many thanks to Alicia Kon for taking me in the way you did, for your affection and sweetness and for sharing good times with me and helping me improve my English. Many thanks to my flatmates of Talybont court: Pooja, Sevi Spyros and Amos. It has been a pleasure to meet you. No me podría olvidar de Laura Pérez gracias por darle ese toque de “locura” y diversión a mi estancia en Cardiff. A Ismael por ese “arte malagueño” tan gracioso que tienes y a Elena por los buenos momentos compartidos. A José que decirte... mil gracias por los “Varsity’s”, por enseñarme las recónditas calles de Cardiff y los Pubs, por las “pelis interminables”, por el “*allotment day*”, por el día de turismo en Bristol, por tus consejos, por las risas y buenos momentos compartidos. Gracias a vosotros y a *Cardiff School of Bioscience* habéis hecho que mi estancia en Cardiff fuera inolvidable.

A més de la facultat i de la meva estància predoctoral gal·lesa també m’agradaria donar les gràcies a les persones que han format part de la meva vida i que m’han donat suport incondicionalment.

A Maria José, Dani e Isa, gracias por las “cenetes i més cosetes” han sido realmente divertidas, por el “imperdible vermuteo” de los domingos y los buenos momentos compartidos. A ti Montse Cabases que decirte...mil gracias por las “cervecitas”, nuestras “supercenas saludables + peli compartidas”, por los consejos, tu comprensión, por escucharme en todo momento, sobre todo por tu apoyo incondicional y por ser como eres. ¡Mil gracias!

George, thank you for teaching me all that I have learned from you to believe in me and in my abilities, for your patience, support and encouragement. For being “very strict” with me sometimes and making sure that I overcome myself every day, motivating me and finally for making complex things look easy.

A Raúl, que decirte... gracias por ayudarme en todo, por tus consejos y poder contar contigo siempre que lo he necesitado durante todos estos años, que no son pocos. Por ser mi compañero de residencia, de estudios, de laboratorio y sobretodo un amigo. Por los buenos momentos pasados y por los divertidos jueves universitarios junto con Bego (¡vaya trío!). Incluso, por esas “duras” noches de estudio durante el período de exámenes junto con Anna, Edu, Terete y Marionna (Nona, mil gracias por tus clases magistrales de química y estadística sin ellas no hubiéramos aprobado nunca en la vida) y también por los Quími-Chaplin's. También quiero dar las gracias a Isa Pedrós, Sergio, Josep, Maricel, Xavi, Casares, Marcos y Ainara por las risas y los buenos momentos compartidos. A Jéssica, Bego y a Piluca por apoyarme, por preguntarme siempre como me va la tesis y por los ánimos que me habéis dado. A Beby y Manoli Cano por vuestro cariño y dulzura. Todos vosotros habéis sido una parte importante durante este camino, sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí. También quería dar a las gracias a mis compañeros de icompani Adriana, Montse, Carles, Eduard, Alvaro y Beatriz por vuestro aprecio y calor recibido. Así como a Rosa Vila por sus consejos, apoyo, dulzura y por enseñarme a “molestar” ¡Mil gracias!

A Teresa, Itziar, Xavi, Ángel y Montse por vuestro apoyo, por los consejos, ayuda incondicional y escucharme en todo momento. Por darme una visión diferente de la vida. ¡Mil gracias!

Quería dar las gracias en general a mi familia, mis tíos y tías, a mis primos, a mis abuelos que lamentablemente no me han podido ver doctorarme. Gracias por vuestro cariño, por preocuparos por mí y por preguntarme cómo me va la tesis. Gracias a los amigos de la familia: Conchi, Silver, Maite, Pol, Gloria, Chema, Eli, Julián, Cristina, Cleofé, Christine y Manoli. Gracias por acoger a mi familia y acogerme a mí de la manera que lo hacéis, por estar ahí y sobre todo por vuestro cariño. A Jin por la lección de la vida que nos has dado a todos, y por enseñarnos el significado del “querer”. A José Martín, lamentablemente te has ido muy pronto sin avisar y sin poder ver el final del camino. Que decirte... mil gracias por todo. Por unir siempre, por ser tan bondadoso y generoso sin pedir nada a cambio, por ser tan complaciente y compartir todo con mi familia y con tus propios amigos. Por ser el “motor de arranque”, por los infinitos buenos que nos has hecho pasar y que por supuesto hemos pasado junto a tí y junto tu familia. Siempre estarás presente en nuestras vidas y en nuestros recuerdos. ¡Mil gracias!

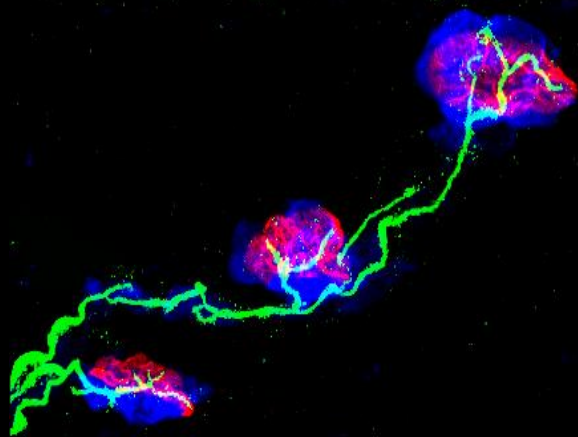
Agraïments

A la família Baldrich-Mora. Al Francisco i l'Amparo, gràcies per acollir-me en la vostra família fer-me sentir com una més i preocupar-vos per mi, des del començament fins ara. Al Xantal per compartir la "complicada tasca" de ser padrins de la neneta tan bonica que tenim, la Vio. A la Mónica per la teva comprensió, empatia i sobretot pel suport moral mutu de "tieta-tieta" amb la petita artista de la família, que no ha sigut una tasca gens fàcil.

A Vio, tu llegada fue un regalo muy dulce para todos. Gracias por dejarme participar en tu vida y darme tanto siendo tan pequeña, pero tan grande a la vez. Por darme tu manita, por compartir tus cosas, tus juegos (aunque siempre encuentres la manera de ganar), por tu complicidad, por ser un motivo de lucha y por las pelis de dibujos + palomitas. Sin tí las cosas no serían lo mismo. ¡Mil gracias!

A mis padres, que deciros... gracias por ser un pilar fundamental en mi vida. Por haber depositado vuestra confianza y creer en mí en todo momento. Por estar ahí, por vuestra constancia, perseverancia, apoyo incondicional y darme ánimos en los momentos complicados y difíciles. Si he llegado hasta aquí, también ha sido gracias a vosotros y a vuestro esfuerzo. A Ángel y Cristina por vuestro apoyo y por darnos esta nenita tan dulce y tan bonita que tenemos. Mil gracias.

¡Muchas gracias a todos!



Índex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

	Pàgina
i. ÍNDEX DE FIGURES	i
ii. ÍNDEX DE TAULES	v
iii. LLISTAT D'ABREVIACIONS	vii
RESUM	1
ABSTRACT	5
CAPÍTOL I. INTRODUCCIÓ	9
1. LA UNIÓ NEUROMUSCULAR	11
1.2 Components de la sinapsi neuromuscular	13
1.2.1 Component presinàptic.....	13
1.2.2 Component postsinàptic.....	15
1.2.3 Component glial.....	17
1.2.4 Làmina basal.....	18
2. NEUROTRANSMISSIÓ EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR	18
3. MOLÈCULES IMPLICADES EN LA TRANSMISSIÓ NEUROMUSCULAR	22
3.1 Receptors muscarínics (mAChRs)	23
3.2 Proteïnes quinases	26
3.2.1 Proteïna quinasa A (PKA).....	27
3.2.2 Proteïna quinasa C (PKC).....	29
3.3 Canals de calci dependents de voltatge (VDCCs)	30
4. L'ADENOSINA I ELS RECEPTORS PURINÈRGICS	32
4.1 Fonts d'adenosina	33
4.2 Classificació dels receptors purinèrgics	35
4.2.1 Classificació i estructura dels receptors d'adenosina: A ₁ , A _{2A} , A _{2B} i A ₃	36
4.2.2 Vies de senyalització dels receptors d'adenosina.....	38
4.2.3 Farmacologia dels receptors d'adenosina.....	41
4.2.4 Distribució dels receptors d'adenosina.....	42
4.2.5 Funcions dels receptors d'adenosina.....	43

	Pàgina
CAPÍTOL II. HIPÒTESI I OBJECTIUS	47
1. HIPÒTESI	49
1.1 Hipòtesi general	49
1.2 Hipòtesi específica	49
2. OBJECTIUS	49
2.1 Objectiu general	49
2.2 Objectius específics	50
CAPÍTOL III. MATERIALS I MÈTODES	51
1. ANIMALS	53
2. MODEL EXPERIMENTAL: LA UNIÓ NEUROMUSCULAR	54
3. OBTENCIÓ DE MOSTRES	55
3.1 Dissecció del LAL	55
3.2 Dissecció del cervell i la medul·la espinal	56
4. ANTICOSSOS	57
5. DETECCIÓ DE PROTEÏNES MITJANÇANT ELECTROFORESI SDS-PAGE I WESTERN BLOT	59
5.1 Fonament teòric	59
5.1.1 Electroforesi SDS-PAGE.....	60
5.1.2 Transferència.....	61
5.1.3 Immunodetecció.....	62
5.2 Detecció dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ mitjançant l'electroforesi i el Western blot	62
5.2.1 Obtenció del lisat de proteïna i determinació de la proteïna total.....	62
5.2.2 Electroforesi.....	63
5.2.3 Western blot.....	64
5.2.4 Immunodetecció.....	65
5.2.5 Proteïnes de control de càrrega: actina i tubulina.....	65
5.2.6 Densitometria.....	66
5.2.7 Controls negatius.....	66
5.2.8 Controls positius.....	68

	Pàgina
6. TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL PER FLUORESCÈNCIA	69
6.1 Fonament de la tècnica	69
6.2 Localització dels components de la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica convencional	70
6.3 Procediment de la localització dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ en la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica convencional	72
7. TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA D'ALTA RESOLUCIÓ PER FLUORESCÈNCIA	74
7.1 Fonament teòric	74
7.2 Localització de les tres cèl·lules de la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica d'alta resolució	75
7.3 Localització dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ en la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica d'alta resolució	77
8. CONTROLS NEGATIUS AMB LA TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL I D'ALTA RESOLUCIÓ PER FLUORESCÈNCIA	78
9. MICROSCÒPIA LÀSER CONFOCAL	80
10. METODOLOGIA ELECTROFISIOLÒGICA	81
10.1 Fonament de la tècnica	81
10.2 Preparació de la mostra pels estudis electrofisiològics	81
10.3 Mètodes de prevenció de la contracció	82
10.4 Equip d'electrofisiologia	85
10.5 Registre de la neurotransmissió	86
10.5.1 Neurotransmissió evocada.....	86
10.5.2 Neurotransmissió espontània.....	87
10.6 Depressió i facilitació. Registre de l'activitat sinàptica a 40 i 100 Hz	88
10.7 Registre continu a 1 Hz o a altes concentracions de calci	88
10.8 Procediment de l'experiment d'electrofisiologia	88
10.9 Paràmetres avaluats en els experiments funcionals	90
10.9.1 Amplada dels potencials de placa evocats.....	90
10.9.2 Amplada dels potencials de placa espontanis.....	91
10.9.3 Freqüència dels potencials de placa espontanis.....	91

	Pàgina
10.9.4 Contingut quàntic.....	91
10.9.5 Potencial de membrana.....	91
10.10 Anàlisi d'electrofisiologia.....	92
10.11 Substàncies utilitzades en electrofisiologia.....	93
IV. RESULTATS.....	97
1. EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA (A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃) EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC LAL.....	99
1.1 Expressió del receptor d'adenosina A ₁	99
1.2 Expressió del receptor d'adenosina A _{2A}	101
1.3 Expressió del receptor d'adenosina A _{2B}	101
1.4 Expressió del receptor d'adenosina A ₃	103
2. LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA (A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃) EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR.....	105
2.1 Localització del receptor d'adenosina A ₁ en el múscul LAL de nadó i d'adult.....	106
2.2 Localització del receptor d'adenosina A _{2A} en el múscul LAL de nadó i d'adult.....	109
2.3 Localització del receptor d'adenosina A _{2B} en el múscul LAL adult.....	113
2.4 Localització del receptor d'adenosina A ₃ en el múscul LAL adult.....	115
3. EXPERIMENTS FUNCIONALS.....	118
4. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA.....	119
4.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada.....	120
4.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada.....	120
4.1.2 Modulació del receptor A ₁ en la neurotransmissió evocada....	122
4.1.3 Modulació del receptor A _{2A} en la neurotransmissió evocada.	122
4.1.4 Efecte de la inhibició específica del receptors A _{2B} i A ₃ en la neurotransmissió evocada.....	122

	Pàgina
4.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) en la neurotransmissió evocada.....	123
4.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió evocada.....	123
4.3.1 Efecte de la CADO a concentracions micromolars en la neurotransmissió evocada quan els receptors d'adenosina estan bloquejats.....	125
4.3.2 Efecte de la CADO a concentracions nanomolars en la neurotransmissió evocada quan els receptors d'adenosina estan bloquejats.....	126
5. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA.....	128
5.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània.....	128
5.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània.....	128
5.1.2 Modulació del receptor A ₁ en la neurotransmissió espontània.....	129
5.1.3 Modulació del receptor A _{2A} en la neurotransmissió espontània.....	129
5.1.4 Efecte de la inhibició específica del receptors A _{2B} i A ₃ en la neurotransmissió espontània.....	130
5.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) en la neurotransmissió espontània.....	130
5.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió espontània.....	131
5.3.1 Efecte de la CADO a concentracions micromolars en la neurotransmissió espontània quan els receptors d'adenosina estan bloquejats.....	132
5.3.2 Efecte de la CADO a concentracions nanomolars en la neurotransmissió espontània quan els receptors d'adenosina estan bloquejats.....	133

	Pàgina
6. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 40 Hz.....	136
6.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	136
6.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	136
6.1.2 Modulació del receptor A ₁ durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	138
6.1.3 Modulació del receptor A _{2A} durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	138
6.1.4 Efecte de la inhibició específica dels receptors A _{2B} i A ₃ durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	138
6.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	140
6.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	140
6.3.1 Efecte de la CADO quan els receptors d'adenosina estan bloquejats durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	141
6.3.2 Efecte de la CADO quan el receptor A ₁ està bloquejat durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	142
6.3.3 Efecte de la CADO quan el receptor A _{2A} està bloquejat durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	142
6.4 Facilitació.....	144
7. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA DURANT L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 100 Hz.....	145
7.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 100 Hz.....	145
7.2 Efecte del bloqueig del receptor A₁ i del receptor A_{2A} durant l'activitat sinàptica a 100 Hz.....	146
7.3 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) durant l'activitat sinàptica a 100 Hz.....	146
8. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA.....	148

	Pàgina
8.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics (mAChRs) en la neurotransmissió evocada	149
8.1.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada a 1 Hz.....	149
8.1.1.1 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics.....	149
8.1.1.2 Efecte de la CADO quan es bloquegen tots els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada.....	150
8.1.1.3 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M1.....	151
8.1.1.4 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M2.....	152
8.1.2 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz.....	153
8.1.2.1 Efecte del bloqueig dels receptors d'adenosina i dels receptors muscarínics durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	154
8.1.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i del bloqueig dels receptors muscarínics durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	154
8.2 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa A (PKA) en la neurotransmissió evocada	155
8.2.1 Efecte de la inhibició inespecífica dels receptors d'adenosina i la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada.....	157
8.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i la modulació l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada.....	157
8.3 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa C (PKC) en la neurotransmissió evocada	159
8.3.1 Efecte dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada.....	159

	Pàgina
8.3.1.1 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada</i>	159
8.3.1.2 <i>Modulació del receptor A₁ i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada</i>	160
8.3.1.3 <i>Modulació del receptor A_{2A} i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada</i>	160
8.3.2 Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió evocada.....	162
8.3.2.1 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'un estímul continu (1 Hz) en la neurotransmissió evocada</i>	162
8.3.2.2 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'altres concentracions de calci extern en la neurotransmissió evocada</i>	163
8.4 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió evocada	164
8.4.1 Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels VDCCs tipus P/Q en la neurotransmissió evocada.....	165
8.4.2 Efecte de l'adenosina exògena en presència d'altres concentracions de magnesi en la neurotransmissió evocada.....	165
9. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA	167
9.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics (mAChRs) en la neurotransmissió espontània	167
9.1.1 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics.....	168
9.1.2 Efecte de la CADO quan es bloquegen tots els receptors muscarínics en la neurotransmissió espontània.....	168

	Pàgina
9.1.3 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M1.....	169
9.1.4 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M2.....	170
9.2 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa A (PKA) en la neurotransmissió espontània.....	172
9.2.1 Efecte de la inhibició inespecífica dels receptors d'adenosina i la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània.	172
9.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i la modulació l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània.....	173
9.3 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa C (PKC) en la neurotransmissió espontània.....	174
9.3.1 Efecte dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània.....	174
9.3.1.1 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània.....</i>	<i>174</i>
9.3.1.2 <i>Modulació del receptor A₁ i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània.....</i>	<i>175</i>
9.3.1.3 <i>Modulació del receptor A_{2A} i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània.....</i>	<i>175</i>
9.3.2 Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió espontània.....	177
9.3.2.1 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'un estímul continu (1 Hz) en la neurotransmissió espontània.....</i>	<i>177</i>
9.3.2.2 <i>Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'altres concentracions de calci extern en la neurotransmissió espontània.....</i>	<i>177</i>
9.4 Relació entre els receptors d'adenosina amb els canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió espontània.....	179
9.4.1 Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels VDCCs tipus P/Q en la neurotransmissió espontània.....	180

	Pàgina
9.4.2 Efecte de l'adenosina exògena en presència d'altres concentracions de magnesi en la neurotransmissió espontània.....	180
CAPÍTOL V. DISCUSSIÓ.....	185
1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR.....	188
1.1 Expressió dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃.....	188
1.2 Localització dels receptors d'adenosina en la sinapsi neuromuscular.....	193
1.2.1 Localització del receptor d'adenosina A ₁	193
1.2.2 Localització del receptor d'adenosina A _{2A}	195
1.2.3 Localització del receptor d'adenosina A _{2B}	196
1.2.4 Localització del receptor d'adenosina A ₃	197
2. FACTORS QUE AFECTEN ALS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA MODULACIÓ DE LA NEUROTRANSMISSIÓ.....	199
2.1 Mecanisme de prevenció de la contracció muscular.....	199
2.2 Efecte de l'adenosina amb la temperatura en la neurotransmissió.....	201
3. ELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ.....	202
4. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA.....	203
4.1 Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada a 1 Hz.....	203
4.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) i de la cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió evocada a 1 Hz.....	209
5. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA.....	212
5.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània.....	213
5.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) i de la 2-cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió espontània.....	215

	Pàgina
6. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 40 Hz.....	217
6.1 Efecte dels moduladors inespecífics i específics dels receptors d'adenosina, de l'adenosina endògena i de la 2-cloroadenosina (CADO) durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	218
7. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 100 Hz.....	221
8. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA.....	224
8.1 Relació dels receptors d'adenosina i els receptors muscarínics (mAChRs) en la neurotransmissió.....	224
8.1.1 Efecte entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada.....	225
8.1.2 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz.....	226
8.2 Relació entre receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió evocada.....	228
8.3 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió evocada.....	232
9. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA.....	234
9.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics (mAChRs) en la neurotransmissió espontània.....	234
9.2 Relació entre els receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió espontània.....	235
9.3 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió espontània.....	238
VI. CONCLUSIONS.....	243
Conclusions.....	245
Conclusions.....	249
VII. BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY.....	255

	Pàgina
<i>SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS/CONTRIBUCIONS</i>	
<i>CIENTÍFIQUES</i>	307
<i>ANNEX</i>	317
<i>ANNEX I: Agents moduladors utilitzats en els experiments funcionals</i>	319
<i>ANNEX II: Agents moduladors addicionals</i>	321
<i>ANNEX III: Resum dels receptors d'adenosina</i>	323

	Pàgina
Figura I.1. Estructura de la sinapsi neuromuscular	12
Figura I.2. Neurotransmissió sinàptica	21
Figura I.3. Formació i catabolisme de l'adenosina	34
Figura I.4. Model estructural del receptor d'adenosina	37
Figura I.5. Esquema representatiu de l'activació dels receptors P1	39
Figura M.1. Múscul LAL. Impregnació argèntica i tinció en blau de metilè	55
Figura M.2. Imatge del múscul LAL	56
Figura M.3. Exemples d'immunohistoquímiques convencionals del múscul LAL de nadó i d'adult	72
Figura M.4. Imatge de la unió neuromuscular d'un tall semifí tenyit amb blau de metilè	75
Figura M.5. Exemple d'una unió neuromuscular neonatal i adulta en una secció transversal semifina	77
Figura M.6. Controls negatius amb la tècnica d'immunohistoquímica d'alta resolució i convencional en músculs LALs adults	80
Figura M.7. Camareta de registre	82
Figura M.8. Equip bàsic d'electrofisiologia de registre intracel·lular	86
Figura M.9. Potencial de placa evocat	87
Figura M.10. Exemples dels potencials de placa miniatura (mEPPs de l'anglès <i>miniature endplate potential</i>)	87
Figura M.11. Relació dosi-resposta del DMSO en la neurotransmissió	93
Figura R.1. Western blot dels receptors d'adenosina A₁ i A_{2A} en els músculs LALs P6 i P30	100
Figura R.2. Western blot del receptor d'adenosina A_{2B} en els músculs LALs P6 i P30	102
Figura R.3. Western blot del receptor d'adenosina A₃ en els músculs LALs P6 i P30	104
Figura R.4. Triple marcatge del receptor d'adenosina A₁ (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P6	106
Figura R.5. Triple marcatge del receptor d'adenosina A₁ (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30	108
Figura R.6. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2A} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P6	110

	Pàgina
Figura R.7. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2A} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30...	112
Figura R.8. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2B} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30...	115
Figura R.9. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_3 (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30.....	116
Figura R.10. Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada.....	121
Figura R.11. Modulació específica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada.....	123
Figura R.12. Efecte de l'adenosina endògena i de la CADO en la neurotransmissió evocada.....	125
Figura R.13. Efecte de la CADO 10 μ M i 300 nM en presència dels bloquejadors purinèrgics en l'alliberació evocada.....	127
Figura R.14. Modulació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània.....	131
Figura R.15. Efecte de l'adenosina endògena i de la CADO en la neurotransmissió espontània.....	132
Figura R.16. Efecte de la CADO en l'alliberació espontània d'acetilcolina.....	135
Figura R.17. Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	137
Figura R.18. Modulació específica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz.....	139
Figura R.19. Efecte de l'adenosina endògena i la CADO en la modulació de la depressió sinàptica a 40 Hz.....	141
Figura R.20. Efecte de la CADO 10 μ M quan els receptors d'adenosina estan bloquejats.....	143
Figura R.21. Efecte general dels moduladors purinèrgics en els <i>pair pulses</i>	144
Figura R.22. Efecte dels moduladors dels receptors d'adenosina en la depressió sinàptica a 100 Hz.....	147
Figura R.23. Efecte de la modulació inespecífica dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig inespecífic dels receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada.....	151

	Pàgina
Figura R.24. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig dels receptors muscarínics tipus M1 i M2 en la neurotransmissió evocada.....	153
Figura R.25. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina i del bloqueig dels receptors muscarínics en la depressió sinàptica.....	156
Figura R.26. Relació dels receptors d'adenosina amb la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada.....	158
Figura R.27. Modulació dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada.....	161
Figura R.28. Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió evocada.....	164
Figura R.29. Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) i en condicions de baixa entrada de calci en la neurotransmissió evocada.....	166
Figura R.30. Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics.....	170
Figura R.31. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig dels receptors muscarínics tipus M1 i M2 en la neurotransmissió espontània.....	171
Figura R.32. Relació dels receptors d'adenosina amb la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània.....	173
Figura R.33. Modulació dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània.....	176
Figura R.34. Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió espontània.....	179
Figura R.35. Efecte de l'adenosina amb la inhibició dels canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) i en condicions de baixa entrada de calci en la neurotransmissió espontània.....	181
Figura D.1. Participació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada i espontània.....	216
Figura D.2. Participació dels receptors d'adenosina en l'activitat sinàptica evocada a 40 i 100 Hz.....	223

1. Índex de figures

	Pàgina
Figura D.3. Relació entre els receptors d'adenosina i els muscarínics en l'alliberació evocada i espontània.....	225
Figura D.4. Relació entre els receptors d'adenosina i els muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz.....	227
Figura D.5. Relació entre els receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió evocada.....	228
Figura D.6. Participació de la proteïna quinasa C (PKC), proteïna quinasa A (PKA) i els receptors muscarínics (mAChRs) en l'alliberació de neurotransmissió.....	229

	Pàgina
Taula I.1. Correspondència de les diferents nomenclatures dels VDCCs.....	31
Taula I.2. Receptors d'adenosina.....	42
Taula M.1. Solucions i material utilitzat per l'obtenció dels diferents teixits.....	57
Taula M.2. Solucions i material utilitzat per l'homogeneïtzació i la determinació de la concentració de proteïna.....	63
Taula M.3. Solucions i material utilitzats en l'electroforesi SDS-PAGE i Western blot.....	67
Taula M.4. Reactius utilitzats en l'homogeneïtzació, determinació de proteïnes, en l'electroforesi SDS-PAGE i la tècnica del Western blot.....	67
Taula M.5. Anticossos primaris utilitzats per l'electroforesi SDS-PAGE i Western blot.....	68
Taula M.6. Anticossos secundaris utilitzats per l'electroforesi SDS-PAGE i el Western blot.....	68
Taula M.7. Pèptids utilitzats com a controls negatius i positius en el Western blot i en les immunohistoquímiques.....	68
Taula M.8. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en la immunohistoquímica convencional i d'alta resolució.....	73
Taula M.9. Material, reactius i solucions utilitzades per la realització de la immunohistoquímica convencional.....	73
Taula M.10. Material i solucions utilitzades per la realització de la immunohistoquímica d'alta resolució.....	78
Taula M.11. Resines <i>spurr</i> utilitzades per l'obtenció de blocs.....	78
Taula M.12. Material i solucions utilitzades en electrofisiologia.....	92

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

A₁(R)	<i>Adenosine A₁ receptor(s)</i>
A_{2A}(R)	<i>Adenosine A_{2A} receptor(s)</i>
A_{2B}(R)	<i>Adenosine A_{2B} receptor(s)</i>
A₃(R)	<i>Adenosine A₃ receptor(s)</i>
Aβ	<i>amyloid β peptide</i>
Acetil-coA	<i>Acetyl coenzyme A</i>
ACh	<i>Acetylcholine</i>
AChE	<i>Acetylcholinesterase</i>
AChR	<i>Acetylcholine receptor(s)</i>
ADO	<i>Adenosine</i>
ADO_{en}	<i>Endogenous adenosine</i>
ADO_{ex}	<i>Exogenous adenosine</i>
ADP	<i>adenosine diphosphate</i>
AMP	<i>adenosine monophosphate</i>
APS	<i>ammonium persulfate</i>
AR	<i>Adenosine receptor(s)</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BAPTA	<i>1,2-bis-(2-aminophenoxy)-ethane-N,N,N,N=-tetraacetic acid tetra(acetoxy-methyl)</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTS	<i>N-benzyl-p-toluene sulphonamide</i>
Ca⁺²	<i>Calcium ion</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
Cd⁺²	<i>Cadmium ion</i>
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
ChAt	<i>choline acetyltransferase</i>
CIP	<i>Cerebral ischemic preconditioning</i>
Cl⁻	<i>Chloride ion</i>
cm	<i>Centimeter</i>
CM_{ex}	<i>Extrasynaptic muscle cell</i>
CM_s	<i>Synaptic muscle cell</i>
CN_p	<i>Preterminal nerve cell</i>
CN_t	<i>Terminal nerve cell</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>

iii. Llistat d'abreviacions

CNTs	<i>Concentrative nucleoside transporter</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CS	<i>Schwann cell</i>
CS_m	<i>preterminal/myelogenous Schwann cell</i>
CS_t	<i>Terminal/teloglial Schwann cell</i>
D	<i>Dimensions</i>
D/UGC	<i>dystrophin/utrophin glycoprotein complex</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DC	<i>Detergent compatible</i>
DER	<i>Diglycidil ether polupropylene gricol</i>
DMAE	<i>Dimethylamino ethanol</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
dTC	<i>d-tubocurarine</i>
ECL	<i>Enhancer luminiscent</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor(s)</i>
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ENTs	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>
EPP	<i>End plate potential</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
ERL	<i>Vinyl cyclohexenedioxide</i>
fEPSP	<i>field excitatory postsynaptic potentials</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FS	<i>Synaptic cleft</i>
g	<i>Gram or Relative centrifugal force</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GHS-R1a	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
[³H]	<i>Hydrogen-3 or isotope of hydrogen or triton</i>
He	<i>Helium</i>
HEK-293T	<i>Human Embrionic Kidney cells 293</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HVA	<i>High-voltatge-activated</i>
Hz	<i>Hertz (cycle/s)</i>
IMP	<i>Inosine-5'-monophosphate</i>

IP₃	<i>Inositol triphosphate</i>
K⁺	<i>Potassium ion</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
kHz	<i>Kilohertz (10³ Hz)</i>
LAL	<i>Levatus auris longus</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
L-DOPA	<i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
LRP4	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein-4</i>
LTD	<i>Long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
LVA	<i>Low-voltatge-activated</i>
m	<i>Quantal content or myocyte</i>
M	<i>Molar</i>
M1-M4	<i>Transmembrane domain of acetylcholine receptor</i>
M1-M5	<i>Subtypes of muscarinic acetylcholine autoreceptors</i>
mA	<i>Milliamperes (10⁻³A)</i>
mAChR	<i>Muscarinic acetylcholine autoreceptor(s)</i>
MAPK(s)	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mEPP	<i>Miniature end plate potential</i>
M. espinal	<i>Spinal cord</i>
mg	<i>Milligram (10⁻³)</i>
Mg⁺²	<i>Magnesium ion</i>
ml	<i>Milliliter (10⁻³l)</i>
mm	<i>Millimeter (10⁻³m)</i>
mM	<i>Millimolar (10⁻³M)</i>
MP-3	<i>Mini-Protean 3</i>
MPC-1	<i>monocyte chemotactic protein 1 or CCL2</i>
mRNA	<i>RNA messenger</i>
m/s	<i>Meter/second</i>
ms	<i>Milliseconds (10⁻³s)</i>
MuSK	<i>Muscle-specific kinase</i>
mV	<i>Millivolts (10⁻³V)</i>
n	<i>Nerve</i>
Na⁺	<i>Sodium ion</i>
nAChR	<i>Nicotinic acetylcholine receptor(s)</i>
NAD⁺	<i>Nicotamide-adenine</i>
Ne	<i>Neon</i>
nm	<i>Nanometer (10⁻⁹ m)</i>

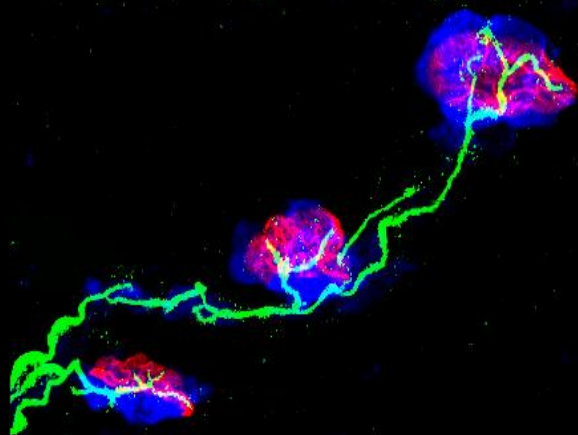
iii. Llistat d'abreviacions

nM	<i>Nanomolar (10^{-9} M)</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
NMJ	<i>Neuromuscular Junction</i>
NSA	<i>nonenyl succinic anhydre</i>
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>
NT-4	<i>Neurotrophin-4</i>
OLG	<i>Oligodendrocytes</i>
OPC	<i>oligodendrocyte precursor cells</i>
P	<i>Level of statistical significance or Postnatal day</i>
P1(R)	<i>Purinergic P1 receptor(s)</i>
P2(R)	<i>purinergic P2 receptor(s)</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PG	<i>G protein</i>
pH	<i>Hydrogen potential</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PKG	<i>Protein kinase G</i>
PLA	<i>Phospholipase A</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
PSin	<i>Synaptic folds</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polimerase chain reaction</i>
SLB	<i>Sample Laemmli buffer</i>
SD	<i>Standard desviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfata</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfata polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
Ser	<i>Serine</i>
SPSS©	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
S-S	<i>Disulfide bond</i>
STS	<i>Semithin cross-sections</i>
TBE	<i>2, 2, 2 Tribromoethanol</i>
TBS	<i>TRIS Buffered Saline</i>
TBS-0.1%	<i>TRIS Buffered Saline with tween 0.1%</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>

Thr	<i>Threonine</i>
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine</i>
TRIS	<i>Hidroxymethyl aminomethane</i>
Trk	<i>Tropomyosin-related kinase</i>
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
Tyr	<i>Tyrosine</i>
U	<i>Units</i>
V	<i>Volts</i>
VDCC(s)	<i>Voltatge-dependent calcium channels</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
v/v	<i>Volume/volume</i>
w/v	<i>Weight/volume</i>
x	<i>Magnification</i>
ZA	<i>Active zone</i>
α-BTX	<i>Alpha-bungarotoxin</i>
°C	<i>Celsius degrees</i>
μ-CgTx	<i>μ-conotoxin GIIIB</i>
μg	<i>Microgram (10^{-6}g)</i>
μl	<i>Microlitre (10^{-6}l)</i>
μm	<i>Micrometer (10^{-6}m)</i>
μM	<i>Micromolar (10^{-6}M)</i>
μs	<i>Microseconds (10^{-6}s)</i>
MΩ	<i>MiliOhm</i>

La nomenclatura completa i les concentracions de treball de les substàncies utilitzades en els estudis funcionals d'aquesta tesi es mostren en l'apartat 10.11 Substàncies utilitzades en electrofisiologia a Materials i Mètodes i la seva abreviatura en l'annex I. L'abreviatura, la nomenclatura completa i el tipus de substàncies electrofisiològiques (agonistes i antagonistes) que no s'han utilitzat en els estudis funcionals d'aquesta tesi però que es mencionen en aquesta tesi es detallen en l'Annex II.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



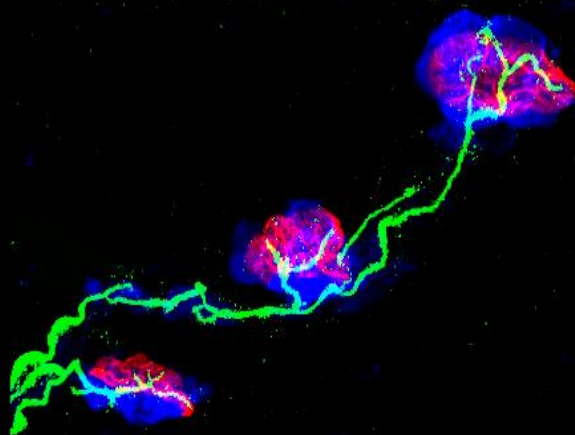
Resum

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

En els contactes neuronals, l'alliberació de neurotransmissor està bàsicament controlada per la confluència funcional de diversos receptors metabotrópics que modulen les vies de senyalització a través d'un mecanisme que depèn de l'activitat. Actualment, es coneix que l'adenosina i l'ATP alliberats pels terminals nerviosos modulen el metabolisme presinàptic a través dels receptors purinèrgics. L'adenosina inicia el seu efecte biològic com a neuromodulador, actuant a través de quatre subtipus d'autoreceptors metabotrópics d'adenosina (PIR) anomenats A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 . Fins el moment, la distribució precisa dels PIRs en la unió neuromuscular (NMJ) perifèrica no es coneix amb exactitud. Aquest coneixement és essencial per entendre la senyalització intrasínaptica. Mitjançant una combinació de la tècnica d'immunohistoquímica i microscòpia confocal s'han localitzat aquests receptors en els terminals motors de la NMJ del múscul *Levator auris longus* de ratolí. En aquesta tesi, s'ha treballat en condicions en les quals la maquinària de la neurotransmissió es troba més preservada. S'ha bloquejat els canals de sodi dependents de voltatge de les cèl·lules musculars amb la μ -conotoxina GIIB, obtenint així una millor observació del paper fisiològic dels PIRs en la NMJ. En els estudis electrofisiològics s'ha mostrat que la presència de moduladors inespecífics i específics dels PIRs no produeixen canvis en l'alliberació evocada. No obstant, els PIRs semblen estar implicats en l'alliberació espontània (potencials de placa en miniatura mEPPs). La freqüència dels mEPPs augmenta degut al bloqueig inespecífic i pel contrari, disminueix amb l'estimulació inespecífica, tenint el receptor A_1 un paper principal. A més, s'ha investigat la implicació dels PIRs en la plasticitat presinàptica a curt termini durant una activitat sinàptica imposada (40 Hz o 100 Hz durant 2 minuts). S'ha observat que els PIRs es troben implicats en l'efecte protector de la depressió sinàptica. L'aplicació de l'agonista no metabolitzable CADO produeix una disminució del contingut quàntic i de la depressió. Finalment, s'ha investigat la relació funcional en l'alliberació de transmissor entre els PIRs i els autoreceptors muscarínics d'acetilcolina (mAChRs), la proteïna quinasa A (PKA), la proteïna quinasa C (PKC) i els canals de calci dependents de voltatge (VDCCs). Per tant, els PIRs poden no tenir un efecte real en la transmissió neuromuscular en condicions basals. No obstant, aquests receptors limiten l'alliberació espontània d'acetilcolina tenint un paper conservador i poden protegir la funció sinàptica disminuint la magnitud de la depressió durant una activitat repetitiva. A més, s'ha observat una interdependència del mecanisme purinèrgic i muscarínic en la modulació de l'alliberació de neurotransmissor i una cooperació en el control de la depressió. Per un altre banda, un desequilibri dels PIRs produeix un desacoblament de la PKC en la neurotransmissió evocada. Addicionalment, s'ha observat

Resum

una interacció funcional d'aquest receptors amb la PKA i els VDCCs en la modulació de la neurotransmissió.

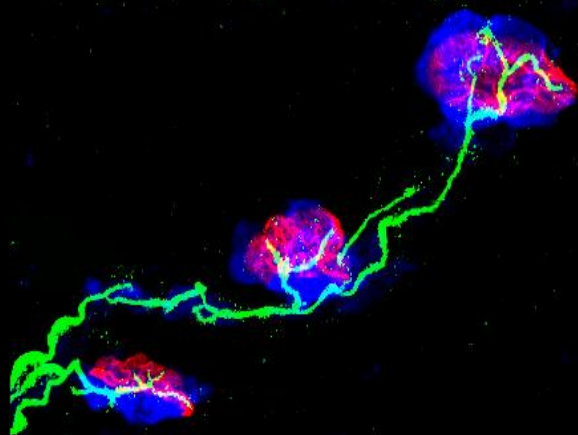


Abstract

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

In neuronal contacts, neurotransmitter release is ultimately controlled by functional confluence of several metabotropic receptors mediated signalling pathways in modulated and activity-dependent process. It is now known that adenosine and ATP released by nerve endings modulate the presynaptic metabolism through purinergic receptors. Adenosine initiates its biological effects, as a neuromodulator, acting through four subtypes of metabotropic adenosine autoreceptors (P1Rs) named A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃. The precise distribution of adenosine receptors in paradigmatic peripheral neuromuscular junction (NMJs) is not fully resolved, although this knowledge is essential to understanding intrasynaptic signalling. We used confocal immunocytochemistry to identify these receptors in the motor endings at *Levator auris longus* (LAL) mouse NMJs. We hypothesize that in more preserved neurotransmission machinery conditions (blocking the voltage-dependent sodium channel of the muscle cells with μ -conotoxin GIIIB) the physiological role of the P1Rs in the NMJ must be better observed. We found that the presence of nonselective or selective modulators of P1R subtypes does not result in any changes in the evoked release. However, P1Rs seem to be involved in spontaneous release (miniature endplate potentials mEPPs) because mEPP frequency is increased by non-selective block but decreased by non-selective stimulation, with A₁ receptors playing the main role. We assayed the role of P1Rs in presynaptic short-term plasticity during imposed synaptic activity (40 Hz or 100 Hz for 2 min). We showed that P1Rs are involved in a protective effect against synaptic depression. Besides, when we used non metabolizable agonist CADO both quantal content and synaptic depression are reduced. Finally, we investigated the functional relation in transmitter release between adenosine receptor and muscarinic acetylcholine autoreceptors (mAChRs), protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and voltage-dependent calcium channels (VDCCs). Thus, P1R might have no real effect on neuromuscular transmission in resting conditions. However, these receptors can conserve resources by limiting spontaneous quantal leak of acetylcholine and they may protect synaptic function by reducing the magnitude of depression during repetitive activity. Furthermore, we showed that the adenosine receptor and the muscarinic mechanism absolutely depend upon each other for the modulation of neurotransmitter release and both mechanisms cooperate in the control of depression. On the other hand, the imbalance of adenosine receptors uncouples PKC from evoked transmitter release. In addition, we observed a functional interaction between adenosine receptors with PKA and VDCCs in the modulation transmitter release.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Capítol I.
Introducció

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. LA UNIÓ NEUROMUSCULAR

La unió neuromuscular (NMJ de l'anglès *neuromuscular junction*) o sinapsi neuromuscular és la zona de contacte entre la fibra muscular i el nervi terminal. La branca terminal perd la mielina, es ramifica, s'introdueix i es forma una dilatació en la superfície de la fibra muscular. Quan la motoneurona rep un impuls nerviós, el terminal allibera l'acetilcolina, com a neurotransmissor, que es difon a través de la fenedura sinàptica i es produeix la contracció de la fibra muscular. La NMJ es caracteritza per tenir una mida gran, que permet estudiar els seus components per separat o com un tot, i per la seva accessibilitat.

La NMJ és una sinapsi química colinèrgica nicotínica i és un model molt utilitzat en investigació en rates, ratolins, amfibis (granota, *Xenopus Laevis*) inclús, en insectes (mosca, *Drosophila Melanogaster*) (Keshishian i cols., 1996; Schwarz, 2006; Je i cols., 2012; Plomp i cols., 2015). La NMJ adulta dels vertebrats va servir com a model del primer estudi fet amb rigor científic per a la demostració de la transmissió sinàptica química (Dale i cols., 1936). També va ser model per a la determinació de l'alliberació vesicular quàntica (Katz, 1966). Més endavant, el primer receptor de neurotransmissor que va ser purificat i clonat va ser el receptor d'acetilcolina nicotínic (nAChR de l'anglès *nicotinic acetylcholine receptor*), sent l'acetilcolina el neurotransmissor en la NMJ (Duclert i Chanteaux, 1995). La NMJ també s'ha estudiat en recerca clínica ja que és clau en les malalties del sistema nerviós, com per exemple la *miastènia gravis*, la síndrome miastènica de *Lambert-Eaton* o la distròfia muscular de *Duchenne* (Titulaer i cols., 2011; van den Bergen i cols., 2014; Vrinten i cols., 2014; Mehndiratta i cols., 2014; Ha i Richman, 2015; Plomp i cols., 2015).

La NMJ està formada per tres components: el component presinàptic, el component postsinàptic i el component glial (figura I.1). El primer d'ells està compost per la terminació nerviosa de la motoneurona 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 component és el component glial o la cèl·lula de Schwann que depenent de l'alçada de l'axó on es troba es pot diferenciar en dos tipus de cèl·lules: la cèl·lula de Schwann preterminal/mielogènica i la cèl·lula de Schwann terminal/teloglial. La primera és la que forma la baina de mielina recobrint als axons. I la segona, la cèl·lula de Schwann terminal està estretament associada als components presinàptics i postsinàptics recobrint els terminals nerviosos i tancant l'espai sinàptic amb les seves projeccions. Les funcions d'aquest segon tipus de cèl·lula són donar aïllament a la NMJ del medi extern i proporcionant-li un medi adequat de substàncies tròfiques. Per tant, la cèl·lula de Schwann terminal no té una única

funció estructural, si no que també li dóna cobertura, protecció i sosteniment a la unió entre el terminal de la motoneurona i la fibra muscular.

Les regions sinàptiques de les tres cèl·lules estan molt especialitzades. Contenen molècules i orgànuls específics en concentracions altes, que són menys presents o inexistents en l'espai extrasinàptic.

A part d'aquestes tres cèl·lules que conformen la NMJ, també cal mencionar la fenedura sinàptica i la làmina basal. La fenedura o l'escletxa sinàptica és l'espai que hi ha entre el component presinàptic i postsinàptic. És d'uns 50 nm aproximadament, i és el lloc on el terminal nerviós allibera l'acetilcolina que després serà captada pels nAChRs en la membrana postsinàptica. La difusió de l'acetilcolina a través de la fenedura sinàptica és molt ràpida (50 μ s) degut a la curta distància que ha de travessar (**Salpeter, 1987**).

La làmina basal està formada per un conjunt de glicoproteïnes filoses que envolta cada fibra muscular. Hi ha dos tipus de làmina depenent de la ubicació. El primer tipus és la làmina basal sinàptica, que és pròpia de l'àrea sinàptica de la cèl·lula muscular i presenta proteïnes com el col·lagen tipus IV, la laminina i la integrina entre altres. Aquest tipus de làmina s'estén per dins dels plects sinàptics primaris i secundaris, que com es comentarà més endavant, són les invaginacions de la membrana sinàptica de la cèl·lula muscular oposades al terminal nerviós. El segon tipus és la làmina basal extrasinàptica que és la que envolta la resta de la fibra muscular (**Salpeter, 1987; Patton, 2003; Maselli i cols., 2012**).

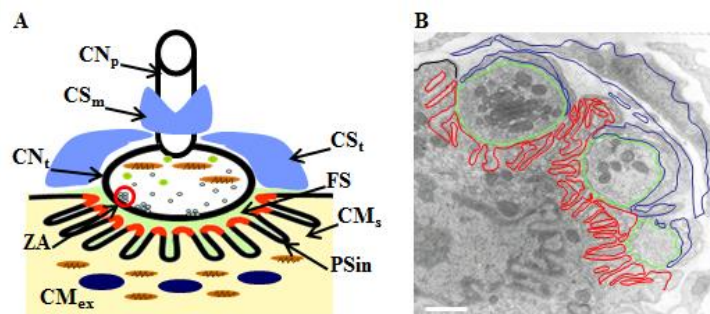


Figura 1.1. Estructura de la sinapsi neuromuscular. (A) Esquema de la sinapsi neuromuscular. En blanc la cèl·lula nerviosa preterminal (CN_p) i terminal (CN_t) on es troben les zones actives (ZA). Prop de les ZA es troben les vesícules sinàptiques. En color blau, la cèl·lula de Schwann preterminal/mielogènica (CS_m) i la teloglial/terminal (CS_t). En color groguenc es mostra la cèl·lula muscular sinàptica (CM_s) amb els seus plects postsinàptics (PSin), els seus nuclis (blau) i els mitocondris (marró). En la zona més exterior de la cèl·lula muscular s'observa l'àrea muscular extrasinàptica (CM_{ex}). L'espai sinàptic entre la cèl·lula nerviosa i la cèl·lula muscular, en color verd, es troba la fenedura sinàptica (FS). (B) Imatge de microscòpia electrònica de transmissió d'una NMJ. En color verd es marca els botons terminals, en vermell es pot observar els plects secundaris per sota dels botons i en blau la cèl·lula de Schwann terminal. Barra de l'escala: 250 nm. La imatge i l'esquema adaptat s'han extret de la publicació de **Lanuzo i cols. (2007, 2014)**.

1.2 Components de la sinapsi neuromuscular

1.2.1 Component presinàptic

La motoneurona és una cèl·lula excitable i té la propietat de respondre a un estímul mitjançant la modificació del potencial de membrana. El soma de la motoneurona està ubicat en la medulla espinal i innerva a la fibra muscular. La motoneurona està formada pel soma, l'axó que a mesura que es va apropant al múscul es va ramificant donant lloc als axons preterminals (veure CN_p, **figura I.1**), que acaben formant els botons terminals els quals faran contacte amb la fibra muscular. La funció del terminal nerviós, una vegada ha arribat l'impuls nerviós, és l'alliberació de neurotransmissor que donarà lloc a la contracció. Una motoneurona pot innervar a un sol múscul, però un mateix axó terminal pot innervar a milers de fibres intramusculars.

L'axó té origen en una protrusió del soma cel·lular i s'estén fins al terminal nerviós que és la part més distal que fa contacte amb la fibra muscular. La funció de l'axó és la propagació de l'impuls nerviós i transportar missatgers químics, determinats orgànuls i molècules fins al seu extrem distal. En el seu citoplasma es troba el citoesquelet format per neurofilaments i microtúbuls.

Els axons del teixit nerviós estan envoltats per plics múltiples de la membrana plasmàtica d'una sola cèl·lula, la cèl·lula de Schwann. El conjunt d'aquest embolcall concèntric forma un complex lipoproteic blanquinós, anomenat baina de mielina i les fibres nervioses que estan recobertes per aquestes beines són les fibres mielíniques. Aquesta baina de mielina és interrompuda a intervals regulars formant els nòduls de Ranvier. Aquest nòdul són segments axònics sense mielina, amb una elevada concentració de canals de sodi controlats per voltatge responsables de la conducció saltatòria del potencial d'acció. L'interval entre nòduls s'anomena internòdul i està recobert per una cèl·lula de Schwann.

El terminal nerviós (veure CN_p, **figura I.1**) és la part de l'axó que entra en contacte amb la fibra muscular que va a innervar. Constitueix la part més especialitzada i més distal de la motoneurona. Està especialitzada en l'alliberació de neurotransmissor. Té un gran nombre de vesícules sinàptiques de 50 nm de diàmetre que contenen neurotransmissors, com l'acetilcolina. Cada vesícula conté a més a més de l'acetilcolina, l'ATP (de l'anglès *adenosine triphosphate*) i proteoglicans que s'alliberen conjuntament amb el neurotransmissor (**Salpeter, 1987**). El terminal nerviós conté molts mitocondris, donat que necessita molta energia per poder sintetitzar i alliberar el neurotransmissor. El terminal nerviós es troba polaritzat, ja que la majoria de vesícules es troben agrupades en unes àrees denses situades a la regió de la

Capítol I. Introducció

membrana més distal, anomenades zones actives (veure **ZA**, **figura I.1**), mentre que els mitocondris es troben més a prop de la cèl·lula de Schwann. Les zones actives són llocs de fusió de les vesícules sinàptiques amb la membrana del terminal nerviós, per alliberar el seu contingut a la fenedura sinàptica. A les porcions del terminal nerviós que no estan en contacte amb la fibra muscular hi ha menys vesícules, però més mitocondris i no s'hi troben les zones actives. En aquesta zona hi ha molts microtúbuls i neurofilaments en canvi, hi ha pocs en la zona de contacte amb la fibra muscular (**Yee i cols., 1988**).

En l'axoplasma de la motoneurona hi ha diferents orgànuls, com el reticle endoplasmàtic llis i els endosomes, els quals estan implicats en el reciclatge de les vesícules i en la creació de noves, que després s'ompliran d'acetilcolina i s'utilitzaran de nou. A més, en l'axoplasma també es troben diferents molècules com l'acetilcolina de les vesícules sinàptiques, el transportador vesicular d'acetilcolina i l'enzim colina-acetiltransferasa (ChAT de l'anglès *choline acetyltransferase*). La funció d'aquest enzim és sintetitzar l'acetilcolina a partir de la colina recuperada de la fenedura (alliberada per l'acetilcolinesterasa) i de l'acetil-CoA (procedent dels mitocondris) (**Südhof, 1995; Calakos i Scheller, 1996; Van der Zee i Keijsers, 2011**). També es troben altres molècules com les proteïnes que formen el complex molecular anomenat SNARE, que desenvolupen un paper important en la fusió de les membranes (**Broadie, 1995; Sanes i Lichtman, 1999; Jena, 2009; Südhof, 2012**). Les vesícules es distribueixen en diferents grups, depenent de la proximitat a les zones actives i la disponibilitat per a ser alliberades. El primer d'ells és el dipòsit ancorat, que són les vesícules que estan preparades per fusionar-se i alliberar l'acetilcolina. El segon grup són els dipòsits proximals que són les vesícules que poden ser alliberades en el cas que es requerís. Per últim, el tercer grup, i el més llunyà de les zones actives, és el dipòsit de reserva (**Lima i cols., 2010; Lazarevic i cols., 2013**).

S'han identificat moltes molècules a l'axolema del terminal nerviós associades a les zones actives, com els canals de potassi i de calci dependents de voltatge on degut a la seva localització específica, magnifiquen l'eficàcia de la secreció depenent del Ca^{+2} (**Robitaille i cols., 1993; Sugiura i cols., 1995; Day i cols., 1997; Südhof, 2012**). Els autoreceptors muscarínics d'acetilcolina (mAChRs de l'anglès *muscarinic acetylcholine receptor*), també es situen en el terminal presinàptic i exerceixen funcions de control de la neurotransmissió i de l'eficàcia sinàptiques (**Ganguly i Das, 1979; Abbs i Joseph, 1981; Wessler i cols., 1987; Arenson, 1989; Garcia i cols., 2005; Santafé i cols., 2003, 2004, 2007**).

1.2.2 Component postsinàptic

L'element postsinàptic està format per la membrana de la fibra muscular i la làmina basal d'aquesta, que es comentarà més endavant (veure apartat 1.2.4). El teixit muscular està format per cèl·lules allargades cilíndriques i plurinucleades que contenen abundants filaments, les miofibril·les. Aquestes miofibril·les contenen proteïnes com l'actina i la miosina, les quals són responsables de la contracció i la relaxació de les fibres musculars. La membrana cel·lular o sarcolemma està envoltada per la làmina basal i les cèl·lules satèl·lit (cèl·lules que tenen un paper important en la regeneració muscular). El sarcolemma de la fibra muscular tindrà unes característiques especials depenent si la membrana és extrasinàptica (veure **CM_{ex}**, **figura I.1**) o sinàptica (veure **CM_s**, **figura I.1**). La primera és la que es troba al llarg de la fibra muscular, exceptuant la fracció que forma part de la NMJ. La segona, la membrana sinàptica o també denominada membrana postsinàptica, forma part de la NMJ i és la zona de la fibra muscular on les branques nervioses terminals entren en contacte amb la fibra formant la placa motora. El terminal nerviós forma unes dilatacions poc profundes en la superfície de la membrana postsinàptica anomenades plecs sinàptics primaris. En la mateixa regió de la membrana hi ha unes invaginacions amb la finalitat d'incrementar la superfície de contacte, formant els plecs sinàptics secundaris (veure **PSin**, **figura I.1**). Aquests són paral·lels i entren perpendiculars al plec primari penetrant dins del miòcit a una profunditat d'1 µm en els mamífers (**Salpeter, 1987**). Aquesta membrana està altament especialitzada, per respondre ràpidament i de forma efectiva a l'efecte del neurotransmissor alliberat pel terminal nerviós. En les crestes dels plecs secundaris de la membrana postsinàptica s'hi troba una gran concentració nAChRs, més de 10.000/µm² (**Salpeter i Loring, 1985**). Els nAChRs són receptors de tipus nicotínic, que pertanyen a la superfamília de canals iònics activats per lligand. Es componen per heterooligòmers de cinc subunitats amb quatre dominis transmembrana cada un (M1-M4) (**Le Novère i Changeaux, 1995; Albuquerque i cols., 2009; Ihara i cols., 2014**), un domini extracel·lular N-terminal i un domini intracel·lular C-terminal (**Kalamida i cols., 2007**). L'estructura bàsica del nAChR és de pentàmer compost per quatre cadenes polipeptídiques diferents (2α, 1β, 1δ i 1ε). Dues molècules d'acetilcolina s'uneixen 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 l'acetilcolina s'uneix al receptor, aquest pateix un canvi de conformació, s'obre el canal iònic permetent el pas dels ions (es produeix una entrada de Na⁺ a l'interior de la fibra muscular i una sortida de K⁺) durant

Capítol I. Introducció

un temps aproximadament de 1-2 ms. Aquest trànsit iònic desencadena una despolarització de la membrana postsinàptica que acabarà amb la contracció de la fibra muscular.

Com s'ha comentat, l'estructura postsinàptica té un alta densitat d'agrupació dels nAChRs. El funcionament correcte de la NMJ depèn de la formació, maduració i manteniment d'aquest agregats de receptors (**Sanes i Lichtman, 2001**). L'agrupació és important en el procés de desenvolupament de la NMJ i en la neurotransmissió (**Ghazanfari i cols., 2011**). La seva disrupció afecta adversament no només a l'organització madura del component postsinàptic, si no també a l'especialització presinàptica (**Sanes i Lichtman, 2001**). Actualment, es coneix que el procés d'agrupació dels nAChRs a la membrana postsinàptica depèn de la via de senyalització que inclou: les molècules de l'agrina, el receptor tirosina quinasa específica del múscul (MuSK de l'anglès *muscle-specific kinase*) i la rapsina (**Wang i cols., 2006**). Durant el procés d'innervació, la motoneurona allibera un proteoglicà heparan sulfat anomenat agrina, que s'uneix preferiblement a LRP4 (de l'anglès *low density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein-4*) (**Kim i cols., 2008; Zhang i cols., 2008, 2011**), estimulant l'associació de LRP4 amb MuSK i la seva activació (**Kim i cols., 2008; Zhang i cols., 2011**). L'activació de MuSK dóna lloc a l'acoblament de diferents molècules postsinàptiques del citoesquelet que agrupen a la membrana els nAChRs a través de la molècula de rapsina, que és una proteïna associada a la membrana (**Witzemann, 2006**). La rapsina s'associa amb els nAChRs a la membrana postsinàptica, i s'ha demostrat que la presència d'aquesta proteïna és suficient per agrupar, ancorar i estabilitzar els nAChRs a la membrana (**Gautam i cols., 1995; Banks i cols., 2003**) a més, de facilitar la fosforilació dels nAChRs en residus de tirosina (**Lee i cols., 2008**).

A la regió subsinàptica de la fibra muscular hi ha orgànuls i estructures, com els nuclis postsinàptics que participen en la transcripció gènica dels nAChRs i altres proteïnes. Aquest nuclis expressen un patró de proteïnes diferents al que expressen els nuclis extrasinàptics. A més a més, s'hi troben els mitocondris que aportaran l'energia necessària, l'aparell de Golgi i els ribosomes. En el fons dels plec, on es troben els canals de sodi postsinàptics (**Flucher i Daniels, 1989; Sanes i Lichtman, 1999**), s'hi localitza el citoesquelet, els microtúbuls i els microfilaments, responsables de mantenir l'estructura dels plec primaris i secundaris i d'ancorar els nAChRs a la superfície de les crestes. Aquest ancoratge es dóna per l'associació del segment citoplasmàtic del receptor a un complex proteic anomenat *dystrophin/utrophin glycoprotein complex* (D/UGC). Aquest complex consta de cinc tipus de proteïnes: les subunitats α i β de distroglicà, distrobrevina, sarcoglicà, sarcospan i sintrofina. El complex D/UGC 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; Rafael i cols., 2000**).

1.2.3 Component glial

La cèl·lula de Schwann són les cèl·lules glials del sistema nerviós perifèric. Es caracteritzen per ser cèl·lules amb un citoplasma escàs, tenir pocs mitocondris i un aparell de Golgi petit. Vàries cèl·lules de Schwann acompanyen als axons i als terminals nerviosos de les motoneurons. Depenent del lloc on es troben i si formen o no mielina, es poden distingir dos tipus. El primer tipus s'anomena cèl·lula de Schwann preterminal o mielogènica (**CS_m, figura I.1**), es localitza al voltant de l'axó i formen les beines aïllants de mielina. Aquesta beina de mielina es compon de capes lipídiques concèntriques de la membrana plasmàtica de la cèl·lula de Schwann, que envolten de manera d'espiral a l'axó de la neurona. Aquesta beina no és continua en tot el recorregut axonal, donat que al llarg dels axons es produeixen bandes circulars sense mielina, les quals semblen coincidir amb el límit de les cèl·lules de Schwann. Aquestes bandes sense mielina s'anomenen nòduls de Ranvier, i fan 1 µm de longitud. Serveixen per a que la conducció sigui 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 un altre, degut a que en aquest espai hi ha una gran concentració de canals de sodi i potassi. El segon tipus és la cèl·lula de Schwann terminal o telogial (**CS_t, figura I.1**), situada a la part més distal del soma de la motoneurona, i es troba recobrint les terminacions nervioses que fan contacte amb la fibra muscular postsinàptica. Aquest segon tipus no forma mielina i és l'encarregada de aïllar la NMJ del medi extern i de proporcionar-li un medi adequat a més de substàncies tròfiques.

La cèl·lula de Schwann no només se li atribueix una funció estructural i facilitadora de la conducció, si no que participa en el creixement dels axons, el manteniment i la regeneració, en les lesions axonals com la neuropràxia o l'axonotmesi (**Balice-Gordon, 1996; Chen i cols., 2005; Li i Yu, 2014**). A més, s'ha descrit que les cèl·lules de Schwann terminals poden tenir un paper important en la comunicació entre el component presinàptic i postsinàptic de la sinapsi (**Castonguay i cols., 2001; Auld i Robitaille, 2003; Rouse i cols., 2010**) donat que presenten: mAChRs que uneixen l'acetilcolina alliberada pel terminal axònic (**Robitaille i cols., 1997; Loreti i cols., 2006; Ugenti i cols., 2014**), receptors purinèrgics (**Robitaille, 1995; Rouse i Robitaille, 2006; Ho i cols., 2014**) i canals de calci dependents de voltatge tipus L (**Robitaille i cols., 1996; Baker, 2002; Chen i cols., 2011**). L'activació dels mAChRs induïx l'aparició de

Capítol I. Introducció

segons missatgers que actuen sobre magatzems del Ca^{+2} intracel·lular, fent augmentar el Ca^{+2} a l'interior de les cèl·lules de Schwann terminals (**Jahromi i cols., 1992; Chiu i Kriegler, 1994**). Aquest Ca^{+2} alliberat regula l'expressió de determinats gens importants en la formació de les prolongacions que fan aquestes cèl·lules (**Georgiou i cols., 1994**). Les cèl·lules de Schwann terminals poden modificar l'arquitectura de les NMJs (**Trachtenberg i Thompson, 1997**). L'estreta associació d'aquestes cèl·lules amb altres components de la NMJ facilita la capacitat d'aquestes cèl·lules per a detectar canvis en l'ambient de la NMJ (**Auld i Robitaille, 2003**).

1.2.4 Làmina basal

La làmina basal envolta cada fibra muscular, passa a través de la fenedura sinàptica i s'estén per l'interior dels plects secundaris. Els components majoritaris de la làmina basal sinàptica són molt similars a qualsevol làmina basal extrasinàptica, està composta per diferents proteïnes: el col·lagen IV, la laminina, la fibronectina, l'entactina i proteoglicans com l'heparan sulfat (**Patton i cols., 2003; Qin i cols., 2014**). Les dues làmines basals difereixen en la composició de les isoformes d'aquest components. La diferència més rellevant de la lamina basal sinàptica respecte a la làmina basal extrasinàptica és la especificitat d'alguns elements com les acetilcolinesterases (**Hall i Sanes, 1993**), una sèrie de glicoconjugats (**Scott i cols., 1988**), el factor de creixement dels fibroblastes 2 (FGF2, **Dai i Peng, 1995**), dues molècules de senyalització, l'agrina (**McMahan, 1990; Mis i cols., 2013**) i la neuregulina (**Jo i cols., 1995; Sanes i Lichtman, 1999**). Aquestes molècules específiques de la làmina basal sinàptica participen tant durant el desenvolupament com en el manteniment de l'estructura sinàptica, així com també en la correcta transmissió.

2. NEUROTRANSMISSIÓ EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

La finalitat de la NMJ és la contracció muscular la qual es descriu com un fenomen del "tot o res". La motoneurona genera un potencial d'acció que recorre tot l'axó mitjançant la conducció saltatòria fins arribar als botons terminals (**Huxley i Stämpfli, 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 on s'allibera l'acetilcolina. Aquest dos tipus de mecanismes de senyalització (potencial d'acció i senyals sinàptiques) són la base de totes les capacitats de processament d'informació del sistema nerviós.

En un axó en repòs, hi ha una concentració intracel·lular predominant de K^+ i una extracel·lular de Na^+ i de Cl^- que donen un potencial elèctric de repòs d'aproximadament -80 mV en els miòcits adults normals de mamífer. L'ió K^+ té tendència a sortir deixant l'interior cel·lular negatiu, prop del potencial d'equilibri d'aquest ió. L'ió Na^+ va entrant a la cèl·lula, mentre que surt el K^+ per compensar les càrregues. La presència de la bomba de Na^+/K^+ en la membrana cel·lular fa sortir el Na^+ i entrar el K^+ , així en l'interior de l'axó hi ha un predomini de càrregues negatives i en la seva superfície externa de positives, les quals es troben separades per una membrana permeable als ions de K^+ i Na^+ .

El potencial d'acció és un moviment iònic entre el compartiment intracel·lular i l'extracel·lular. S'origina en el soma de la motoneurona situat en la medul·la espinal i viatge al llarg de l'axó fins arribar al terminal nerviós. L'impuls nerviós inverteix el potencial d'acció, ja que produeix canvis en la permeabilitat de la membrana. Primer a favor de l'ió Na^+ , que entra fins crear un predomini de càrregues positives intracel·lulars fenomen anomenat despolarització. Després a favor del K^+ , que surt fins deixar de nou l'interior negatiu (fenomen anomenat repolarització). En aquest moment, la superfície de l'axó torna a estar en repòs però els ions no estan en el seu lloc. En aquesta situació, si arribés un potencial d'acció no podria conduir-ho fins que les bombes de Na^+/K^+ retornin els ions a la seva situació original, aquest període s'anomena període refractari. L'impuls despolaritzant recorre successivament, una àrea rere l'altre de la membrana de l'axó fins arribar a la terminació axonal. Aquestes bombes de Na^+/K^+ consumeixen molta energia per poder retornar tots els ions al seu lloc. En un nervi de conducció ràpida (100 m/s) no es podria mantenir gaires impulsos seguits ja que s'esgotaria ràpidament. Per evitar-lo, estan les beines de mielina, (beines de gran resistència elèctrica i aïllant, les quals acceleren molt la conducció del potencial d'acció) podent conduir a una velocitat de 150 m/s. Els nòduls de Ranvier fan que l'intercanvi iònic sigui reduït en aquestes zones, de manera que la conducció de l'impuls sigui saltatori de nòdul a nòdul (**Huxley i Stämpfli, 1949**), fent-la més ràpida ja que es limita molt la zona d'on s'hauran de treure els ions de Na^+ a l'exterior.

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 del citoplasma. Aquest Ca^{+2} estimula la fusió de les vesícules sinàptiques a les zones actives del terminal, a través d'un procés anomenat excitotòxic, que acaba amb l'alliberament d'acetilcolina a la fenedura sinàptica (**Stanley, 1993; Xue i cols., 2011; Südhof, 2014**). Aquest procés és dependent del Ca^{+2} (**Miledi, 1973; Katz i Miledi, 1965**) i de la

Capítol I. Introducció

participació d'altres proteïnes com són el complex SNARE. Aquest complex consta de dos grups de proteïnes: un primer grup format per la sinaptobrevina, que es localitza a la membrana sinàptica. L'altre grup de proteïnes es troben associades a la membrana del terminal nerviós, la SNAP-25 i la syntaxina (**Bajjalieh i Scheller, 1995; Südhof, 1995, 2004**). Una quarta proteïna important que participa en la fusió de les vesícules és la sinaptotagmina, que és una proteïna integral de la vesícula i sensor al Ca^{+2} (**Brose i cols., 1992; Takamori i cols., 2006**). Quan el Ca^{+2} entra en el citoplasma a través dels VDCCs, s'uneix a la sinaptotagmina i el complex SNARE canvia de conformació, resultant en la fusió de les dues membranes a nivell de les zones actives, alliberant l'acetilcolina a la fenedura sinàptica. Una vegada les vesícules han descarregat el contingut a la fenedura sinàptica, la membrana de les vesícules es fusionen amb l'axolema, i aquest excés de membrana es recicla formant noves vesícules sinàptiques. Aquest reciclatge té lloc en la perifèria de la sinapsi, on la membrana es reformada per la coberta de les vesícules mitjançant la seva endocitosi (**Heuser i Reese, 1973; Schweizer i Ryan, 2006; Jung i Haucke, 2007; Royle i Lagnado, 2010**).

Després de l'exocitosi, l'acetilcolina es difon per tota la fenedura sinàptica i s'uneix als receptors de nAChRs. La unió de dues molècules d'acetilcolina a les dos subunitats α activa el receptor i obre el canal intramolecular. Així, es permet el pas simultani d'ions de Na^{+} al seu interior i la sortida d'ions de K^{+} alterant el potencial de membrana postsinàptic i obtenint com a resposta un potencial de placa evocat (EPP de l'anglès *end plate-potential*). L'EPP és una despolarització local de la membrana de les fibres musculars amb una amplada mitja de 15-40 mV (**Fatt i Katz, 1951**). Aquesta despolarització local de la membrana postsinàptica activa als canals de sodi dependents de voltatge, que es troben en el fons dels plecs secundaris (**Flucher i Daniels, 1989**). A continuació, es desencadena un potencial d'acció que es propaga en totes direccions de la fibra muscular, inclús pels túbuls T musculars on s'inicia una seqüència d'esdeveniments intracel·lulars que finalitza amb la contracció muscular. Després de l'activació dels nAChRs, l'acetilcolina es separa d'aquest i es difon cap a la membrana basal on es hidrolitzada per l'acetilcolinesterasa (AChE de l'anglès *acetylcholinesterase*). Aquest enzim hidrolitza l'acetilcolina en acetil i colina, la colina serà reciclada per a ser reutilitzada de nou. Cap d'aquestes molècules podran activar als nAChRs, i per tant, amb aquesta hidròlisi es finalitza el procés de la transmissió sinàptica en la NMJ (veure el procés de la neurotransmissió sinàptica en la **figura I.2**).

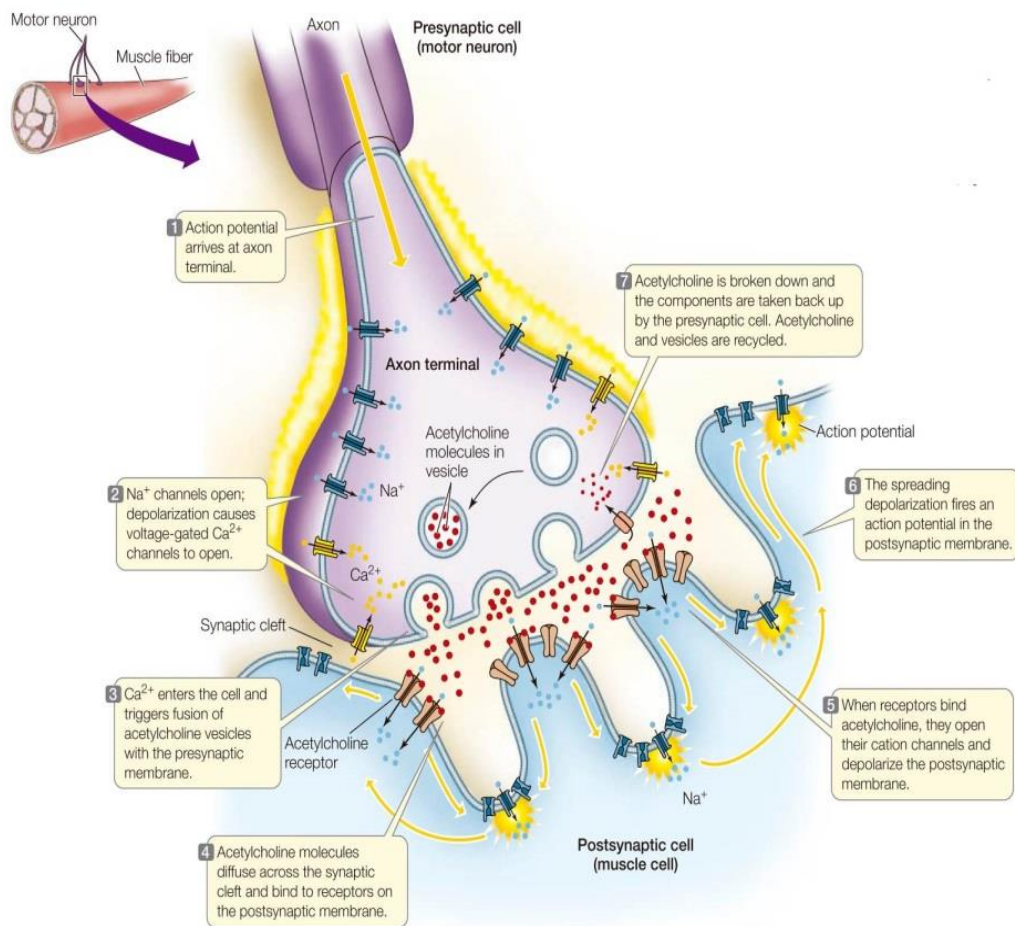


Figura 1.2. Neurotransmissió sinàptica. Els axons motors es ramifiquen en la superfície muscular. Cada branca forma els botons terminals presinàptics envoltats per la cèl·lula de Schwann terminal. Els botons es disposen sobre la regió de la placa motora terminal, separada del sarcolemma per la fenedura sinàptica. Cada botó terminal s'associa a una fenedura sinàptica primària, una depressió de la fibra muscular està formada per replers profunds del sarcolemma. Els nAChRs es troben en la cresta dels plecs d'unió i els canals de sodi controlats pel voltatge es troben en la part baixa del plec. La làmina basal conté AChEs. L'impuls elèctric o potencial d'acció recorre l'axó de la motoneurona, a l'arribar al botó terminal es produirà una ona de despolarització la qual estimularà als ions de Ca^{+2} que es troben en la fenedura sinàptica per a que s'adhereixin a la membrana presinàptica i inclús entrin a l'interior del botó sinàptic a través dels VDCCs i provoqui un apropament de les vesícules sinàptiques a la membrana presinàptica. Aquestes es fusionen a la membrana i per exocitosis alliberen l'acetilcolina a l'espai sinàptic. El neurotransmissor una vegada en l'espai extrasinàptic s'uneix als receptors i es provoca un estímul que fa que s'obrin els canals dels ions de Na^+ i comença la despolarització de la membrana postsinàptica. L'acetilcolina no pot estar en acció constant, per lo que s'allibera l'enzim AChE que provoca el deslligament entre el neurotransmissor i el receptor, i en conseqüència el neurotransmissor es degradat en les porcions d'acetil i colina. Per últim la colina serà reabsorbida pel botó sinàptic per a la formació de noves vesícules sinàptiques. Extret del llibre: *Life: The Science of Biology, 2007, Sinauer Association Inc. WH Freeman i cols. Eight Edition.*

A part dels episodis evocats, en els terminals nerviosos hi ha un alliberament espontani d'acetilcolina d'on no es necessita estímul del nervi, s'anomena potencial de placa miniatura (mEPP de l'anglès *miniature end plate-potential*). **Fatt i Katz al 1952** van descriure aquestes petites despolaritzacions postsinàptiques d'aproximadament 0.5-1 mV d'amplada i de freqüència 1 Hz (1 episodi per segon) en músculs de granota. Tant la freqüència com l'amplada varien segons l'espècie, el tipus muscular així com, per l'edat. En estudis electrofisiològics on s'estudiaven les amplades dels EPPs i dels mEPPs es va observar que cada EPP està format per la suma independent de múltiples mEPPs (**Fatt i Katz, 1952**).

Un altre concepte important que s'ha de tenir en compte és els número de quantes alliberades per impuls nerviós, l'anomenat contingut quàntic (m de l'anglès *quantal content*). Com ja s'ha comentat, el mEPP és el resultat d'una única vesícula d'acetilcolina o quanta, i l'EPP d'unes 20-300 vesícules variable segons l'espècie estudiada. En diferents models neuromusculars d'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**).

3. MOLÈCULES IMPLICADES EN LA TRANSMISSIÓ NEUROMUSCULAR

Existeixen diferents molècules de senyalització dels components presinàptics, postsinàptics i de les cèl·lules glials envoltants, que coordinen la maquinària molecular de la sinapsi en resposta a un canvi en la demanda de l'activitat. En les sinapsis colinèrgiques de varies espècies hi ha diferents mecanismes, que regulen la modulació de l'alliberació de neurotransmissor dependent del Ca^{+2} associats als receptors d'adenosina (**Song i cols., 2000**) i als mAChRs (**Caulfield, 1993; Allen, 1999; Slutsky i cols., 1999; Minic i cols., 2002; Santafé i cols., 2003, 2004; Garcia i cols., 2005**). Aquests receptors metabotròpics, estan acoblats a diferents vies de senyalització intracel·lular, que convergeixen en un repertori limitat de quinases efectores que fosforilen a proteïnes diana i materialitzen canvis estructurals i funcionals. Les quinases de la família serina/treonina quinases, en particular, la proteïna quinasa A (PKA de l'anglès *protein kinase A* o proteïna quinasa dependent de cAMP) i la proteïna quinasa C (PKC de l'anglès *protein kinase C*) es troben implicades en la regulació dels canals iònics activats per lligand (**Swope i cols., 1999; Nelson i cols., 2003**) i en l'exocitosi de transmissor (**Tanaka i Nishizuka, 1994; Byrne i Kandel, 1996**). Així mateix, la neurotransmissió depèn fortament de l'entrada del Ca^{+2} del medi extern a través de la via

presinàptica dels VDCCs (Katz i Miledi, 1970), especialment del canal tipus P/Q (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995). Per tant, molècules com els mAChRs, els receptors purinèrgics, les serina/treonina quinases (PKA i PKC) i els VDCCs estan implicades en la modulació de la transmissió. Per un altre banda, els receptors dels factors tròfics com els receptors presinàptics de les neurotrofines (Bibel i Barde, 2000; Roux i Barker, 2002; Pitts i cols., 2006) i els receptors presinàptics de les citoquines tròfiques (Stoop i Poo, 1995; Nai i cols., 2010) responen als seus mediadors, també poden cooperar en el control local de la neurotransmissió. No obstant, aquesta tesi es centrarà en la relació funcional dels receptors purinèrgics (en concret, els receptors d'adenosina) en les vies de senyalització muscaríniques, de les proteïnes quinases (PKA i PKC) i els VDCCs en la neurotransmissió de la NMJ adulta.

3.1 Receptors muscarínics (mAChRs)

Els mAChRs presinàptics estan implicats en la modulació de l'alliberament del neurotransmissor i en l'eficàcia sinàptica en les sinapsis colinèrgiques (Caulfield, 1993). Fins ara, s'han descrit cinc subtipus de mAChRs (M1-M5) dels quals s'han clonat i expressat els seus gens. Els mAChRs pertanyen a la denominada superfamília de receptors acoblats a les proteïnes G (Duclert i Changeux, 1995; Richmond i Jorgensen, 1999), tots ells són receptors de membrana amb una estructura en comú, amb set dominis transmembrana i els extrems N-terminal i C-terminal dins i fora de la neurona, respectivament. El tercer *loop* intracel·lular és més llarg i constitueix el nexa d'unió amb les proteïnes G, acoblament necessari per l'activació dels mecanismes efectors (Ashkenazi i cols., 1989) (veure un exemple de l'estructura del receptor metabotròpic a la figura I.4). Els mAChRs es divideixen en dos grups: el primer grup inclou els receptors M1, M3 i M5, que preferiblement estan acoblats a les proteïnes G no susceptibles a la toxina *pertussis* de la família $G_{q/11}$, però que estimulen a la fosfolipasa C (PLC de l'anglès *phospholipase C*) i en conseqüència a la PKC. El segon grup són els receptors M2 i M4, la seva activació està acoblada a les proteïnes G sensibles a la toxina *pertussis* de la família G_i/G_o per inhibir l'activitat de l'adenilat ciclase i a la PKA (Wess, 1996; Caulfield i Birdsall, 1998; Nathanson, 2008). Aquesta especificitat als diferents tipus de proteïnes G no és absoluta, els receptors M2 i M4 poden acoblar-se feblement a la PLC (Ashkenazi i cols., 1987; Katz i cols., 1992).

Capítol I. Introducció

Segons la literatura, s'ha descrit que els mAChRs estan relacionats amb la inhibició i l'augment de l'alliberació d'acetilcolina en diversos circuits colinèrgics del sistema nerviós central i perifèric. L'augment de l'alliberació de neurotransmissor està relacionat amb el receptor M1 en els terminals nerviosos perifèrics vagals (**Ren i Harty, 1994**). Per altra banda, en quant a la inhibició s'ha descrit que en les neurones basals del prosencèfal hi està involucrat el receptor M2 (**Allen i Brown, 1993; Allen, 1999**), en el neostriat el receptor M3 (**Hsu i cols., 1995**) i en el còrtex cerebral, en l'hipocamp i en l'estriat el receptor M1 (**Vannucchi i Pepeu, 1995**). En la NMJ d'amfibi (**Slutsky i cols., 1999**) i de ratolí (**Minic i cols., 2002**), els receptors M1 i M2 estan implicats en l'augment i la inhibició d'alliberació d'acetilcolina, respectivament.

En estudis previs d'expressió i d'immunohistoquímica realitzats en el nostre grup, s'ha observat la presència dels mAChRs (tipus M1, M2, M3 i M4) en la NMJ neonatal i adulta concretament, s'han localitzat en la cèl·lula glial perisinàptica i en els nervis terminals (**Garcia i cols., 2005**), sent aquesta última localització condició necessària per la seva participació directa en la neurotransmissió.

En estudis funcionals del nostre laboratori s'ha vist que en la NMJ adulta de rata, els receptors presinàptics M1 i M2 modulen l'alliberació evocada de transmissor mitjançant un *feedback* positiu i negatiu, respectivament (**Slutsky i cols., 1999; Minic i cols., 2002; Santafé i cols., 2003, 2006**). El receptor M2 inhibeix l'alliberació ja que el bloqueig selectiu amb la metoctramina (MET de l'anglès *methoctramine*) augmenta l'alliberació. Pel contrari el receptor M1 la augmenta donat que el bloqueig selectiu amb la pirenzepina (PIR de l'anglès *pirenzepine*) disminueix l'alliberació. Els dos mecanismes operen en paral·lel, i l'estimulació i el bloqueig inespecífic amb l'oxotremorina-M (OXO-M de l'anglès *oxotremorine-M*) i amb l'atropina (AT de l'anglès *atropine*) disminueix i augmenta l'alliberació evocada, respectivament. Per tant, quan l'acetilcolina endògena modula la funció M1-M2 predomina la funció de M2, relacionada amb la inhibició tònica de la neurotransmissió evocada (**Santafé i cols., 2003, 2006; Garcia i cols, 2005; Tomàs i cols., 2014**). Els receptors M3 i M4 no són funcionals en la NMJ adulta, ja que el bloqueig selectiu d'aquests receptors no afecta a l'alliberació, tot i que són presents en la NMJ (**Santafé i cols., 2003, 2004; Garcia i cols., 2005; Tomàs i cols., 2014**). No obstant, el receptor M4 és operatiu en certes NMJ neonatals, participant en el procés d'eliminació sinàptica (**Santafé i cols., 2004**). En estudis previs, s'ha observat que el receptor M2 reverteix la seva funció quan hi ha una baixa alliberació d'acetilcolina o bé, un baix nivell d'acetilcolina en la fenedura sinàptica. Hi ha diversos

exemples: (1) en sinapsis neonatals en desenvolupament; (2) al bloquejar la PKA; (3) quan hi ha un augment de Mg^{+2} extern; (4) en condicions de baix Ca^{+2} extern; (5) amb un augment de l'activitat de l'AChE en la fenedura sinàptica; i (6) un bloqueig del TrkB (de l'anglès *Tropomyosin receptor kinase B*) (Santafé i cols., 2006, 2007; Garcia i cols., 2010).

Així mateix, també s'ha estudiat la participació funcional dels mAChRs en diferents vies de senyalització, com són els VDCCs, les proteïnes quinases (PKA i PKC) i el receptor de les neurotrofines TrkB. En la NMJ adulta, s'ha observat una relació funcional entre els tipus M1 i M2 amb els VDCCs. Experimentalment, s'ha vist que el receptor M1 depèn dels canals P/Q, mentre que el receptor M2 està relacionat amb la quantitat d'entrada de Ca^{+2} d'altres fonts (Santafé i cols., 2003). A més, en estudis recents del nostre grup i d'altres, s'ha descrit que la modulació realitzada pels mAChRs en l'alliberació de neurotransmissor en els terminals nerviosos (Minic i cols., 2002; Santafé i cols., 2003) està intervinguda pel Ca^{+2} (Santafé i cols., 2003), per l'acció de la PKA i de la PKC (Santafé i cols., 2006). Per tenir un funcionament correcte en la neurotransmissió, els receptors M1 i M2 necessiten la integritat funcional de les serina/treonina quinases PKC i PKA, i aquestes dels canals P/Q. Quan la funció sinàptica és normal (entrada normal de Ca^{+2} i normal alliberació d'acetilcolina) en preparacions de múscul *ex-vivo*, la PKC sembla no estar acoblada a la neurotransmissió només la funció de la PKA (Santafé i cols., 2005; 2006, 2007). En el nostre laboratori, s'ha observat que els receptors M1 i M2 estan acoblats a les serina/treonina quinases en la NMJ adulta i aquest acoblament afecta a la neurotransmissió. Un desequilibri funcional dels mAChRs (amb el bloqueig selectiu del receptor M1 o del receptor M2) inverteix la funció de les quinases (PKA i PKC). En aquest cas, la PKC s'acobla a l'alliberació de la neurotransmissió evocada, mentre que la PKA es desacobla. És a dir, en aquestes condicions, la PKA no pot inhibir ni potenciar l'alliberació, degut a la falta d'efecte dels seus inhibidors i activadors, respectivament (Santafé i cols., 2006). Sembla que el receptor M1 potencia l'activitat de la PKC i així augmenta l'alliberació, mentre que el receptor M2 minva l'activitat de la PKA i així es redueix l'alliberació. No obstant, quan tots els mAChRs estan inhibits per l'AT, la PKA i la PKC es tornen actives potenciant l'alliberació. El conjunt d'aquestes dades indiquen que el mecanisme muscarínic té una funció preservativa limitant la neurotransmissió, donat que el bloqueig dels receptors M1 i M2 amb l'AT, comentat anteriorment, potencia l'alliberació. Aquest augment és coincident amb l'acoblament de la PKA i la PKC a la neurotransmissió evocada (Santafé i cols., 2009). Per un altre banda, s'ha observat que tant el receptor M1 com M2 potencien l'alliberació, quan

Capítol I. Introducció

la PKA es troba prèviament inhibida. Això indica que els receptors M1 i M2 funcionen parcialment per reduir l'activitat de la PKA (**Santafé i cols., 2007**).

Com s'ha comentat abans, els receptors presinàptics de les neurotrofines també participen en el control local de la neurotransmissió (**Pitts i cols., 2006**). El TrkB que és receptor d'alta afinitat de la neurotrofina 4 (NT-4 de l'anglès *neurotrophin-4*) i del BDNF (de l'anglès *Brain-derived neurotrophic factor*), fins el moment és l'únic receptor implicat en el control immediat de l'alliberació de l'acetilcolina en l'adult (**Zhan i cols., 2003; Pitts i cols., 2006**). Recentment en el nostre laboratori, el TrkB s'ha localitzat principalment en els nervis terminals de la NMJ adulta i s'ha estudiat la seva relació funcional amb els mAChRs. S'ha trobat una relació d'interdependència entre les vies muscaríniques i de BDNF-TrkB, on el funcionament normal del mecanisme muscarínic és un prerequisit per l'acoblament del TrkB a la neurotransmissió. I de forma recíproca, el funcionament normal del TrkB modula la via de senyalització muscarínica dels receptors M1 i M2 (**Garcia i cols., 2010**).

La via muscarínica ha sigut estudiada en diverses malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, el Parkinson i el Huntington, així com trastorns psiquiàtrics com l'Esquizofrènia. Aquestes malalties han estat relacionats amb una alteració dels nivells d'acetilcolina o la modificació de l'expressió i la funció dels mAChRs en determinades regions del sistema nerviós (**Tata i cols., 2014**). Per exemple, en la malaltia de l'Alzheimer s'ha descrit que hi ha una disminució dels nivells del receptor presinàptic M2, i els nivells del receptor postsinàptic M1 romanen relativament inalterats (**Svensson i cols., 1992; Mulugeta i cols., 2003; Volpicelli i Levey, 2004; Overk i cols., 2010**). En diversos estudis, s'ha descrit que un augment en el tonus colinèrgic en el cervell, pot ser beneficiós per una millora dels dèficits cognitius. L'ús de tractaments amb agonistes del receptor postsinàptic M1 o bé, amb antagonistes del receptor presinàptic M2 indueixen un augment en l'alliberació d'acetilcolina, el qual activa al receptor M1 així com, als receptors nicotínics, promovent una millora dels efectes cognitius (**Sheardown, 2002**).

3.2 Proteïnes quinases

Una proteïna quinasa és un enzim que modifica químicament altres proteïnes afegint-li un grup fosfat de l'ATP, fosforilant-les. Aquesta reacció li dóna càrregues negatives a la proteïna, alterant així la seva conformació. Es produeix un canvi funcional causat per un canvi en l'activitat de l'enzim, i/o en la localització cel·lular o per l'associació amb altres proteïnes (**Edelman i cols., 1987**). L'activitat metabòlica de la proteïna unida al fòsfor, és una de les vies

de regulació més importants utilitzada per les cèl·lules en la regulació de processos bioquímics i fisiològics, com a resposta a senyals extracel·lulars (**Hemmings i cols., 1989**). L'estat de fosforilació d'una proteïna depèn de l'acció de les proteïnes quinases i de les fosfatases. Aquestes últimes, desfosforilen la proteïna hidrolitzant el pont fosfoèster i deixant lliure la proteïna.

Les proteïnes quinases es divideixen en dues famílies diferents: les serina/treonina quinases (Ser/Thr quinases) i les tirosina quinases (Tyr quinases). La primera família (Ser/Thr quinases) fosforila la proteïna o substrat en un residu serina o treonina, i està formada per dues subfamílies: les proteïnes quinases dependents de segon missatger i les proteïnes quinases independents d'aquest. La segona família (Tyr quinases) fosforila la proteïna en un residu tirosina. Part d'aquest treball es centrarà en les proteïnes quinases dependents de segon missatger (PKA i PKC).

L'activitat alterada d'una proteïna quinasa pot ser causa d'una malaltia, com per exemple de càncer (**Manning i cols., 2002**). Aquests tipus de proteïnes regulen molts aspectes del control de creixement, moviment i mort de la cèl·lula. En el sistema nerviós, tal i com en altres cèl·lules, les proteïnes quinases regulen la diferenciació morfològica, la supervivència, la reparació i la plasticitat sinàptica (**Fukunaga i Miyamoto, 1998; Sardari i cols., 2003; Du i Grandis, 2015**). Concretament, en la NMJ l'activació de la PKA i la PKC tenen efectes oposats en la estabilitat postsinàptica dels nAChRs, i això contribueix a l'estabilització o a l'eliminació sinàptica durant el procés de desenvolupament (**Li i cols., 2001; Nelson i cols., 2003, 2005**). Per un altre banda, en circuits neuronals les quinases presinàptiques PKA i PKC poden cooperar en la modulació de la conductància dels canals de calci, sodi i potassi (**Byrne i Kandel, 1996**).

3.2.1 Proteïna quinasa A (PKA)

La PKA en el seu estat inactiu és un tetràmer format per un dímer de subunitats reguladores i dos subunitats catalítiques. Cada una de les subunitats reguladores es poden unir a dues molècules de cAMP (de l'anglès *cyclic adenosine monophosphate*). Quan això succeeix hi ha un canvi conformacional on l'afinitat de la subunitat reguladora sobre la catalítica disminueix, les subunitats catalítiques es dissocien de les reguladores i l'enzim es torna actiu (**Kim i cols., 2005**). Una vegada s'ha alliberat la subunitat reguladora, la subunitat catalítica activa pot fosforilar a altres proteïnes diana de la membrana, en el citoplasma i en el nucli (**Sjoberg i cols., 2010; Bastidas i cols., 2015**).

Capítol I. Introducció

En els mamífers s'han descrit diferents isoformes de la subunitat catalítica i de les subunitats reguladores de la PKA. Segons la literatura i en estudis previs en el laboratori, s'ha observat una diferent expressió i localització subcel·lular de les diferents isoformes de les subunitats catalítiques i reguladores de la PKA en els diferents components de la NMJ (**Imaizumi-Scherrer i cols., 1996; Hoover i cols., 2001; Perkins i cols., 2001; Barradeau i cols., 2002; Lanuza i cols., 2014, Besalduch, 2009; Tesi doctoral**).

En estudis funcionals previs en el nostre grup, s'ha observat que en condicions normals la PKA afecta a l'alliberació potenciant-la (**Santafé i cols., 2006, 2007**). Això indica que la PKA té un paper constitutiu en promoure el component d'alliberament normal. Hi ha diferents candidats que poden estimular a la PKA com les neurotrofines (NT-4, NT-3 i BDNF) a través de la via tirosina quinasa (**Boulanger i Poo, 1999; Pitts i cols., 2006**). Per un altre banda, hi ha circumstàncies en les quals s'ha observat que la PKA es troba desacoblada de la neurotransmissió evocada: (1) quan hi ha un desequilibri funcional en el sistema muscarínic donat per un bloqueig selectiu dels receptors M1 o M2; (2) quan l'entrada de Ca^{+2} és insuficient o quan es bloquegen els VDCCs tipus P/Q. El que indica que la PKA, al igual que la PKC, necessiten una quantitat suficient de Ca^{+2} per modular l'alliberació de neurotransmissor i així com, una dependència del canal P/Q (**Santafé i cols., 2006**). Així mateix, el canal P/Q pot ser diana final de les quinases que poden regular els VDCCs a través de la fosforilació (**Yokoyama i cols., 2005**). Pel contrari, hi ha altres condicions en les quals PKA es troba acoblada a la neurotransmissió: (1) quan el mecanisme muscarínic està completament inhibit per l'AT; (2) en condicions d'alt Ca^{+2} extern; i (3) en presència del seu estimulador específic (Sp-8-BrcAMPs de l'anglès *Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphothioate, 8 Bromo-, Rp-Isomer, Sodium Salt*) (**Santafé i cols., 2006, 2007, 2009**). Hi ha estudis previs en el grup, en els quals s'ha estudiat la relació funcional de la PKA amb altres molècules implicades en la modulació de la neurotransmissió. S'ha trobat certa relació dependent de la PKC amb la PKA en el control de la neurotransmissió. La PKA pot modular l'alliberament independentment de l'activitat de la PKC. Però, la PKC depèn de l'activitat de la PKA, per esdevenir l'acoblament i potenciar l'alliberació evocada d'acetilcolina (**Santafé i cols., 2009**). Això indica, la implicació coordinada de la PKA i la PKC en la cascada intracel·lular que modula la neurotransmissió. En preparacions on s'estimula la PKA amb el seu agonista (Sp-8-BrcAMPs), la PKC es torna activa. Aquest estudis mostren que la PKA influeix sobre l'activitat de la PKC. Un augment en l'activitat de la PKA, pot induir un augment de l'entrada Ca^{+2} (i d'acetilcolina) i aquest Ca^{+2} pot activar a la PKC (**Santafé i cols.,**

2009). A més, s'ha descrit que les serina/treonina quinases i el receptor TrkB cooperen en l'alliberació de neurotransmissor en la NMJ adulta. L'activació de la PKA (que resulta una potenciació de l'alliberació) necessita que la via del TrkB sigui funcional. I pel contrari, una conseqüència de l'activació del TrkB pot ser la estimulació de la PKA (**Santafé i cols., 2014**).

3.3.2 La família de la proteïna quinasa C (PKC)

La PKC és essencial per la traducció de senyal en una varietat de cèl·lules, inclouen les neurones i els miòcits. En la NMJ, aquesta proteïna està involucrada en l'alliberació presinàptica d'acetilcolina dependent del Ca^{+2} , la contracció postsinàptica de la fibra muscular també dependent del Ca^{+2} i en el procés d'eliminació sinàptica durant el desenvolupament neonatal (**Besalduch i cols., 2010**). S'han descrit diferents isoformes per les PKCs, les quals s'agrupen en tres famílies: (1) les clàssiques on la seva funció està regulada pel Ca^{+2} i també pel diacilglicerol (DAG de l'anglès *diacylglycerol*) o pels èsters de forbol i la fosfatidilserina (PS de l'anglès *phosphatidylserine*) (**Pu i cols., 2006; Lanuza i cols., 2014**); (2) les noves que estan regulades pel DAG o els èsters de forbol i la PS i són independents al Ca^{+2} (**Lanuza i cols., 2014**); i (3) les atípiques que només requereixen PS (**Lanuza i cols., 2014**). En aquesta tesi, s'estudiarà la relació funcional de la família de les PKCs amb els receptors d'adenosina.

La PKC es localitza en molts teixits i 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. En estudis d'immunohistoquímica realitzats en el nostre grup, s'ha descrit la distribució cel·lular de les diferents isoformes de la PKC en els diferents components de la NMJ adulta (**Lanuza i cols., 2000, 2010, 2014; Besalduch i cols., 2010, 2013**).

En estudis funcionals previs en el nostre laboratori, s'ha observat que la PKC augmenta l'alliberació evocada quan és altament activada pel forbol èster, PMA (de l'anglès *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (**Santafé i cols., 2006**). No obstant, com s'ha comentat abans, quan la funció sinàptica és normal (entrada normal de Ca^{+2} i normal alliberació d'acetilcolina) s'ha vist que la PKC es troba desacoblada del mecanisme d'alliberació d'acetilcolina. En aquest cas, quan s'inhibeix totalment la PKC amb la calfosteïna (CaC de l'anglès *calphostin C*) els paràmetres d'alliberació no canvien. A més, s'ha descrit que la PKC és dependent del Ca^{+2} que entra a través dels VDCCs tipus P/Q durant l'activitat evocada, treballant prop del seu nivell màxim, a concentracions normals de Ca^{+2} (**Santafé i cols., 2005**). Atès que la PKC (igual

que succeeix amb la PKA) es desacobla de l'alliberació quan els canals P/Q estan prèviament bloquejats (**Santafé i cols., 2006**). No obstant, hi ha circumstàncies en les quals s'ha observat que la PKC s'acobla a l'alliberació: (1) quan es produeix un desequilibri funcional dels mAChRs (bloqueig del receptor M1 o M2); (2) en una situació d'alta concentració de Ca^{+2} extern (l'alliberació augmenta perquè augmenta l'activitat de la PKC); (3) amb la estimulació del PMA; i (4) durant una continua activitat sinàptica (**Santafé i cols., 2006, 2007, 2009; Besalduch i cols., 2010; Lanuza i cols., 2014**). Pel que fa a la possible relació de la PKC amb altres molècules implicades en el control de la neurotransmissió i tal com s'ha comentat anteriorment, l'activitat de la PKC depèn de la estimulació de la PKA (**Santafé i cols., 2009**). Recentment, s'ha estudiat la possible implicació de la PKC amb el receptor TrkB en la modulació de l'alliberació evocada. S'ha observat que en condicions basals, la via de senyalització del TrkB necessita la via intracel·lular de la PKC operativa per acoblar-se al mecanisme i potenciar l'alliberació (**Santafé i cols., 2014**).

3.3 Canals de calci dependents de voltatge (VDCCs)

Els VDCCs són un grup de canals iònics que es troben en les cèl·lules excitable (miòcits, neurones, glia, etc.) amb permeabilitat al Ca^{+2} . Normalment, es troben tancats quan estan en repòs i s'activen davant d'una despolarització del potencial de membrana. L'obertura d'aquest canal permetrà l'entrada del Ca^{+2} i donarà lloc a la contracció muscular, l'excitació neuronal, l'expressió gènica o l'alliberament de neurotransmissor (**Urbano i cols., 2008**). Els VDCCs es troben a les zones actives dels axons motors (**Heuser i cols., 1974; Catterall, 1999b; Long i cols., 2008**) i són necessaris per permetre l'entrada de Ca^{+2} que estimularà la fusió de les vesícules sinàptiques amb l'axolema, i la posterior alliberació d'acetilcolina a la fenedura sinàptica (**Urbano i cols., 2008**).

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'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 Ca^{+2} (**Catterall, 2000; Sandoval-Romero i Félix-Grijalva, 2003**). Aquests canals s'han classificat segons les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques en els subtipus: els canals activats per baix voltatge (LVA de l'anglès *low-voltage-activated*) com són els canals T (**Huguenard, 1998**), i els canals activats per alt voltatge (HVA de l'anglès *high-voltage-activated*) on s'inclouen els tipus L, N i P/Q (**Hofmann i cols., 1994; Catterall, 1995**). Aquesta nomenclatura per lletres va ser utilitzada inicialment al descriure els diferents canals,

utilitzant les inicials dels teixits on es van localitzar (**Nowycky i cols., 1985**). Més endavant, es va designar un altre nomenclatura tenint en compte les subunitats α_1 que conformen el porus del canal (**Birnbaumer i cols., 1994**). Finalment, existeix una altre nomenclatura que s'ha basat en les seqüències de les proteïnes (**Ertel i cols., 2000**) i s'han anomenat com Ca_v , fent referència a l'ió del que són permeables i la dependència de voltatge. A la **taula I.1** es mostren les correspondències entre les diferents nomenclatures.

Els canals L, N, P/Q i R s'expressen de forma diferent en el múscul adult i en el neonatal. En diversos estudis es demostra que la neurotransmissió en la sinapsi de mamífers adults, està relacionada amb el Ca^{+2} que entra pels VDCCs de tipus P/Q, ja que el bloqueig farmacològic amb la ω -Agatoxina IVA (ω -Aga IVA de l'anglès *ω -Agatoxin 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**).

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_{1D1}	3.1, 3.2, 3.3

Taula I.1. Correspondència de les diferents nomenclatures dels VDCCs. Taula adaptada de la publicació d'**Urbano i cols. (2008)**.

També, els canals P/Q modulen 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,b; Sheng i cols., 1994; Spafford i cols., 2003; Ramakrishnan i cols., 2012**). Altres estudis demostren que ni el canal L ni el canal N participen en 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, en estudis immunohistoquímics en el nostre grup, s'ha localitzat el canal N en els terminals nerviosos d'alguns músculs adults tot i no ser funcionals (**Santafé i cols., 2005**). En el cas del canal L s'ha descrit que promou l'endocitosi, descrivint per primera vegada un rol modulador d'aquest canal en l'alliberament de l'acetilcolina en els terminals nerviosos adults

(Perissinotti i cols., 2008). En estudis funcionals en el nostre grup, s'ha vist que el bloqueig selectiu del canal P/Q amb l' ω -Aga IVA redueix l'amplada de l'EPP significativament (aproximadament un 75%), mentre que el bloqueig selectiu del canal N amb l' ω -Conotoxina GVIA i del canal L amb la nitrendipina no afecta a l'alliberació d'acetilcolina, fent aquests canals (L i N) no operatius en la NMJ adulta de rata (Santafé i cols., 2003, 2005).

Tot i que, els canals P/Q són els responsables de la neurotransmissió en l'adult, hi ha diferents condicions experimentals o patològiques en les quals s'ha vist que estan implicats altres canals a part del P/Q. Per exemple en condicions de reinnervació, s'ha observat que la neurotransmissió també està acoblada al canal L (Katz i cols., 1996). En estudis realitzats en 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 la toxina botulínica en músculs adults (Santafé i cols., 2000). Urbano i col·laboradors al 2001 relacionen el canal L amb la neurotransmissió en l'adult quan s'inhibeixen les proteïnes fosfatases i el Ca^{+2} intracel·lular estant compromès amb el quelant BAPTA. Un altre situació on s'ha observat una modificació dels VDCCs és quan la subunitat α_{1A} del canal P/Q és eliminada genèticament. En aquest cas, la neurotransmissió depèn dels canals N i R (Urbano i cols., 2003).

En estudis previs en el grup, s'ha trobat que els VDCCs del tipus P/Q, els mAChRs, la PKA i la PKC estan funcionalment vinculats a un mecanisme específic que modula l'alliberació de transmissor en la NMJ adulta (Santafé i cols., 2006). Per exemple, com abans s'ha comentat, el mecanisme dels receptors M1 i M2 depenen del canal P/Q. Atès que els mAChRs es desacoblen de l'alliberació en presència del bloquejador del canal P/Q (ω -Aga IVA), encara que sembla ser que el receptor M2 pot respondre als ions de Ca^{+2} d'altres fonts (Santafé i cols., 2003). En un altre estudi en el nostre laboratori, s'ha mostrat que la PKA i la PKC influeixen en l'alliberació, depenent dels canals P/Q perquè en presència de l' ω -Aga IVA ambdues quinases es desacoblen de la neurotransmissió evocada (Santafé i cols., 2006).

4. L'ADENOSINA I ELS RECEPTORS PURINÈRGICS

L'adenosina és un nucleòsid endogen format per la unió de l'adenina amb un anell de ribosa a través d'un enllaç β -N-glicosídic (Della Latta i cols., 2013). Es sintetitza a partir de la degradació d'aminoàcids com la metionina, treonina, valina i isoleucina, així com, l'adenosin monofosfat (AMP de l'anglès *adenosine monophosphate*).

Tant l'adenosina com els seus derivats són constituents essencials de la cèl·lula viva, ja que tenen un paper clau en la formació de molècules biològiques tan rellevants com els nucleòtids ATP i cAMP, els cofactors com el dinucleòtid nicotinamida-adenina (NAD⁺ de l'anglès *nicotinamide adenine dinucleotide*) i els àcids nucleics.

En el metabolisme cel·lular, a més d'actuar com a intermediaris de rutes metabòliques, formen part de cofactors necessaris per a diverses reaccions enzimàtiques com d'oxidació-reducció (deshidrogenades dependents de NAD⁺, dinucleòtid de nicotinamida-adenina fosfat i flavin adenin dinucleòtid) o en reaccions de metilació, en les que participen com a donadors de grups metil (S-adenosilmetionina) (Arch i Newsholme, 1978). L'adenosina té un paper important en la transferència d'energia, és a dir, en la transició de l'ATP a l'adenosina difosfat (ADP de l'anglès *adenosine diphosphate*), sent el nucleòtid ATP la principal reserva energètica de la cèl·lula (Della Latta i cols., 2013). A més, tenen importància com a segons missatgers (cAMP) en diverses rutes bioquímiques (Pull i McIlwain, 1972), i la responsabilitat en l'emmagatzematge i la transmissió de la informació genètica, desenvolupant també un paper clau en la síntesi proteica com a constituents dels àcids nucleics.

4.1 Fonts d'adenosina

L'adenosina es va formant contínuament tant intracel·lularment com extracel·lularment. La concentració d'adenosina en els dos compartiments es deu als enzims que controlen la seva síntesi i degradació, així com als transportadors de nucleòtids de membrana. La producció intracel·lular d'adenosina és a través de la desfosforilació enzimàtica del seu precursor immediat l'AMP (Schubert i cols., 1979; Ribeiro i cols., 1996; Zimmerman i cols., 1998), o bé a través de la funció S-adenosilhomocisteïna hidrolasa de la qual es genera l'adenosina i l'homocisteïna (Broch i Ueland, 1980; Antonioli i cols., 2008; Fredholm, 2014). L'acció de l'adenosina s'acaba quan és absorbida per les cèl·lules adjacents (Ribeiro i Walker, 1975; Wu i Phillis, 1984), es sotmet a una ràpida fosforilació a AMP per l'adenosina quinasa (Spychala i cols., 1996) o bé, es degrada a inosina per l'adenosina deaminasa (Newsholme, 1978; Sebastião i Ribeiro, 1988; Lloyd i Fredholm, 1995; Noji i cols., 2004).

En el medi extracel·lular l'adenosina es pot obtenir per l'alliberació per part de la cèl·lula o per la degradació de l'ATP, l'ADP i l'AMP mitjançant diverses ectonucleotidases. En la NMJ, és conegut que l'ATP és coemmagatzemat conjuntament amb l'acetilcolina en les vesícules colinèrgiques (ràtio 1 ATP:10 acetilcolina) (Dowdall i cols., 1974; Nagy i cols., 1976;

Volkandt i Zimmermann, 1986) i és coalliberat amb l'acetilcolina a la fenedura sinàptica durant l'estimulació nerviosa (Ribeiro i Sebastião, 1987; Meriney i Grinnell, 1991; Silinsky, 1991; Redman i Silinsky, 1994). També, l'ATP és alliberat des de les fibres musculars activades (Smith, 1991; Cunha i Sebastião, 1993; Santos i cols., 2003) i des de les cèl·lules de Schwann perisinàptiques (Liu i cols., 2005), el qual posteriorment, és degradat a adenosina a través de la cascada de les ectonucleotidases. En la figura I.3 es mostra un esquema de la formació i del catabolisme de l'adenosina.

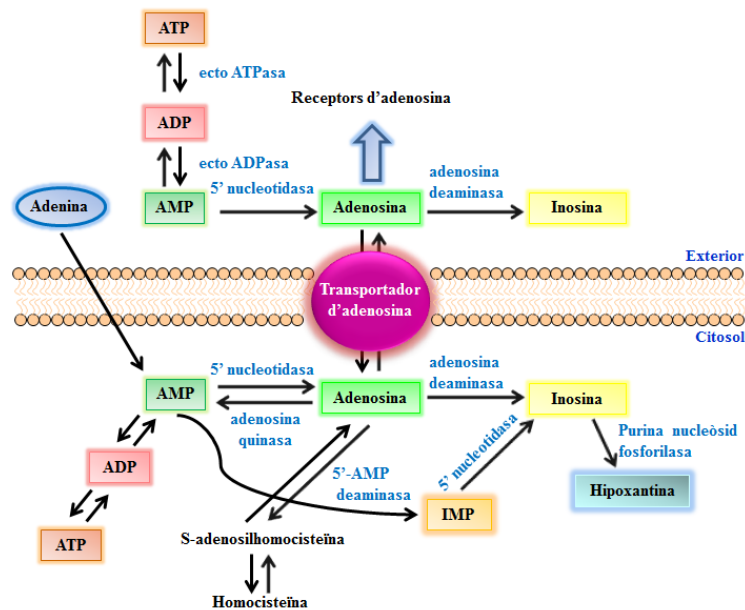


Figura I.3. Formació i catabolisme de l'adenosina. Esquema adaptat de la publicació de Sachdeva i Gupta (2013). Abreviacions de l'anglès: IMP: *inosine-5'-monophosphate*, ATP: *adenosine triphosphate*, ADP: *adenosine diphosphate*, AMP: *adenosine monophosphate*.

Com s'ha comentat, els reservoris de l'adenosina extracel·lular i intracel·lular també estan regulats per dos tipus de transportadors: els transportadors equilibratius de nucleòsids (ENTs de l'anglès *equilibrative nucleoside transporters*), que porten els nucleòsids a través de la membrana en ambdues direccions depenent del gradient de concentració (Baldwin i cols., 2004), i els transportadors concentratius de nucleòsids (CNTs de l'anglès *concentrative nucleoside transporters*) (Paes-De-Carvalho, 2002), els quals promouen l'entrada de nucleòsid cap a l'interior cel·lular en contra del seu gradient dependent de Na^+ (Ritzel i cols., 1997; Gray i cols., 2004; Fredholm i cols., 2011). Per tant, els transportadors d'adenosina també promouen

l'absorció de l'adenosina, la direcció del transport serà dependent del gradient de concentració en els dos costats de la membrana (**Gu i cols., 1995**).

Els nucleòtids i nucleòsids purínics, l'ATP, l'ADP i l'adenosina actuen com a neuromoduladors a través d'uns receptors de membrana anomenats purinèrgics. Mitjançant els quals participen en un gran nombre de processos patològics i fisiològics (**Burnstock, 1978**).

4.2 Classificació dels receptors purinèrgics

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'adenosina i els nucleòtids intervenen en nombrosos efectes biològics actuant a través de receptors de membrana específics, anomenats els receptors purinèrgics. Burnstock va proposar la primera classificació d'aquests receptors en dos famílies: els receptors P1 o d'adenosina (P1R de l'anglès *purinergic P1 receptors*), que reconeixen com a principal lligand natural l'adenosina. La segona família, els receptors P2 (P2R de l'anglès *purinergic P2 receptors*), que reconeixen com a lligand l'ATP o l'ADP (**Burnstock, 1978**). Posteriorment, els receptors per les pirimidines es van incloure dins de la família dels receptors P2 (**Fredholm i cols., 1994, 1997**).

Els receptors P1 i P2 formen dos grans famílies de receptors i es subdivideixen segons les seves evidències moleculars, bioquímiques i farmacològiques (**Matsumoto i cols., 2012**). Els receptors P1, que es comentaran més endavant, han sigut clonats i caracteritzats per diferents espècies (**Olah i Stiles, 2000; Fredholm i cols., 2001; Yaar i cols., 2005**). Aquests receptors es divideixen en quatre subtipus: A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃, tots ells acoblats a les proteïnes G. Els receptors A₁ i A_{2A} posseeixen gran afinitat per l'adenosina, mentre que els receptors A_{2B} i A₃ mostren una relativa baixa afinitat (**Fredholm i cols., 2011**). Diversos autors proposen que el paper dels receptors A_{2B} i A₃ tenen importància en situacions d'estrès fisiològic o patològic, en les quals la concentració d'adenosina es veu augmentada (**Fredholm i cols., 2007; Gessi i cols., 2008**). Tot i que el principal lligand dels receptors P1 és l'adenosina, s'ha vist que la inosina també pot activar al receptor A₃ (**Fredholm i cols., 2001; Cinalli i cols., 2013**).

Encara que en aquesta tesi es centrarà l'interès en els receptors P1, és interessant fer una breu descripció dels receptors P2 degut a la seva importància biològica. Els receptors P2 formen una família ampla de 13 receptors diferents (**Burnstock i King, 1996**). **Abbracchio i Burnstock (1994)**, en base al mecanisme de traducció i de clonació molecular van dividir aquest receptors en dues famílies: la primera, els receptors P2X₁₋₇ (formats per 7 subtipus) que són canals iònics activats per lligand i amb permeabilitat al Na⁺, K⁺ i Ca⁺ (**Bean, 1992**). I la

segona família, els receptors P2Y₁₋₈ (formats per 8 subtipus) estan acoblats a les proteïnes G i relacionats amb l'activació de la PLC, per tant, amb la formació d'inositol trifosfat (IP₃ de l'anglès *inositol triphosphate*) (O'Connor i cols., 1991).

4.2.1 Classificació i estructura dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃

La classificació original dels receptors A₁ i A₂ va ser descrita per van Calker i col·laboradors al 1979. En uns estudis van mostrar que l'activació d'aquests receptors per l'adenosina i pels seus derivats, inhibien (via A₁R) o estimulaven (via A₂R) l'activitat adenilat ciclasa en cultius cel·lulars de cervell (van Calker i cols., 1979). A més, els efectes de l'adenosina podien ser antagonitzats per metilxantines, i la potencia dels anàlegs de l'adenosina era diferent pels dos receptors (van Calker i cols., 1979). Posteriorment, els receptors A₂ es van subdividir en dos tipus A_{2A} i A_{2B}, basant-se en l'habilitat d'estimular la producció de cAMP en llesques de cervell a concentracions d'adenosina baixes i altes, respectivament (Daly i cols., 1983). Més tard, mitjançant tècniques de clonatge molecular es va identificar l'últim receptor (A₃) en línies cel·lulars (Zhou i cols., 1992). Posteriorment amb els anys, s'han definit i caracteritzat els quatre tipus de receptors d'adenosina, tots ells acoblats a les proteïnes G:

1) El receptor A₁ està acoblat a la proteïna G_{i/o}, produeix una inhibició en l'activitat adenilat ciclasa (Linden, 1991), una activació de la PLC, un increment de la conductància de K⁺ (Kurachi i cols., 1986) i una disminució de la conductància del Ca⁺² (Scott i Dolphin, 1989).

2) Els receptors A_{2A} i A_{2B} produeixen un augment de l'activitat de l'adenilat ciclasa, una activació de la PLC, un increment dependent de l'IP₃ i del Ca²⁺ intracel·lular (Feoktistov i Biaggioni, 1995). El receptor A_{2A} es troba acoblat a la proteïna G_s (Daly i cols., 1983), mentre que el receptor A_{2B} s'acobla a les proteïnes G_s i G_q. En l'estriat el receptor A_{2A} pot promoure els seus efectes predominantment a través de l'activació proteïna G_{olf}, la qual és similar a G_s i s'acobla a l'adenilat ciclasa (Kull i cols., 2000). Per un altre banda, s'ha descrit l'acoblament del receptor A_{2B} a les MAPKs (de l'anglès *Mitogen Activated Protein Kinases*) (Feoktistov i cols., 1999) i es pensa que aquest receptor (A_{2B}) roman silent en condicions fisiològiques, i és activat a conseqüència d'un augment extracel·lular d'adenosina (Ryzhov i cols., 2008).

3) El receptor A₃ es troba acoblat a les proteïnes G_{i/o} i G_q, i com el receptor A₁, disminueix l'activitat adenilat ciclasa. També s'ha demostrat que aquest receptor estimula

directament la PLC i la fosfolipasa D (PLD de l'anglès *phospholipase D*) (**Sachdeva i Gupta, 2013**). S'han citat altres vies secundàries activades pel receptor A_3 , com és el canal de K^+ sensible a l'ATP.

En quan a l'estructura dels receptors d'adenosina són polipèptids de 36 a 45 kDa amb un extrem N-terminal extracel·lular (de 7-13 residus), un extrem C-terminal intracel·lular (32-120 residus) i set segments transmembrana (hèlix α de 21 a 28 aminoàcids) que estan connectats per tres *loops* hidrofílics extracel·lulars i tres citoplasmàtics (**Ralevic i Burnstock, 1998; Fredholm i cols., 2001; Burnstock, 2007**). El domini N-terminal té llocs de N-glucosilació. El domini C-terminal conté residus de serina i treonina, els quals poden servir com llocs de fosforilació per a proteïnes quinases i permeten la dessensibilització (**Baldwin, 1994; Schöneberg i cols., 2002**). A més a més, l'extrem C-terminal i el tercer *loop* intracel·lular permet l'acoblament dels receptors d'adenosina a les proteïnes G (**Baldwin, 1994; Schöneberg i cols., 2002**). La unió del lligand al receptor, té lloc a través d'una cavitat en la zona dels segments transmembrana en el domini extracel·lular (veure **figura I.4**). Els receptors d'adenosina difereixen entre ells en la longitud i la funció del seu domini extracel·lular N-terminal, el seu domini intracel·lular C-terminal i els *loops* intra/extracel·lulars (**de Lera Ruiz i cols., 2014**). No obstant, en el cas del receptor A_{2A} presenta una porció de l'extrem C-terminal més llarga (d'uns 122 aminoàcids) respecte als altres receptors d'adenosina, el que fa que el seu pes molecular sigui lleugerament superior a la resta (**Federico i Spalluto, 2012**). A continuació, en la **figura I.4** es mostra un model de l'estructura del receptor d'adenosina.

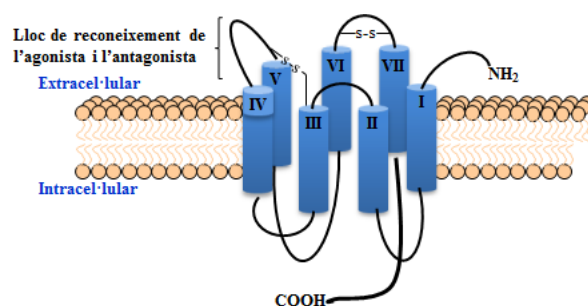


Figura I.4. Model estructural del receptor d'adenosina. El receptor conté un extrem N-terminal extracel·lular, un extrem C-terminal intracel·lular i set dominis transmembrana (I-VII) d'aminoàcids hidrofòbics que cadascú constitueix una hèlix α , els quals es connecten amb tres *loops* hidrofílics extracel·lulars i intracel·lulars. La regió extracel·lular i transmembrana es creu que és important per la unió de l'antagonista i l'agonista. L'S-S indica la presència d'hipotètics ponts disulfur (**Jacobson i cols., 1993**). La glucosilació succeeix en el segon *loop* extracel·lular. Model adaptat de diferents publicacions (**Ralevic i Burnstock, 1998; Burnstock, 2007; Della Latta i cols., 2013**).

Mitjançant tècniques en biologia molecular s'ha demostrat que els receptors d'adenosina poden funcionar com homodímers o heterodímers (**Ciruela i cols., 1997; Canals i cols., 2003**). Poden estar units a altres receptors purinèrgics (**Yoshioka i cols., 2002; Nakata i cols., 2005; Ciruela i cols., 2006**) o bé a altres famílies de receptors, com els receptors metabotrópics de glutamat (**Ciruela i cols., 2001; Cabello i cols., 2009; Suzuki i cols., 2013**) o als receptors cannabinoïdes (**Carriba i cols., 2007**). Això vol dir, que no es pot considerar que els receptors de neurotransmissors tinguin una única funció. Si no que la heteromerització del receptor, li pot conferir una entitat funcional diferent amb respecte a la característica bioquímica del component individual de l'heteròmer (**Ferré i cols., 2007**).

Els receptors d'adenosina estan implicats en diferents malalties com el Parkinson, la inflamació, la isquèmia (**Federico i Sapalluto, 2012; Villar-Menéndez i cols., 2014**), el càncer (**Sheth i cols., 2014**). Així mateix, aquest receptors són atractives dianes terapèutiques de malalties com la hipòxia, el Parkinson, l'asma i l'Esquizofrènia (**Fredholm i cols., 2001, 2003**). Un exemple que s'ha descrit és l'administració d'antagonistes del receptor A_{2A} en el tractament de la malaltia del Parkinson que pot prolongar l'efecte de la duració de l'acció del L-DOPA (de l'anglès *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*), un precursor de la dopamina, i disminuir diversos símptomes motors com la marxa, els tremolors i la discinèsia (**Fox, 2013**). En estudis recents, s'ha demostrat que la cafeïna i els antagonistes dels receptors A_{2A} poden evitar l'acumulació dels pèptids $A\beta$ (de l'anglès *amyloid β peptide*) en/i al voltant dels vasos sanguinis cerebrals, els quals si no es tracten poden donar dèficits cognitius (**Chen, 2014; Laurent i cols., 2014**). En models *in vivo* d'Alzheimer en ratolins, el consum crònic de cafeïna reverteix les lesions cognitives i disminueix els nivells de $A\beta$ en el cervell (**Arendash i cols., 2009; Cao i cols., 2009; Chu i cols., 2012**). A més, la cafeïna promou la supervivència neuronal i redueix el procés de degeneració en l'estriat i/o en el còrtex, el qual contribueix a tenir efectes beneficiosos contra la malaltia de l'Alzheimer (**Zeitlin i cols., 2011**).

4.2.2 Vies de senyalització dels receptors d'adenosina

Com s'ha comentat anteriorment, els receptors d'adenosina es troben acoblats a un tipus determinat de proteïnes G ($G_{i/o}$ i G_s). Aquest tipus de proteïna està constituït per tres subunitats (α , β i γ) i es troben ancorades en la part interna de la membrana citoplasmàtica principalment per la subunitat α de la proteïna. Poden presentar dos estats: l'actiu i l'inactiu. Quan l'estat és inactiu, les tres subunitats estan en contacte físic mitjançant unions dèbils. La

subunitat α té un lloc d'unió a la guanosina difosfat (GDP de l'anglès *guanosine diphosphate*), ocupat per aquesta molècula en l'estat inactiu. Quan s'activen els receptors d'adenosina s'activa la proteïna G promovent un canvi conformacional que facilita l'alliberació del GDP i estimula la unió de la guanosina trifosfat (GTP de l'anglès *guanosine triphosphate*). Aquest canvi GDP-GTP estimula la dissociació de la subunitat α de les subunitats $\beta\gamma$. Posteriorment, les subunitats $\alpha_{i/o}$ i α_s de les proteïnes $G_{i/o}$ i G_s interactuen amb l'enzim adenilat ciclase, que es troba unida a la membrana cel·lular, per inhibir o estimular la formació cAMP, respectivament, a partir de l'ATP.

Per tant l'activació dels receptors A_{2A} i A_{2B} (acoblat a G_s) estimulen la formació del cAMP, i aquest segon missatger activa a la PKA que pot fosforilar a CREB (de l'anglès *cAMP response element binding protein*). Pel contrari, l'activació dels receptors A_1 i A_3 inhibeixen la producció del cAMP donant lloc a una disminució de l'activitat de la PKA i de la fosforilació de CREB (Cunha, 2001; Paes-De-Carvalho i cols., 2002; Fredholm i cols., 2011). L'activitat quinasa de la PKA intervé en la funció diverses proteïnes cel·lulars, incloent canals iònics, proteïnes de l'aparell contràctil i enzims catalítics de rutes bioquímiques (Henning, 1997). Per un altre banda, la proteïna CREB té un paper important en la regulació de la transcripció de diversos gens com per exemple el BDNF (Lonze i Ginty, 2002; Greer i Greenberg, 2008). En la [taula I.2](#) es mostra un resum dels efectes donats pels acoblaments de les proteïnes G, i a continuació es pot veure un esquema representatiu de la via de senyalització descrita dels receptors d'adenosina ([figura I.5](#)).

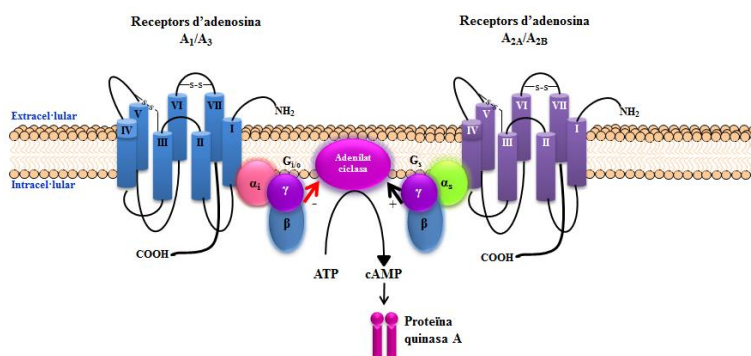


Figura I.5. Esquema representatiu de l'activació dels receptors P1. L'activació dels receptors d'adenosina per l'adenosina promou l'activació de la proteïna G. Això, induïx la unió del GTP a la proteïna G i la dissociació de la subunitat α . En el cas dels receptors A_1 i A_3 , la subunitat α_i de la proteïna G_i inhibeix l'adenilat ciclase amb la subseqüent disminució de la formació de cAMP i de l'activitat de la PKA. Pels receptors A_{2A} i A_{2B} la subunitat α_s de la proteïna G_s estimula l'adenilat ciclase amb la conseqüent formació de cAMP i l'activació de la PKA. Esquema adaptat de la publicació de Henning (1997).

A més de la ruta de cAMP, els receptors d'adenosina poden activar altres vies de senyalització a través de les proteïnes G en teixits específics, incloent la guanilil ciclasa, canals de calci i potassi, la fosfolipasa A (PLA de l'anglès *phospholipase A*) i la PLC (**Sarges i cols., 1990; Collis i Hourani, 1993**). Per exemple, en alguns casos el receptor A₁ pot augmentar l'activitat de la PLC a través de la toxina *pertussis* susceptible a la proteïna G. Així mateix, pot inhibir els canals de potassi i alguns canals de calci tipus P, Q i N dependents de voltatge. A més, es coneix que el receptor A₁ pot estar unit a varies vies de senyalització de quinases com la PKC, IP₃ quinasa i la MAPK (**Haskó i cols., 2008**). L'activació del receptor A_{2A} pot promoure l'activació de la PKC de manera dependent a cAMP i per un mecanisme independent (**Fredholm i cols., 2011; Socodato i cols., 2011**). Per un altre banda, el receptor A_{2B} pot estimular directament a la PKC a través de la proteïna G_q (**Fredholm i cols., 2011**). L'estimulació del receptor A_{2A} sol, també pot activar la via de senyalització Raf/MEK/ERK per una via dependent de la proteïna PKA o de manera independent a través del mecanisme Src i Sos, respectivament (**Schulte i Fredholm, 2003**). A més a més, s'ha descrit que tots els receptors d'adenosina poden activar a ERK1/2 (de l'anglès *extracellular regulated kinase 1 and 2*) en cèl·lules d'ovari de hàmsster (**Schulte i Fredholm, 2000**).

Segons la bibliografia hi ha diversos estudis que mostren la interacció dels receptors d'adenosina amb altres receptors acoblats a les proteïnes G, receptors ionotròpics, i receptors de les neurotrofines, els quals poden contribuir a l'afinament de la funció neuronal. Les interaccions d'aquest receptors d'adenosina amb els receptors ionotròpics poden succeir a través de modificacions en el grau de fosforilació del receptor. Per exemple, la dessensibilització del nAChRs és augmentada pel cAMP i dependent de la fosforilació de la PKA (**Huganir i cols., 1986**) així com, per l'activació del receptor A_{2A} (**Correia-de-Sá i Ribeiro, 1994**). Per un altre banda, és de particular interès uns estudis que mostren que l'adenosina pot transactivar la via de senyalització del TrkB a través del receptor A_{2A}, sense requerir la unió de la neurotrofina, tenint aquest receptor un paper regulador en aquesta via (**Lee i Chao, 2001; Wiese i cols., 2007**). D'aquesta manera, la possibilitat de promoure efectes tròfics mitjançant la manipulació del grau d'activació del receptor A_{2A} pot resultar altament rellevant en trastorns neurodegeneratius on l'acció prolongada d'aquestes vies de senyalització són requerides per la supervivència.

4.2.3 Farmacologia dels receptors d'adenosina

L'adenosina, tot i ser l'agonista endogen dels receptors d'adenosina és metabòlicament inestable, està subjecta a l'absorció per cèl·lules neuronals i gials, i a la inactivació enzimàtica ja que pot ser substrat de diversos enzims (**Clarke i cols., 1952; Phillis i Wu, 1982**). L'ús d'agonistes i antagonistes selectius, sent més estables que el lligand natural (l'adenosina) han facilitat l'estudi funcional d'aquest receptors (**Fredholm i cols., 2001**). No obstant, la base estructural de tots els agonistes coneguts dels PIRs està relacionada amb l'adenosina amb alguna petita modificació (en la posició 5' de la ribosa, la posició N6- i C2- de l'anell de la purina d'adenina), per tal d'augmentar l'afinitat pels diferents subtipus de receptors sense destruir l'activitat de l'agonista (**Burnstock, 2007; Della Latta i cols., 2013**). Uns exemples d'aquests agonistes selectius utilitzats en aquesta tesi en els estudis funcionals són: el CCPA (pel receptor A_1) i el CGS-21680 (pel receptor A_{2A}) generats per la substitució en la posició N6- i en la posició C2- de l'anell de la purina, respectivament (**Fredholm i cols., 2001; Della Latta i cols., 2013**).

En el cas dels antagonistes dels receptors d'adenosina, es poden dividir en dos grups: les xantines i els derivats de les xantines, i les no xantines. La majoria dels antagonistes són derivats de les xantines, que es basa en la introducció d'un substituent hidrofòbic (particularment fenil o cicloalquil) en la posició 8 de l'anell de la xantina (**Fredholm i cols., 2001; Della Latta i cols., 2013**). Un exemple dels derivats de les xantines són la cafeïna i la teofil·lina que són antagonistes inespecífics naturals dels receptors d'adenosina (**Fredholm i cols., 2001; Della Latta i cols., 2013**). En concret, en els estudis funcionals d'aquesta tesi s'ha utilitzat el derivat de la xantina DPCPX (pel receptor A_1) i el compost del grup de les no xantines MRS1334 (pel receptor A_3) (**Fredholm i cols., 2001; Della Latta i cols., 2013**). En la següent taula es mostra un exemple significatiu dels agonistes i antagonistes selectius dels receptors d'adenosina. La nomenclatura completa de les substàncies purinèrgiques utilitzades en els estudis funcionals d'aquesta tesi es mostren en l'apartat *10.11 Substàncies utilitzades en electrofisiologia a Materials i Mètodes*.

Capítol I. Introducció

Subtipus	A ₁ R	A _{2A} R	A _{2B} R	A ₃ R
PG	Gi/o	Gs/G _{olf}	Gs/Gq	Gi/Gq
Efecte	↓cAMP	↑cAMP	↑cAMP	↓cAMP, ↑IP ₃
Agonista	CCPA	CGS-21680	NECA	IB MECA
Antagonista	DPCPX	SCH-58261	MRS1706	MRS1334
Distribució	Cervell, medul·la espinal, cor, testicles i nervis terminals	Cervell, cor, pulmó i melsa	Cervell Intestí llarg i vesícula biliar	Pulmó, fetge, cor, testicles i cervell

Taula I.2. Receptors d'adenosina. Classificació dels receptors d'adenosina amb l'acoblament de la proteïna G (PG) corresponent i la via de senyalització. També es mostra uns exemples representatius dels agonistes i antagonistes purinèrgics més selectius (excepte NECA) i un resum de la principal distribució dels receptors P1. La nomenclatura completa dels moduladors es detalla en l'*Annex I* (moduladors purinèrgics utilitzats en electrofisiologia -veure també en l'apartat 10.11 *Substàncies utilitzades en electrofisiologia a Material i Mètodes-*) i l'*Annex II* (*Agents moduladors addicionals*). Taula adaptada de la publicació de **Burnstock (2007)**.

4.2.4 Distribució dels receptors d'adenosina

Els receptors d'adenosina són àmpliament distribuïts en el sistema nerviós central i perifèric. El receptor A₁ s'expressa en el còrtex cerebral, en l'hipocamp, en el cerebel, en el tàlem, en el bulb raquidi i en la medul·la espinal (**Reppert i cols., 1991; Dixon i cols., 1996; Fredholm i cols., 2011**). També, s'ha trobat present en les cèl·lules glials com els astròcits (**Biber i cols., 1997**), els oligodendròcits (**Othman i cols., 2003**) i la micròglia (**Gebicke-Haerter i cols., 1996**). Concretament en les neurones, el receptor A₁ s'ha localitzat en regions sinàptiques on modula l'alliberació del glutamat, l'acetilcolina, la serotina i l'àcid gamma-aminobutíric (GABA de l'anglès *gamma-aminobutyric acid*) (**Cunha, 2001**). A nivell perifèric, la distribució del receptor A₁ no ha estat molt estudiada, per tant un dels objectius d'aquesta tesi és estudiar la seva distribució en la NMJ. En estudis de mRNA, el receptor A₁ s'ha trobat àmpliament distribuït en el sistema nerviós perifèric: en el vas deferent, els testicles, el teixit adipós blanc, l'estomac, la melsa, la glàndula pituïtària, el cor, l'aorta, el fetge i la bufeta (**Reppert i cols., 1991; Dixon i cols., 1996**). I a baixos nivells, en els pulmons, els ronyons i en l'intestí prim (**Reppert i cols., 1991; Stehle i cols., 1992; Dixon i cols., 1996**).

La distribució del receptor A_{2A} en el cervell és més restringida, es troba present en les regions de l'estriat, el nucli *accumbens* i el tubercle olfatori (**Ongini i Fredholm, 1996; Fredholm i cols., 2011; de Lera Ruiz i cols., 2014**). A més, s'ha detectat en neurones, micròglia,

oligodendròcits i possiblement, en astròcits (Li i cols., 2001; Melani i cols., 2009). També, s'ha descrit la seva presència en les espines dendrítiques i les regions postsinàptiques del gangli basal (Hettinger i cols., 2001). Mitjançant estudis d'immunohistoquímica s'ha trobat altament localitzat en les regions presinàptiques (en l'hipocamp), on modulen l'alliberació de neurotransmissor com el glutamat, l'acetilcolina, el GABA i la noradrenalina (Cunha i cols., 2000; Lopes i cols., 2002; Rebola i cols., 2002, 2005b). Fora del sistema nerviós central, s'ha detectat l'expressió de mRNA en teixits immunes, els ulls, el múscul esquelètic, el cor, els pulmons, la bufeta i l'úter. I amb baixa expressió en l'intestí prim, els ronyons, la melsa, l'estomac, els testicles, la pell i el fetge (Dixon i cols., 1996; Peterfreund i cols., 1996).

En el cas del receptor A_{2B} s'expressa a baixos nivells en cèl·lules neuronals i gials, com la micròglia i els astròcits (Sebastião i Ribeiro, 1996; Allaman i cols., 2003). En el cas del teixit perifèric s'ha trobat expressat a alts nivells en el tracte intestinal i els mastòcits, i a baixos nivells en el teixit adipós, la glàndula adrenal i el ronyó (Cacciari i cols., 2005). En estudis de Northern blot s'ha observat una alta expressió d'aquest receptor en el *caecum*, l'intestí gros i la bufera urinària. I s'ha detectat a baixos nivells en el cervell, la medul·la espinal, els pulmons, el vas eferent i la glàndula pituïtària (Stehle i cols., 1992). Mitjançant estudis de RT-PCR (de l'anglès *Reverse transcription polymerase chain reaction*) s'han mostrat altes expressions d'aquest receptor en els ulls, els pulmons, l'úter i la bufeta. A baixos nivells, s'ha observat en l'aorta, l'estomac, els testicles, el múscul esquelètic i a molt baixos nivells es troba en el jejú, en els ronyons, el cor, la pell, la melsa i el fetge (Dixon i cols., 1996).

El receptor A_3 es detecta a baixos nivells en l'hipocamp, el còrtex, el cerebel i l'estriat (Fredholm i cols., 2011). Aquest receptor es localitza en neurones, l'astròglia i la micròglia (Brand i cols., 2001; Wittendorp i cols., 2004). En estudis de mRNA el receptor A_3 es troba àmpliament distribuït en diferents òrgans i teixits, s'expressa en els testicles, els pulmons, els ronyons, la placenta, el cor, la *pars tuberalis*, la glàndula pineal, la melsa, el fetge, l'úter, el jejú, el colon proximal i els ulls en rata, ovella i humana (Zhou i cols., 1992; Linden i cols., 1993; Salvatore i cols., 1993; Linden, 1994; Rivkees, 1994; Dixon i cols., 1996). En la [taula I.2](#) es mostra un resum de la distribució principal dels receptors d'adenosina.

4.2.5 Funcions dels receptors d'adenosina

Com s'ha comentat anteriorment, l'ATP és un constituent essencial per totes les cèl·lules vives que permet que aquestes funcionin. El metabòlit de l'ATP és l'adenosina la qual està directament implicada en la comunicació de la cèl·lula nerviosa. L'adenosina existeix i és

aparentment alliberada en totes les cèl·lules, inclús en les neurones i la glia. L'adenosina és una substància molt important en la homeòstasi de les cèl·lules del sistema nerviós (**Newby, 1984**). Mentre que l'ATP pot funcionar com un neurotransmissor en algunes àrees del cervell (**Edwards i cols., 1992; Nieber i cols., 1997; Pankratov i cols., 1998; Mori i cols., 2001**), l'adenosina no es comporta com un neurotransmissor clàssic. No és emmagatzemat en vesícules, ni alliberat per exocitosi, no sembla transferir informació unidireccionalment del component presinàptic al postsinàptic i no actua únicament o predominantment en les sinapsis (**Cunha, 2001**). L'adenosina és alliberada del citoplasma a l'espai extracel·lular a través dels transportadors de nucleòsids (veure a l'apartat *4.1 Fonts d'adenosina*). Per tant, l'adenosina al no ser alliberada per exocitosi es comporta com una molècula de senyalització influenciant en la transmissió sinàptica sense ser un neurotransmissor, per exemple modulant l'activitat del sistema nerviós central a nivell presinàptic per la inhibició o la facilitació de l'alliberació de neurotransmissor (**Cunha, 2005**), postsinàpticament per hiperpolarització o despolarització de les neurones i/o exerceix efectes no sinàptics (en les cèl·lules gials). Per tant, l'adenosina pertany al grup de neuromoduladors. De fet, existeixen estudis pioners que mostren que l'adenosina i l'ATP alliberat pels terminals nerviosos modulen el metabolisme presinàptic a través dels autoreceptors d'adenosina i els P2, respectivament (**Correia-de-Sá i cols., 1991**). El terminal nerviós i l'activitat muscular contribueixen en el creixement de l'adenosina extracel·lular (**Cunha i Sebastião, 1993**).

En el sistema nerviós central, tot i que s'ha descrit la presència dels quatre receptors d'adenosina, els receptors A_1 i A_{2A} són els que es troben en més densitat en el cervell, mentre que els receptors A_{2B} i A_3 tenen un impacte modest. A més, l'escassetat d'agonistes i antagonistes pel receptor A_{2B} , i la pobre caracterització del receptor A_3 han fet que aquests receptors sigut menys estudiats en comparació amb els receptors A_1 i A_{2A} (**Feoktistov i Biaggioni, 1997; Dunwiddie i Masino, 2001**). Degut això, s'ha considerat que la funció purinèrgica majoritàriament depèn dels receptors A_1 i A_{2A} en el cervell (**Fredholm i cols., 2005**). Com abans s'ha comentat, l'adenosina funciona com un neuromodulador, depenent d'un equilibri del receptor inhibitor A_1 i del receptor estimulador A_{2A} (**Cunha i cols., 1994b, 1996; Dunwiddie i Masino, 2001; Lopes i cols., 2002; Cunha, 2001, 2005**). En concret, en estudis d'hibridació *in situ*, immunohistoquímica i autoradiografia, s'ha confirmat la presència dels dos receptors (A_1 i A_{2A}) en els nervis terminals de l'hipocamp (**Cunha i cols., 1994a, 1995; Díaz-Hernández i cols., 2002**). Suggestint, que la transmissió sinàptica està modulada majoritàriament per aquests receptors (A_1 i A_{2A}) i que l'acció de l'adenosina endògena i

extracel·lular depèn d'un balanç entre l'activació tònica d'aquest dos receptors A_1/A_{2A} (Cunha i cols., 1994b; Correia-de-Sá i Ribeiro, 1996). Addicionalment, el receptor A_1 pot controlar l'excitabilitat en el sistema nerviós central (Greene i Haas, 1991). En el cas dels receptors d'adenosina A_{2B} i A_3 , la majoria d'estudis realitzats en el sistema nerviós central es centren en condicions patològiques (von Lubitz, 1997; Trincavelli i cols., 2004; Moidunny i cols., 2012) i en les cèl·lules glials (Fredholm i Altiok, 1994; Fiebich i cols., 1996; Jiménez i cols., 1999; Allaman i cols., 2011). No obstant, hi ha alguns treballs que mostren que l'activació receptor A_3 té un paper funcional en la plasticitat sinàptica, en LTP (de l'anglès *long-term potentiation*) i LTD (de l'anglès *long-term depression*) (Costenla i cols., 2001).

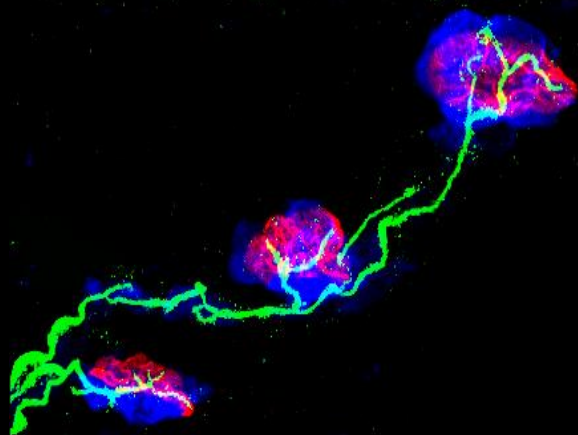
A més, els receptors d'adenosina tenen una funció crucial regulant l'activació de múltiples receptors que afecten a l'alliberació de neurotransmissor, transmissió sinàptica o ambdues; en particular els receptors d'adenosina regulen els receptors de neuropèptids (CGRP i VIP de l'anglès *calcitonin gene-related peptide* i *vasoactive intestinal peptide*, respectivament) (Cunha-Reis i cols., 2000; Sebastião i cols., 2000a), els receptors autofacilitatoris nicotínics (Correia-de-Sá i Ribeiro, 1994), els receptors metabotrópics de glutamat (Winder i Conn, 1993) i els receptors de NMDA (de l'anglès *N-methyl-D-aspartate receptor*) (de Mendonça i Ribeiro, 1997). És a dir, la modificació dels nivells extracel·lulars d'adenosina amb la subseqüent alteració del grau d'activació dels receptors d'adenosina interferiria amb l'augment o la restricció d'altres neurotransmissors o neuromoduladors. Aquesta interferència no únicament succeeix en processos implicats en l'alliberació d'aquest mediadors, però també en l'habilitat per activar o dessensibilitzar els seus propis receptors. Aquesta interacció pot ser donada a través de processos de cascades intracel·lulars entre sistemes de traducció en comú (per exemple cAMP i fosfoinosítides) i a través de processos de fosforilació de proteïnes que impliquen a la PKC i la PKA. El receptor d'adenosina clau sembla ser l' A_{2A} , mentre que el receptor A_1 es comporta principalment com una diana d'afinament. A més, el receptor A_1 pot mediar el seu afinament com a resultat de l'acció oposada del receptor A_{2A} (Sebastião i Ribeiro, 2000). Per tant, el funcionament de la majoria de sistemes neuromoduladors presinàptics (receptors metabotrópics, ionotrópics i catalítics) està sota el control afinat dels receptors d'adenosina (principalment del receptor A_{2A}) (Queiroz i cols., 2003). Inclús com anteriorment s'ha mencionat, els receptors d'adenosina (en particular el receptor A_{2A}) poden transactivar la fosforilació del receptor TrkB sense el requeriment de la unió de la seva neurotrofina (Lee i Chao, 2001; Wiese i cols., 2007).

Capítol I. Introducció

A part dels efectes neuromoduladors, s'ha descrit una funció neuroprotectora pels receptors P1, relacionat amb l'activació del receptor A_1 , el qual disminueix l'alliberació de glutamat (atenuant del dany cerebral) (**Proctor i Dunwiddie, 1987; Thompson i cols., 1992**) i hiperpolaritza les neurones inhibint la conductància del K^+ a nivell postsinàptic (**Greene i Haas, 1991**), mentre que pel contrari el receptor A_{2A} té un efecte oposat. Finalment, els receptors d'adenosina poden controlar el metabolisme en les neurones i els astròcits (**Håberg i cols., 2000; Hammer i cols., 2001**) i en particular, el control del metabolisme del glicogen (**Magistretti i cols., 1986; Sorg i Magistretti, 1991; Allaman i cols., 2003**).

Fins el moment en la NMJ, en condicions on s'ha vist alterada la funció sinàptica a nivell presinàptic o postsinàptic, la transmissió sinàptica pot ser modulada pel receptor inhibitori A_1 i l'excitatori A_{2A} (**Cunha i cols., 1996**). Concretament, s'ha descrit que a concentracions micromolars de l'endogen agonista, l'adenosina, redueix el contingut quàntic i l'alliberació espontània en la NMJ d'amfibi (**Searl i Silinsky, 2005; Shakirzyanova i cols., 2006; Adámek i cols., 2010**) i en rata (**Ginsborg i Hirst, 1972; De Lorenzo i cols., 2006; Pousinha i cols., 2010**). No obstant, en rates, l'adenosina a concentracions submicromolars pot tenir l'efecte oposat (**Pousinha i cols., 2010**). S'ha suggerit que hi ha un complex balanç entre els receptors A_1/A_{2A} que pugui determinar la inhibició/potenciació de l'alliberació d'acetilcolina (**Pousinha i cols., 2010**). Però, tot i que s'ha identificat tot un tipus de purinoreceptors en la NMJ el coneixement en la funció fisiològica és encara limitat.

Tal com hem comentat en aquestes línies, els mAChRs, la PKA, la PKC i els VDCCs s'expressen i es localitzen en la sinapsi neuromuscular. Els treballs publicats fins el moment, han permès observar que estan implicats en el control de la neurotransmissió. En aquest treball, i com a objectiu principal, ens centrarem en estudiar la localització dels receptors d'adenosina en la NMJ i conèixer el seu efecte en la modulació de la neurotransmissió. En més detall, s'estudiarà la relació funcional dels receptors d'adenosina amb aquestes molècules implicades en el control de la neurotransmissió (els mAChRs, la PKA, la PKC i els VDCCs).



Capítol II.
Hipòtesi i Objectius

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. HIPÒTESI

1.1 Hipòtesi general

Els diferents receptors d'adenosina (PIR) es localitzen en la sinapsi neuromuscular i estan involucrats en l'alliberament de l'acetilcolina utilitzant vies de senyalització conegudes com els mAChRs, la PKA o la PKC.

1.2 Hipòtesi específica

1. Els autoreceptors metabotrópics d'adenosina es troben presents en els terminals nerviosos de la sinapsi neuromuscular.
2. Els PIRs no estan acoblats en la neurotransmissió evocada, però sí a l'alliberació espontània.
3. Els PIRs estan involucrats en la depressió sinàptica de trens d'estímul a alta freqüència.
4. El sistema purinèrgic es comporta com un sistema modulador de la neurotransmissió tenint una interdependència amb els mAChRs.
5. El sistema purinèrgic modula l'activitat PKA i l'acoblament de la PKC en la neurotransmissió.

2. OBJECTIUS

2.1 Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi és conèixer l'expressió i la localització precisa dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 a la sinapsi neuromuscular i valorar la seva implicació en la modulació de la neurotransmissió evocada i espontània, en condicions en les quals la fisiologia de la sinapsi està preservada.

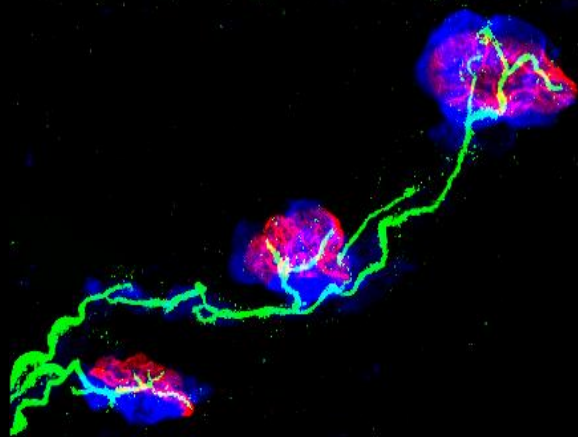
Aquest objectiu genèric es concentra en dos objectius amplis:

1. Conèixer la contribució dels receptors d'adenosina en la modulació de la depressió a curt termini durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora.

2. Estudiar la dependència d'aquest receptors amb altres molècules i vies de senyalització (mAChRs, PKA, PKC i VDCCs) que modulen l'alliberació evocada i espontània de neurotransmissor.

2.2 Objectius específics

1. Conèixer l'expressió dels receptors d'adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) en el múscul esquelètic LAL d'animals adults i neonatals.
2. Conèixer la localització precisa dels receptors d'adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) en els tres components cel·lulars que conformen la sinapsi neuromuscular.
3. Estudiar l'efecte dels moduladors purinèrgics inespecífics i específics, de l'adenosina endògena i de l'anàleg estable de l'adenosina (2-cloroadenosina) en l'alliberació evocada i espontània.
4. Estudiar l'efecte dels moduladors purinèrgics inespecífics i específics, de l'adenosina endògena i de la estimulació de l'anàleg estable de l'adenosina (2-cloroadenosina) durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora a una freqüència moderada (40 Hz).
5. Estudiar la implicació dels receptors d'adenosina en els *pair pulses* a 40 Hz.
6. Estudiar l'efecte dels moduladors purinèrgics inespecífics i del bloqueig dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} , i la participació de l'adenosina endògena durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora a altes freqüències (100 Hz).
7. Estudiar la possible relació funcional dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} i de la estimulació de l'anàleg estable de l'adenosina (2-cloroadenosina) amb els mAChRs tipus M1 i M2 en l'alliberació evocada, la cooperació d'aquests dos mecanismes en la depressió sinàptica a 40 Hz i en l'alliberació espontània.
8. Estudiar la possible relació funcional dels receptors d'adenosina amb la modulació de l'activitat de la PKA en l'alliberació evocada i espontània.
9. Estudiar la possible relació funcional dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} amb la modulació de l'activitat de la PKC en l'alliberació evocada i espontània.
10. Estudiar la possible dependència dels receptors d'adenosina amb la inhibició dels VDCCs tipus P/Q i la relació d'aquest receptors en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} en l'alliberació evocada i espontània.



Capítol III.
Material i Mètodes

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. ANIMALS

Els animals d'experimentació utilitzats en aquest treball han estat els ratolins *Swiss*, els quals s'han estudiat en diferents estats de desenvolupament, s'han utilitzat animals neonatals de 6-7 dies d'edat (P6-P7) i adults de 30-45 dies (P30-P45).

El subministrament dels ratolins progenitors *Swiss* ha estat per la casa comercial *Charles River* (Criffa, Barcelona). El motiu pel qual s'ha escollit aquest model d'animal és perquè són de talla petita, de manteniment senzill i econòmic, tenen temps curt generacional, una bona reproducció al llarg de tot l'any i suporten bé la consanguinitat.

Els animals s'han mantingut i s'han entrecreuat durant tres dies d'una forma controlada, en l'estabulari de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili. Passat aquest temps, la femella s'ha aïllat en gàbies separades durant la gestació i el posterior part. Per evitar la consanguinitat, no s'han creuat els animals de la mateixa família. I, amb l'objectiu d'acomodar i homogeneïtzar en tot el possible les característiques dels nadons, s'han deixat créixer un màxim de 8 animals per camada.

Les condicions d'estabulació i de creixement dels animals han sigut en gàbies estàndard MAKROLON^R (27x27x14 cm³), a una temperatura ambient de 20-22°C regulada amb termòstat electrònic i una humitat relativa de 60-70%. Els ritmes circadianis han estat de 12 hores de llum de neó blanca i 12 hores de fosc. L'alimentació i la hidratació dels animals ha estat *ad libitum*, a base de pinso per ratolí *VRF-1* subministrat per la casa comercial *Charles River* i aigua clorada.

Els animals s'han anestesiats per via intraperitoneal amb tribromoetanol 2% (TBE l'anglès *tribromoethanol*, 0.15 ml per cada 10 g de pes de l'animal). Una vegada s'ha observat la pèrdua de reflexes s'ha procedit al seu sacrifici mitjançant l'exsanguinació fent un tall a la vena jugular. I a continuació, s'ha realitzat l'extracció del múscul tal i com es mostra en l'apartat 3.

Per 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 la manipulació dels animals s'ha realitzat contemplant les directrius establertes per la llei 5/1995, del 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.

2. MODEL EXPERIMENTAL: LA UNIÓ NEUROMUSCULAR

El model neuromuscular dels vertebrats es tracta d'un bon model, s'ha utilitzat durant molts anys en investigacions neurobiològiques degut a les seves característiques: per la seva localització, l'accessibilitat i la seva mida relativament gran que permet estudiar els seus components per separat o bé, en conjunt. A més a més, és un bon model per l'estudi de la formació de la sinapsi. Té la peculiaritat de ser geomètricament simple a l'estar formada per tres elements: la neurona motora presinàptica, la cèl·lula de Schwann i la cèl·lula muscular postsinàptica. El desenvolupament i la regeneració de la sinapsi pot ser manipulat *in vivo* amb relativa facilitat. A més a més, les sinapsis entre motoneurons i les cèl·lules musculars poden ser estudiades en cultius cel·lulars i les proteïnes sinàptiques poden ser fàcilment visualitzades mitjançant tècniques d'immunomarcatge utilitzant proteïnes específiques (els anticossos). Per últim, l'expressió gènica pot ser alterada i estudiada amb detall amb ratolins transgènics i mutants (**Burden, 1977**).

La NMJ resulta molt útil en els estudis funcionals, a diferència del sistema nerviós central, té un únic sistema de neurotransmissor, el colinèrgic. Aquesta característica ha fet que sigui un model molt utilitzat en estudis electrofisiològics i neurobiològics en les últimes dècades.

En aquest treball, s'ha utilitzat com a model d'estudi el múscul esquelètic elevador de les orelles o *Levator auris longus* (abreviat com LAL), que és el que permet moure les orelles dels ratolins. Aquest múscul va ser descrit per **Denise Angaut-Petit al 1987** i està situat sota la pell a l'àrea dorsal del cap i del coll. Presenta una part cranial i caudal. 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 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 més (**Angaut-Petit i cols., 1987**).

El múscul LAL és subcutani, aquesta peculiaritat permet injectar les drogues *in vivo* i accedir directament a la superfície muscular per tant, a les terminacions nervioses. Al ser molt fi i tenir poques capes de cèl·lules fa que sigui possible l'efecte i la difusió dels agents directament sobre les cèl·lules musculars, per tant dins de la NMJ. Té una morfologia plana que permet tenir una bona visibilitat de les terminacions nervioses de la branca auricular posterior del nervi facial, que és el que innerva en el múscul permetent observar les plaques

motores sense haver de fer seccions d'aquest (Tomàs i cols., 2000; Lanuza i cols., 2001). Per aquestes característiques i per la seva fàcil extracció i manipulació, el múscul LAL és un model ideal pels estudis electrofisiològics *in toto*, histològics i de localització.

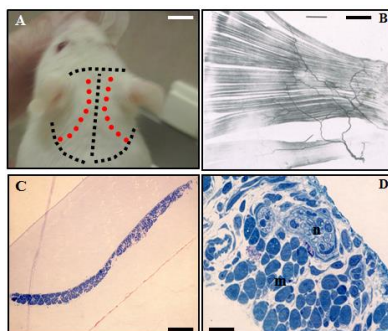


Figura M.1. Múscul LAL. Impregnació argèntica i tinció en blau de metilè. (A) Localització del múscul esquelètic LAL en ratolí on s'evidencia l'àrea que ocupa aquest múscul. Barra d'escala: 1 cm. (B) Preparació histològica mitjançant impregnació argèntica del múscul LAL sencer on s'observa la innervació (Angaut-Petit i cols., 1987). Barra d'escala: 1.2 mm. (C i D) Talls transversals semifins d'un múscul LAL tenyit en blau de metilè on en (D) s'observa el nervi (n) entre els miòcits (m). Barra d'escala: (C) 150 μm i (D) 50 μm . Imatges publicades a la *tesi doctoral de Marta Tomàs, 2010*.

3. OBTENCIÓ DE MOSTRES

3.1 Dissecció del LAL

Per realitzar la dissecció del múscul LAL, es fixa l'animal en posició bocaterrosa, per les extremitats anteriors i posteriors amb agulles en forma de T en una plataforma de suro per facilitar-ne la manipulació. Si es tracta d'un animal adult es depila la zona dorsal del cap. A continuació, es fa un tall per sota de l'omòplata en direcció al cap en forma de T, i es va extraient la pell vorejant les orelles deixant lliure el paquet muscular en els dos costats. Després, es desinserta el múscul del cos de l'animal, de manera que per una banda el múscul queda unit a l'orella i per l'altre a la línia mitja que uneix als dos músculs LALs. Una vegada s'ha extret el paquet muscular de l'animal, es posa en una placa Petri amb el fons de *Sylgard* tot submergit amb una solució de Ringer, de tampó fosfat salí (PBS de l'anglès *phosphate buffer saline*, pH 7.4) o bé amb paraformaldehid (veure més avall). S'estira amb agulles entomològiques posant la cara interna del LAL tocant a l'aire. A continuació, s'aïlla el múscul LAL amb l'ajuda d'una lupa estereoscòpica i amb material de microcirurgia, s'extreuen les capes superficials d'altres músculs, capa a capa, i renovant la solució amb freqüència fins que s'arriba a l'última capa que és el LAL (veure [figura M.2](#)). Si la mostra és per la tècnica del

Capítol III. Material i Mètodes

Western blot, una vegada s'ha aïllat el múscul es posa amb una solució de PBS i es guarda a -80°C per la seva posterior utilització. Si és per immunohistoquímica, una vegada s'ha extret el paquet muscular es fixa la mostra amb paraformaldehid al 4% en PBS (30 minuts si és nadó i 45 minuts per l'adult), per aconseguir l'estructura del múscul intacte i a continuació, s'extreuen les capes més superficials com anteriorment s'ha descrit. Per últim, es guarda la mostra a -80°C per la seva posterior utilització. Pels estudis d'electrofisiologia, es submergeix el múscul en una solució salina de Ringer oxigenat (composició: 95% O_2 i 5% d' CO_2) amb glucosa (11 mM), enlloc de PBS, per mantenir viu el LAL (per a més informació mirar l'apartat 10.2). En tot els casos, tant en estudis morfològics com funcionals, s'ha de treure el màxim teixit connectiu que envolta les fibres musculars. Concretament, en el cas de l'electrofisiologia s'ha de procurar anar amb molta cura de no lesionar el múscul ja que es treballa amb mostra viva. Per la preparació de les solucions i el material utilitzat veure la [taula M.1](#).



Figura M.2. Imatge del múscul LAL.

3.2 Dissecció del cervell i la medul·la espinal

Per determinar la presència dels receptors A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 en el múscul esquelètic LAL mitjançant la tècnica del Western blot, s'han realitzat controls positius amb mostres de cervell i medul·la espinal adulta. Tot el procediment d'obtenció de les diferents mostres de teixit s'ha fet en fred per mantenir la conservació de les proteïnes.

Per l'obtenció de la mostra de cervell i la medul·la espinal adulta, en primer lloc, s'anestesia l'animal amb TBE al 2% (0.15 ml/10 g de pes animal). En el cas de la dissecció del cervell, quan s'observa la pèrdua de reflexes, es depila el cap com en el cas del LAL, com s'ha comentat anteriorment. A continuació, es dessagna l'animal i es fixa en un suro en forma de T per facilitar la seva manipulació. En segon lloc, es treu la pell de la zona del cap i es fa una incisió per sota de l'orella fent pressió per obrir la cavitat cranial amb una espàtula i amb molta cura es retira el cervell, el qual es posa en un *eppendorf* i es congela amb PBS a -80°C per la seva posterior utilització.

Per realitzar la dissecció de la medul·la espinal, el procediment a seguir és similar a l'anterior. Amb l'excepció, de que es fa una incisió sobre la part dorsal de l'animal deixant a la vista la columna vertebral. A continuació, amb unes tisores es talla amb molta cura els ossos de la columna vertebral deixant a la vista la medul·la espinal. Es descarta la zona dorsal obtenint la zona ventral que és on estan les neurones motores. Per últim, es posa en un *ependorf* amb PBS i es congela a -80°C per la seva posterior utilització. El material i la preparació de les solucions utilitzades per les disseccions dels diferents teixits es resumeixen a continuació en la **taula M.1.**

Solucions i material
Tribromoetanol (TBE, <i>Sigma</i>) 2% w/v (anestèsic)
Solució de fosfat salí (PBS, ajustat a pH 7.4): KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, NaCl 140 mM i Na_2HPO_4 8.1 mM
Solució normal de Ringer: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaHCO_3 12 mM, Na_2HPO_4 1 mM, CaCl_2 2 mM, MgSO_4 1 mM i glucosa 11 mM pH 7.3. Bombolleig constant amb un 95% d' O_2 i un 5% de CO_2
Paraformaldehid 4% en PBS
Material quirúrgic
Agulles entomològiques i placa de Petri amb el fons de <i>Sylgard</i> (polímer sintètic comercial)
Agulles, suro i lupa

Taula M.1. Solucions i material utilitzat per l'obtenció dels diferents teixits. Les sals utilitzades han sigut distribuïdes per la casa comercial *Sigma*.

4. ANTICOSSOS

Per detectar i localitzar la presència dels receptors d'adenosina en la NMJ del múscul LAL s'ha utilitzat la tècnica del Western blot i la immunohistoquímica. Pels estudis d'expressió i de localització d'alguns receptors s'han utilitzat dos anticossos de dues cases comercials diferents. En aquests casos, els dos anticossos han mostrat una marca forta i específica en la immunohistoquímica i han tingut el mateix patró de localització en la NMJ.

Pels estudis de Western blot i d'immunohistoquímica del receptor d'adenosina A_1 s'ha utilitzat l'anticòs policlonal desenvolupat en conill l'*anti-A₁ adenosine receptor AAR-006* d'*Alomone Labs*. Aquest anticòs s'ha obtingut del pèptid sintètic (c) KKVSASSGDPQKYYGKE que correspon als residus 213-229 d'humà localitzat en el tercer *loop* intracel·lular. S'ha reconegut una banda única amb un pes molecular de 35 kDa en el Western blot de lisats de cervell i fetge de rata (full tècnic de la casa comercial). El receptor A_1 s'ha localitzat en el còrtex, en el *septum* medial i en cultius de l'arrel dorsal dels ganglis (DRG de l'anglès *dorsal root ganglia*) (full tècnic de la casa comercial). **Carman i col·laboradors al**

2011 han usat aquest anticòs per detectar-lo en cèl·lules endotelials. A més, en aquesta tesi s'ha testat l'especificitat i s'ha utilitzat pels estudis d'immunohistoquímica l'anticòs policlonal de conill l'*anti-A₁ adenosine receptor AB1587P* de *Millipore*. Aquest anticòs s'ha obtingut de la seqüència que correspon al tercer domini extracel·lular (aminoàcid 163-176, GEPVIKCEFEKVIS) d'un gen de rata. Aquest anticòs s'ha usat extensament i ha sigut específicament caracteritzat per Western blot (**Lasley i cols., 2000**). Experimentalment, en les nostres mostres s'ha testat l'especificitat d'aquest anticòs i ha reaccionat amb el pes molecular pronosticat (*resultats no il·lustrats*). A més a més, l'especificitat de l'anticòs ha sigut testada per immunohistoquímica en teixit de cervell de *wild type* i d'*A₁^{-/-}* (veure el material suplementari de la **figura S1** de **Synowitz i cols., 2006**). Utilitzant aquest anticòs, el receptor *A₁* s'ha localitzat en neurones de l'hipotàlem (**Thakkar i cols., 2002**), en el múscul de l'ílium (**Vieira i cols., 2011**), en la micròglia de glioblastoma de ratolí (**Synowitz i cols., 2006**) i en l'uroepiteli de rata (**Yu i cols., 2006**).

Per detectar i localitzar el receptor *A_{2A}* s'ha utilitzat l'anticòs monoclonal de ratolí l'*anti-A_{2A} adenosine receptor 05-717* de *Millipore*. Aquest anticòs s'ha obtingut de la seqüència completa de l'epítip SQPLPGER en el tercer *loop* intracel·lular del receptor (clon 7F6-G5-A2). L'especificitat de l'anticòs ha sigut prèviament caracteritzada per Western blot en cervell de rata (una banda a 43 kDa), slot blot, immunohistoquímica en cèl·lules transfectades i en llesques de cervell de rata (**Rosin i cols., 1998**). També s'ha detectat per immunohistoquímica mitjançant microscòpia electrònica en l'estriat del gangli basal de primat (**Bogenpohl i cols., 2012**). Amb aquest anticòs no s'ha observat marca del receptor *A_{2A}* en teixits d'animals *knock out* (**Day i cols., 2003**).

Pel receptor *A_{2B}* s'han utilitzat dos anticossos policlonals de dues cases comercials diferents: un anticòs de conill l'*anti-A_{2B} adenosine receptor AB1589P* de *Millipore* i l'anticòs de cabra l'*anti-A_{2B} adenosine receptor N-19: sc-7506* de *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* tant pels estudis de Western blot com per la immunohistoquímica. L'anticòs de *Millipore* (*AB1589P*) s'ha obtingut de la seqüència d'aminoàcids que correspon al segon domini extracel·lular d'humà ATTNNCTEPWDGTTNES (dels aminoàcids 150-165). En estudis de RT-PCR s'ha trobat el receptor *A_{2B}* en el cervell (**Kataoka i cols., 2012**) i en el ronyó de rata (**Grgen i cols., 2007**). Aquest anticòs s'ha localitzat en les papil·les gustatives de ratolí (**Kataoka i cols., 2012**), en l'àrea CA1 de l'hipocamp de rata (**Zhou i cols., 2004**), en el plexe mientèric de rata (**Vieira i cols., 2011**). Aquest anticòs és específic, s'ha observat una única banda a 52 kDa en la medul·la i el còrtex renal (**Jackson i cols., 2002**) i en l'uroepiteli de rata

(Yu i cols., 2006). També s'ha reconegut una banda a 50-52 kDa en varis teixits: el timus, la placenta, el colon i l'intestí prim d'humans, de rata i ratolí. A més a més, s'ha trobat en la membrana de les cèl·lules musculars humanes (Lyngge i cols., 2000). L'anticòs A_{2B} de Santa Cruz (sc-7506) s'ha detectat una banda a 45 kDa en la línia cel·lular estable HEK-293T (de l'anglès *Human Embryonic Kidney 293 cells*) que expressa el receptor de l'hormona ghrelina (Carreira i cols., 2006). També s'ha trobat doble marca a 47 i 32 kDa en ronyó de rata degut a la glucosilació del receptor (Grden i cols., 2007). En el sistema nerviós central s'ha localitzat mitjançant immunohistoquímica en el còrtex i en el neocòrtex (Rosi i cols., 2004).

Pel receptor A₃ també s'han utilitzat dos anticossos policlonals de conill de dues cases comercials diferents: l'anticòs *anti-A₃ adenosine receptor AB1590P* de Millipore i l'anticòs *anti-A₃ adenosine receptor H-80: sc-13938* de Santa Cruz Biotechnology, Inc., pels estudis de Western blot i immunohistoquímica. L'anticòs de Millipore (AB1590P) s'ha localitzat en l'uroepiteli (Yu i cols., 2006), en neurones corticals (Rebola i cols., 2005b) i en l'hipocamp (Lopes i cols., 2003). En estudis de Western blot, s'ha trobat una única banda del receptor a 52 kDa en el còrtex i la medul·la de ronyó i a 38 kDa en l'extracte de ronyó (Grden i cols., 2007). Yu i cols. (2006) han observat dues bandes una a 36 i a 52 kDa en l'uroepiteli, molt probablement, l'espècie d'alt pes molecular representi la forma glucosilada del receptor A₃ (Jackson i cols., 2002). Tot i observar-se dues bandes aquest anticòs té una alta especificitat (Yu i cols., 2006). L'anticòs del receptor A₃ de Santa Cruz (sc-13938) s'ha detectat una banda a 43 kDa en lisat cel·lular (full tècnic de la casa comercial), s'ha localitzat i expressat en cèl·lules de glioblastoma multiforme en cervell humà (Quezada i cols., 2013) i en cèl·lules de intestí de ratolí (full tècnic de la casa comercial).

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

5.1 Fonament teòric

La tècnica d'electroforesi conjuntament amb el Western blot ens permet la detecció específica de proteïnes d'un extracte tissular, com per exemple, un homogenat. En l'electroforesi es separen les proteïnes en un gel de poliacrilamida segons el seu pes molecular. A continuació, les proteïnes es transfereixen a una membrana de PVDF (de l'anglès *polyvinylidene difluoride*) o de nitrocel·lulosa amb l'aplicació d'un camp elèctric perpendicular al gel. Posteriorment, es realitza la detecció de la proteïna mitjançant la incubació de les

membranes amb anticossos específics i es visualitza, normalment, a través d'un sistema de quimioluminescència o fluorescència. Aquesta tècnica consta de diferents passos que s'explicaran a continuació:

5.1.1 Electroforesi SDS-PAGE

Hi ha moltes molècules, com per exemple les proteïnes, que tenen la propietat de tenir càrrega elèctrica, magnitud de la qual depèn de cada molècula, del pH, i de la composició del medi en el que estan dissoltes. El principi de l'electroforesi utilitza aquesta propietat; a les molècules, se'ls hi aplica un camp elèctric i migren en solució cap l'elèctrode de polaritat oposada.

L'electroforesi es realitza sobre un suport sòlid com el gel de poliacrilamida. Es formen amb facilitat mitjançant la polimerització de l'acrilamida. Depenent de les concentracions d'acrilamida i metilacrilamida (reactiu que estableix els enllaços creuats entre diferents molècules d'acrilamida) es poden aconseguir diferents mides de porus. La seva composició consta d'una barreja d'acrilamida/bisacrilamida que forma una matriu tridimensional, el tampó TRIS, el dodecilsulfat sòdic (SDS de l'anglès *sodium dodecyl sulfate*), el persulfat d'amoni (APS de l'anglès *ammonium persulfate*) i el TEMED (nomenclatura, *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*). Aquest dos últims, el TEMED (agent reductor) i l'APS (agent oxidant) són catalitzadors de la reacció que fan que polimeritzi i gelifiqui el gel. L'SDS interacciona amb les proteïnes, i per les seves propietats fa que la separació d'aquestes sigui només depenent del pes molecular. En aquest treball s'ha realitzat l'electroforesi SDS-PAGE (de l'anglès *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; **Laemmli, 1970**). Consta d'un sistema de dos gels i dos tampons de diferents proporcions de poliacrilamida i de pH: el gel acumulador o concentrador i el gel separador. El gel acumulador presenta una proporció més baixa d'acrilamida (5%) i un pH més baix (pH 6.7). És el gel més superficial i és on es troben els pous per carregar les mostres. La seva funció és acumular i alinear les proteïnes, per a que comencin a migrar des d'una mateixa posició i al mateix temps abans d'entrar en el gel separador i evitar les diferències temporoespacials de les diferents mostres. Per un altre banda, el gel separador té un pH més alt (pH 8.8) i la proporció d'acrilamida és variable depenent del pes molecular de la proteïna d'interès que es vol separar. Si són proteïnes de pes molecular baix (10-20 kDa), es pot fer servir un gel amb una proporció d'acrilamida més elevada (12-15%). En canvi, per a proteïnes de pesos moleculars més alts (100-200 kDa), la proporció d'acrilamida serà més baixa (7-8%). D'aquesta forma es tindrà el porus més gran i

la proteïna podrà baixar més ràpidament. Per tant, en funció del % d'acrilamida es determinarà la mida del porus. Al passar pel gel concentrador, els ions del tampó adopten la seva forma sense càrrega, pel que els anions macromoleculars proteics migren més ràpidament fins al gel separador, evitant la possibilitat d'artefactes degut a la mida dels pouets i al volum de la mostra aplicada. Per a controlar el pH i la força iònica, durant l'electroforesi el gel ha d'estar saturat amb un tampó. La corrent entre els elèctrodes serà conduïda per les molècules de la mostra i els ions del tampó de suport. El tampó escollit ha de permetre que els components que es desitgin separar presentin una càrrega global positiva o negativa, de tal forma que es dirigeixin cap a l'ànode o el càtode mentre que discorre l'electroforesi. Quan se li afegeix l'SDS a les mostres, les proteïnes es desnaturalitzen (en el cas de les proteïnes oligomèriques es separen per subunitats) i a més a més, té la capacitat d'unir-se una molècula d'SDS cada dos residus d'aminoàcids, per lo que les proteïnes adquireixen una gran càrrega negativa i una relació carrega/massa constant. Per a la correcta desnaturalització de les mostres, també se li afegeix 2-mercaptoetanol que redueix els ponts disulfur de les proteïnes. En aquestes condicions desnaturalitzants, la mobilitat electroforètica és inversament proporcional a la mida de la proteïna o pèptid.

5.1.2 Transferència

Una vegada les proteïnes s'han separat en el gel de poliacrilamida segons els seu pes molecular, el següent pas és la transferència o Western blot. Consisteix mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric, en la mobilització de les proteïnes del gel de poliacrilamida a una membrana sintètica normalment de PVDF o bé de nitrocel·lulosa que servirà com a suport, permetent l'accessibilitat de l'anticòs determinat per la seva posterior immunodetecció.

El desavantatge de les membranes de nitrocel·lulosa és que algunes proteïnes no s'uneixen covalentment i són molt fràgils. En canvi, les de PVDF tenen una alta capacitat d'unió a les proteïnes, són químicament estables i es poden tenyir amb *Comanssie blue* cosa que les de nitrocel·lulosa no ho permeten (Kurien i Scofield, 2006). Per aquesta raó, en aquest treball s'ha utilitzat les membranes de PVDF.

En totes les electroforesis i transferències realitzades en aquesta tesi s'ha utilitzat el sistema *Mini Protean 3* (MP-3) de *BioRad* perquè és fàcil de manipular i permet treballar a volums petits (10-50 µl).

5.1.3 Immunodetecció

Un cop transferides les proteïnes es bloqueja la membrana per evitar les unions inespecífiques amb una solució de bloqueig que conté també TRIS (TBS de l'anglès *TRIS Buffered Saline*) amb *tween* al 0.1% (TBS_{-0.1%}) i llet desnatada en pols al 5% durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació. La detecció de les proteïnes d'interès a la membrana s'obté amb la incubació de l'anticòs primari, que s'uneix específicament a la proteïna. Després, s'incuba amb l'anticòs secundari vinculat a l'enzim peroxidasa de rave (HRP de l'anglès *horseradish peroxidase*) que reconeixerà l'espècie de l'anticòs primari i s'unirà a ell, i ens donarà un senyal quimioluminiscent. Per últim, es procedeix al revelat afegint a la membrana la solució quimioluminiscent *ECL* (*ECL select TM Western Blotting Detection Reagent*). Aquesta solució està composta per una barreja de luminol i un potenciador de la senyal, que interaccionen amb l'HRP de l'anticòs secundari mitjançant una reacció enzimàtica d'oxidació i donarà un producte oxidat i l'emissió de llum, que són les bandes que s'observaran pel sistema de detecció *BioRad Versa Doc* mitjançant quimioluminiscència. Aquesta tècnica permet determinar la presència o no de proteïna d'una mostra determinada, fer determinacions semi-quantitatives, observar canvis d'expressió i fosforilació, i per últim determinar l'especificitat dels anticossos utilitzats.

5.2 Detecció dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ mitjançant l'electroforesi i el Western blot

5.2.1 Obtenció del lisat de proteïna i determinació de proteïna total

Per poder confirmar la presència dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ de forma qualitativa i quantitativa en el múscul esquelètic LAL, s'han utilitzat homogeneïtzats de múscul LAL de nadó de P6-P7 i d'adult de P30-P45, de cervell i medul·la espinal adulta. El cervell i la medul·la espinal adulta s'han utilitzat com a controls positius. L'obtenció dels diferents teixits s'han explicat anteriorment a l'apartat 3. *Obtenció de mostres*. Els teixits s'han homogeneïtzat per separat de forma mecànica amb un homogeneïtzador manual de vidre i amb l'ajuda del tampó d'homogeneïtzació (proporció: 20% w/v; veure composició del tampó en la [taula M.2](#)). L'homogenat s'ha centrifugat a 4000 g durant 5 minuts, per poder separar els components de la matriu extracel·lular de les restes cel·lulars no homogenades. En aquest cas, s'ha descartat el precipitat, i s'ha tornat a centrifugar el sobrenedant a 15.000 g durant 15 minuts amb una ultracentrífuga. Posteriorment, s'ha descartat el precipitat i amb el sobrenedant

obtingut, que conté les proteïnes d'interès, s'ha quantificat la quantitat de proteïna total de la mostra.

Per determinar la concentració de proteïna total s'ha seguit el protocol del mètode *DC Protein Assay de BioRad*, que és un assaig colorimètric utilitzat per la quantificació de proteïnes en mostres que s'han solubilitzat amb detergents on la reacció que es dona és similar al mètode de *Lowry (Lowry i cols., 1951)*. Per últim, s'ha llegit l'absorbància a 750 nm amb un espectrofotòmetre. Juntament amb la preparació de les mostres, s'ha fet una recta patró de concentració coneguda d'una solució d'albumina sèrica bovina (BSA de l'anglès *bovine serum albumin*; concentració 0 a 1 mg/ml de proteïna). Tant els patrons com les mostres s'han preparat per triplicat.

Solucions i material
Tampó de homogeneïtzació: TRIS 0.5 M (ajustat a pH 6.8), β-mercaptoetanol 10 mM, SDS 10%, EDTA 0.1 M, aigua bidestil·lada, glicerol 20%, Blau de bromofenol 0.006% i el Còctel inhibidor de proteases Còctel inhibidor de proteases: AEBSF 1.4 mM, aprotinina 0.8 μM, leupeptina 0.02 μM, bestain 0.04 μM, pepstantina A 0.015 μM i E-64 0.015 μM (1/10 w/v), <i>Sigma St Louis, MO</i> PBS (Solució de fosfat salí, ajustat a pH 7.4): KCl 2.7 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM, NaCl 140 mM i Na ₂ HPO ₄ 8.1 mM Albumina sèrica bovina (BSA) <i>Clarkburg MD</i> . Homogeneïtzador manual de vidre (Afora) Centrífuga i ultracentrífuga <i>Eppendorfs</i> i cubetes Material de dissecció Espectrofotòmetre i pipetes

Taula M.2. Solucions i material utilitzat per l'homogeneïtzació i la determinació de la concentració de proteïna.

5.2.2 Electroforesi

Una vegada coneguda la concentració de proteïna s'han preparat les mostres per realitzar l'electroforesi. La quantitat de proteïna total que s'ha utilitzat per detectar els diferents receptors purinèrgics és de 100 μg. Prèviament a carregar les mostres en el gel, s'ha afegit a les mostres tampó reductor SLB (de l'anglès *sample Laemmli buffer*) a una proporció 1:3, per facilitar la separació de les proteïnes gràcies a la seva composició (veure composició del SLB a la [taula M.3](#)). Aquest tampó conté diferents components com: el β-mercaptoetanol que trenca l'estructura terciària proteica trencant els ponts disulfur. L'SDS desnaturalitza i li confereix càrrega negativa proporcional al pes molecular i el colorant Blau de bromofenol, que ens permet seguir la migració de les proteïnes en el gel en forma d'una línia de front de color blau. A continuació, les mostres s'han desnaturalitzat amb calor (a 100°C durant 5 minuts) i s'han preparat els gels per l'electroforesi seguint el sistema MP-3 de *BioRad*. Pels receptors

purinèrgics, el percentatge de poliacrilamida que s'ha usat pel gel separador és del 10% i el del 5% pel gel acumulador (veure la composició dels gels de poliacrilamida a la [taula M.3](#)).

S'han realitzat diferents electroforesis per determinar els diferents receptors d'adenosina utilitzant els anticossos que es descriuran més endavant. Preparades les mostres i els gels, s'ha col·locat tot dins d'una cubeta d'electroforesi i s'han carregat les mostres en els pous dels diferents gels. S'han reservat tres pous en cada gel pels marcadors de pesos moleculars (marcador visible, màgic i dual) i un altre pou carregat amb SLB, com a control negatiu. Després, s'ha afegit el tampó d'electroforesi (SDS-PAGE) que afavoreix que les proteïnes corrin en el gel (mirar la composició de la solució i els marcadors de pesos moleculars a la [taula M.3](#)) i s'ha aplicat un camp elèctric fixant el voltatge a 90-100 mV fins que el front de càrrega ha arribat al final del gel. El temps que triga les mostres en baixar del gel dependrà del % de poliacrilamida i del voltatge aplicat (per exemple, per un gel al 8% d'acrilamida a un voltatge de 90 mV pot tardar 1 hora i 30 minuts).

5.2.3 Western blot

El següent pas que s'ha realitzat, és la transferència o Western blot on s'han transferit les proteïnes del gel d'acrilamida a membranes de PVDF, prèviament activades amb metanol, amb el mateix sistema MP-3 de *BioRad*. A continuació, s'ha mullat la membrana, els papers *whattmann* i les esponges amb tampó de transferència. Posteriorment, s'ha col·locat el gel de poliacrilamida en un suport porós segons el muntatge del "sandvitx" de transferència seguint les polaritats: el gel cap l'ànode (-) i la membrana el càtode (+). La disposició del "sandvitx" ha sigut la següent: la tapa negra foradada (ànode), l'esponja, el paper *wattmann*, el gel, la membrana de PVDF, el paper *wattmann*, l'esponja i per últim la tapa blanca foradada (càtode). S'ha introduït el "sandvitx" dins d'un altre suport seguint les polaritats. Finalment, s'ha col·locat tot en una cubeta d'electroforesi i s'ha afegit el tampó de transferència (veure la composició del tampó de transferència a la [taula M.3](#)). Per evitar l'escalfament del tampó durant el procés de la transferència, s'ha posat un bloc de gel fred així està en continua refrigeració, ja que el procés adquireix temperatura. La transferència s'ha realitzat a un amperatge constant de 225 mA/membrana i a voltatge variable durant 1 hora. Transcorregut aquest temps, s'ha desmuntat el "sandvitx" i s'ha obtingut la membrana a la que s'han transferit les proteïnes i amb la qual s'ha procedit la immunodetecció.

5.2.4 Immunodetecció

Prèviament a realitzar la detecció de les proteïnes transferides per evitar les unions inespecífiques dels anticossos, s'ha bloquejat la membrana de PVDF amb una solució de bloqueig que conté llet desnatada al 5% en TBS_{-10.1%} durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació constant (veure composició de la solució de bloqueig en la [taula M.3](#)). A continuació, s'han incubat les diferents membranes amb els anticossos primaris específics per a cada un dels receptors d'adenosina, a una dilució determinada durant tota la nit a 4°C i amb agitació constant. Després, s'ha realitzat la incubació de l'anticòs secundari vinculat a l'enzim HRP, que reconeixerà l'espècie de l'anticòs primari (durant 1 hora 30 minuts a temperatura ambient i amb agitació). Les dilucions que s'han utilitzat dels anticossos primaris i secundaris (detallades a les [taules M.5 i M.6](#)) s'han preparat amb la mateixa solució de bloqueig. Després de les incubacions dels anticossos, s'han fet cinc rentats de TBS_{-10.1%} de 5-7 minuts a temperatura ambient i amb agitació per eliminar l'excés d'anticòs que no s'ha unit. Seguidament, s'ha revelat la membrana amb el mètode *ECL* (*ECL select TM Western Blotting Detection reagent*), que és un mètode de detecció quimioluminiscent, i pel revelat s'ha utilitzat el processador d'imatges *VersaDoc 3000* (*BioRad, Hercules, CA, USA*).

5.2.5 Proteïnes de control de càrrega: actina i tubulina

Una vegada s'han revelat les membranes dels PIRs, per poder fer els estudis densitomètrics s'han incubat les membranes amb proteïnes de control de càrrega. Aquestes proteïnes s'expressen ubiquament, són estables, deriven de gens "housekeeping" i són àmpliament utilitzades en recerca ja que s'expressen en un ampli rang de teixits. Un exemple d'aquestes proteïnes són l'actina i la tubulina ([Eaton i cols., 2013](#); [Baumgartner i cols., 2013](#)). Concretament, aquestes proteïnes s'han utilitzat per normalitzar i garantir que s'ha agafat la mateixa quantitat de mostra, i per un altre banda, per corregir les aberracions de la pròpia tècnica com la transferència, l'eficiència del marcatge o la ràtio de la senyal/soroll ([Baumgartner i cols., 2013](#)). Per realitzar els controls de càrrega, primer s'han fet tres rentats amb TBS_{-10.1%} de 15 minuts i s'han tornat a bloquejar les membranes amb la mateixa solució de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient i amb agitació. A continuació, s'han incubat les mateixes membranes amb els anticossos de control de càrrega: l'actina o bé la tubulina depenent del pes molecular dels PIRs. Pels receptors A₁ i A_{2B} s'ha utilitzat l'actina (de pes molecular 45 kDa) i pel receptor A_{2A} i A₃ la tubulina (de pes molecular 55 kDa) durant 1 hora 30 minuts a temperatura ambient i amb agitació. Passat aquest temps, s'han incubat les

membranes amb els seus anticossos secundaris corresponents (l'HRP anti-cabra per l'actina i l'HRP anti-ratolí per la tubulina) a una dilució determinada (veure dilucions dels anticossos primaris i secundaris utilitzats a les [taules M.5 i M.6](#)) i s'han revelat amb el mètode *ECL* seguint el procediment comentat en l'apartat anterior.

5.2.6 Densitometria

Amb l'objectiu de realitzar els estudis quantitius per analitzar les densitats de les bandes i avaluar la quantitat relativa dels receptors d'adenosina en el múscul de nadó i d'adult, s'han agafat cinc experiments per separat. A continuació, s'han fet les mesures densitomètriques utilitzant el programa *MetaMorph Program i Microscopy Automation & Image Analysis Software (Molecular Device, LLC, US)*. S'han mesurat tres vegades les densitats òptiques de les bandes dels receptors purinèrgics i de les seves actines i tubulines corresponents, i s'han fet les ràtios de cada banda entre la seva actina o tubulina corresponent. Per últim, s'han calculat les diferents proporcions entre diferents mostres de la mateixa membrana com per exemple, les variacions relatives entre bandes P6 i P30 s'han calculat des de la mateixa imatge. Les dades s'han expressat com mitjana \pm SD (SD de l'anglès *standard deviation*). S'ha utilitzat el *software* estadístic *SPSS® v20* per analitzar els resultats. Les mitjanes entre dos grups s'han comparat usant el test no paramètric *Mann-Whitney* per a mostres independents. Per últim, el número de Western blots i per tant, d'experiments que s'han realitzat per cada un dels receptors d'adenosina ha sigut d'un mínim de 5.

5.2.7 Controls negatius

Per testar l'especificitat i descartar les unions inespecífiques dels anticossos secundaris s'han realitzat diferents controls negatius: (1) S'ha incubat la membrana amb presència de l'anticòs secundari i en absència del primari; (2) S'ha preincubat l'anticòs primari amb un excés del seu pèptid control (proporció: 5 vegades pèptid control: 1 vegada anticòs primari en pes) d'aquesta manera l'anticòs queda neutralitzat degut a la formació del complex: pèptid-anticòs. A continuació, s'ha incubat la membrana amb l'anticòs neutralitzat conjuntament amb els seus anticossos secundaris corresponents. Els pèptids que s'han utilitzat es mostren en la [taula M.7](#); (3) S'ha deixat un carril de la membrana carregat amb l'SLB i s'ha incubat amb els anticossos contra A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃ i amb els seus anticossos secundaris corresponents (*resultats no il·lustrats*). En cap cas, s'han observat reaccions creuades ni unions inespecífiques en els controls negatius (veure controls negatius del Western blot a les [figures R1-R3](#) de l'apartat 1 de *Resultats*).

Solucions i material
Solució de fosfat salí (PBS, ajustat a pH 7.4): KCl 2.7 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM, NaCl 140 mM i Na ₂ HPO ₄ 8.1 mM
Tampó reductor SLB (SLB 5X): TRIS 0.5 M ajustat a pH 6.8, SDS 10%, aigua bidestil·lada, glicerol 20%, Blau de bromofenol 0.006% i β-mercaptoetanol 10 mM
Gel separador (10% acrilamida): Acrilamida/bisacrilamida, TRIS 1.5 M ajustat a pH 8.8, SDS 10%, aigua bidestil·lada i APS 10% i TEMED 0.05%
Gel acumulador (5% acrilamida): Acrilamida/bisacrilamida, TRIS 0.5 M ajustat a pH 6.8, SDS 10%, aigua bidestil·lada, APS 10% i TEMED 0.08%
Tampó d'electroforesi: TRIS 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0.1% i aigua bidestil·lada
Tampó de transferència: TRIS 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v) i aigua destil·lada
Tampó de rentat TBS _{-0.1%} (ajustat a pH 7.4): TRIS Base 10 mM, NaCl 100 mM, aigua bidestil·lada i Tween 20 0.1%
Solució de bloqueig: llet desnatada 5 % en TBS _{-0.1%}
Marcadors de pesos moleculars: <i>Full Range Rainbow Molecular Weight Markers</i> (visible), el <i>MagicMarkTM XP Western Protein Standard</i> (marcador invisible) i <i>Precision plus ProteinTM Dual xtra Standard</i> (marcador dual)
Aparell d'electroforesi i transferència: sistema MP-3 de <i>BioRad</i>
Material de transferència (sandvitx): suport, esponges <i>spontex</i> , papers <i>wattmann</i> , membrana de PVDF (<i>Amersham-Pharmacia</i>), metanol i aigua bidestil·lada
<i>Roller</i>
Pipetes, tubs falcons i caixetes de plàstic

Taula M.3. Solucions i material utilitzat en l'electroforesi SDS-PAGE i Western blot.

Reactius	Casa comercial
TRIS Base (hidroxmetil aminometà)	<i>Sigma</i>
Dodecilsulfat sòdic (SDS)	<i>Sigma</i>
Glicina	<i>Sigma</i>
β-mercaptoetanol	<i>Sigma</i>
Blau de bromofenol	<i>Merck</i>
Persulfat d'amoni (APS)	<i>Sigma</i>
Còctel inhibidor de proteases	<i>Sigma</i>
TEMED (<i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>)	<i>Sigma</i>
<i>Full Range Rainbow Molecular Weight Marker</i>	<i>Amersham</i>
<i>MagicMarkTM XP Western Protein Standard</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Precision Plus ProteinTM Dual Xtra Standard</i>	<i>BioRad</i>
EDTA	<i>Sigma</i>
Glicerol	<i>Panreac</i>
Poliacrilamida	<i>Pronisa</i>
Metanol	<i>Merck</i>
Llet desnatada en pols	<i>Puleva</i>
KCl	<i>Sigma</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Sigma</i>
NaCl	<i>Sigma</i>
NaHPO ₄	<i>Sigma</i>
<i>Tween 20</i>	<i>BioRad</i>
<i>ECL select TM Western Blotting detection Reagent</i>	<i>Amersham</i>
Albúmina sèrica bovina (BSA)	<i>Sigma</i>

Taula M.4. Reactius utilitzats en la homogeneïtzació, determinació de proteïnes, en l'electroforesi SDS-PAGE i la tècnica del Western blot.

5.2.8 Controls positius

En tots els Western blots d'aquest treball s'han realitzat controls positius amb les mostres de cervell i medul·la espinal adulta, on s'ha carregat 100 µg de proteïna total (veure controls positius del Western blot a les **figures R1-R3** de l'apartat 1 de *Resultats*). Concretament, per l'anticòs del receptor A₃ de *Santa Cruz* (*sc-13938*) s'ha fet un control positiu utilitzant un extracte de lisat cel·lular (*resultats no il·lustrats*; veure la **taula M.7**).

Proteïna detectada	Anticòs primari	Casa comercial	Dilució
A ₁ R	Anticòs policlonal de conill	AAR-006, Alomone Labs	1:5000
A _{2A} R	Anticòs monoclonal de ratolí	05-717, Millipore	1:2000
A _{2B} R	Anticòs policlonal de conill	AB1589P, Millipore	1:500
A _{2B} R	Anticòs policlonal de cabra	N-19: sc-7506, Santa Cruz	1:500
A ₃ R	Anticòs policlonal de conill	AB1590P, Millipore	1:500
A ₃ R	Anticòs policlonal de conill	(H80): sc-13938, Santa Cruz	1:500
Actina	Anticòs policlonal de cabra	4969, Cell signalling	1:100.000
Tubulina	Anticòs monoclonal de ratolí	T 4026, Sigma	1:80.000

Taula M.5. Anticossos primaris utilitzats per l'electroforesi SDS-PAGE i el Western blot.

Anticòs secundari	Casa comercial	Dilució
Peroxidasa de rave contra conill	11-035-152, Jackson Immuno-Research	1:10.000
Peroxidasa de rave contra ratolí	A-9044, Sigma	1:10.000
Peroxidasa de rave contra cabra	R-21459, Molecular Probes	1:10.000

Taula M.6. Anticossos secundaris utilitzats per l'electroforesi SDS-PAGE i el Western blot.

Receptor	Casa comercial
A ₁	AG213-229, Alomone Labs
A _{2A}	AG285, Millipore
A _{2B}	AG292, Millipore
A _{2B}	sc-7506, Santa Cruz
A ₃	sc-2293, Santa Cruz

Taula M.7. Peptids utilitzats com a controls negatius i positius en el Western blot i en les immunohistoquímiques.

6. TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL PER FLUORESCÈNCIA

6.1 Fonament de la tècnica

La tècnica de la immunohistoquímica permet realitzar estudis estructurals, morfològics, d'identificació i de localització cel·lular de proteïnes en cultius o bé en teixits. La immunohistoquímica consisteix en la utilització d'anticossos específics per detectar antígens en un tall o secció de teixit biològic. Els anticossos poden ser monoclonals i policlonals, els primers són monoespecífics per un únic epítop antigènic i per tant, es considera que són més específics per l'antigen diana que els anticossos policlonals. Els anticossos policlonals són una barreja complexa i heterogènia d'anticossos, generalment purificada a partir del sèrum, que reconeixen a diferents porcions d'un antigen (epítops). La visualització del complex antigen-anticòs pot ser pel mètode directe o indirecte. En els experiments d'aquest treball s'ha escollit el mètode indirecte, utilitzant anticossos secundaris units a fluorocroms que reconixeran específicament a l'anticòs primari i donaran la senyal. Els avantatges d'aquest mètode són que té major nivell de sensibilitat i que genera una senyal més intensa. La màxima immunoreactivitat de l'anticòs primari es manté ja que no està marcat. Els desavantatges són que pot haver-hi unions no específiques de l'anticòs secundari i que pot donar soroll de fons. L'ús d'anticossos secundaris requereix passos addicionals de bloqueig i de controls.

Els fluorocroms són grups funcionals que són excitablem a una longitud d'ona determinada i que emeten llum a una longitud d'ona major. Existeix un gran ventall de fluorocroms que permeten la possibilitat de combinar-los de forma simultània; així podrem determinar la localització de la proteïna d'estudi en diferents compartiments cel·lulars i detectar-la amb l'ajuda d'un microscopi de fluorescència o confocal. S'ha de tenir en compte la longitud d'ona i l'espècie de la qual s'han obtingut els anticossos utilitzats, per evitar el solapament dels colors i les reaccions creuades. Aquesta tècnica ens permetrà marcar diverses proteïnes amb diferents colors i visualitzar-les conjuntament. Aquesta característica permetrà estudiar la localització, la proximitat, i fins i tot, la colocalització dels receptors d'adenosina conjuntament amb els marcadors sinàptics més comuns en la NMJ a través del triple marcatge.

6.2 Localització dels components de la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica convencional

En primer lloc, per poder conèixer la localització dels receptors d'adenosina en els components de la NMJ és necessari localitzar les tres cèl·lules que conformen la NMJ. D'una manera il·lustrativa, i tal com es mostra en la **figura M.3**, s'han marcat les proteïnes específiques (la syntaxina, l'S-100 i els receptors d'acetilcolina) presents en els tres elements que conformen la NMJ per tal de visualitzar-les conjuntament. Aquesta localització s'ha fet mitjançant la tècnica de la immunohistoquímica convencional per triple marcatge amb el múscul esquelètic LAL. Una vegada s'ha extret el múscul LAL de nadó i d'adult (veure apartat 3.1), el paquet muscular s'ha fixat amb paraformaldehid al 4% diluït en PBS. A continuació, s'han realitzat tres rentats de 5 minuts amb PBS i s'ha incubat amb glicina 0.1 M durant 30 minuts per aturar la reacció del fixador i bloquejar els grups aldehids que puguin quedar lliures. Seguidament, mentre es fan els rentats i la incubació amb la glicina, s'ha procedit a la separació i a l'extracció de les capes més superficials, sota lupa i amb estisores, fins arribar a l'última capa que és la del múscul LAL.

Una vegada el múscul s'ha aïllat, fixat i és lliure de teixit connectiu, s'ha procedit a la realització del protocol de la immunohistoquímica. En primer lloc, s'ha permeabilitzat i bloquejat les unions inespecífiques del múscul amb la preincubació d'una solució de Tritó X-100 al 1% i BSA al 4% dissolt en PBS a 4°C durant tota la nit. Passat aquest temps, s'ha incubat la mostra tota la nit a 4°C amb els diferents anticossos primaris en la mateixa solució de bloqueig i permeabilització utilitzada en el primer pas. Concretament, s'ha marcat de forma específica i simultània: el terminal nerviós, la cèl·lula Schwann i els receptors d'acetilcolina (AChR de l'anglès *acetylcholine receptor*). El terminal nerviós s'ha marcat amb l'anticòs monoclonal de ratolí contra la syntaxina. És una proteïna que es troba situada en la membrana de les vesícules d'acetilcolina que estan llestes per ser alliberades, una vegada ha arribat el potencial d'acció al terminal nerviós. La cèl·lula de Schwann s'ha marcat amb un anticòs monoclonal de conill l'anti-S-100. L'S-100 és una proteïna que pertany a la superfamília de proteïnes d'unió al Ca^{+2} , que poden regular diverses funcions cel·lulars incloent la comunicació intercel·lular, el creixement i l'estructura cel·lular així com, el metabolisme i la transducció de senyals intracel·lulars (**Zimmer i cols., 1995**). A continuació, s'ha incubat durant 4-6 hores a 4°C amb els anticossos secundaris que són específics contra l'espècie que s'ha obtingut l'anticòs primari i que a més a més, estan conjugats amb un fluorocrom que ens donarà la marca fluorescent i que permetrà visualitzar els components de la NMJ. Els anticossos

secundaris utilitzats per visualitzar les proteïnes d'interès són l'Alexa fluor 488 que reconeixerà i s'unirà a l'anticòs anti-sintaxina i marcarà el recorregut axonal de color verd, l'Alexa fluor 647 que reconeixerà i s'unirà a l'anticòs anti-S-100 i que ens detectarà la cèl·lula de Schwann de color blau. El component postsinàptic es marcarà de color vermell amb una toxina, que s'anomena alfa bungarotoxina (α -BTX de l'anglès *alpha bungarotoxin*) conjugada amb tetrametilrodamina (TRITC de l'anglès *tetramethylrhodamine*), que s'unirà irreversiblement als nAChRs i per tant, ens permetrà detectar les zones d'innervació. Els anticossos primaris, secundaris i la toxina α -BTX-TRITC que s'han utilitzat es mostren en la **taula M.8**. Després de les incubacions dels anticossos primaris i secundaris, s'han fet tres rentats de 10 minuts amb PBS amb agitació i a temperatura ambient, per eliminar l'excés d'anticòs que no s'ha unit a la mostra i evitar les interferències. En el cas dels rentats de l'anticòs secundari s'ha fet a la foscor per evitar la pèrdua d'intensitat de fluorescència. Per últim, s'han muntat les mostres amb un medi de Mowiol amb p-fenilediamina per prolongar la marca fluorescent. Les mostres s'han deixat reposar un temps prudencial per després ser visualitzades amb un microscopi làser *scanning confocal Nikon (TE 2000-E)*.

En la **figura M.3** es mostren uns exemples de les tres cèl·lules que formen la NMJ en el múscul LAL de nadó i d'adult, mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica convencional per fluorescència amb triple marcatge. S'observa com l'axó (component presinàptic, en color verd), fa contacte amb el component postsinàptic on s'han marcat els AChRs, en color vermell. En blau, s'observa com l'anticòs anti-S-100 es localitza per damunt de la sintaxina recobrint l'axó per tant, ens donarà la localització de la cèl·lula de Schwann mielògena, i com la cèl·lula de Schwann terminal envolta aquesta unió. Concretament, en la primera imatge (**figura M.3A**) es pot veure com múltiples axons innerven en la mateixa placa motora, indicant que és una sinapsi en desenvolupament (P6). A diferència de la sinapsi P6, en la segona immunohistoquímica (**figura M.3B**) el miòcit està innervat per un sol axó, indicant una sinapsi adulta. A més a més, en la primera imatge s'observa com els AChRs estan distribuïts uniformement en tota la placa motora, donant lloc, a una sinapsi immadura. I en l'última imatge, es mostra la placa motora amb una estructura molt més definida i ordenada, gràcies a la formació dels plecs secundaris dels AChRs en una sinapsi madura.

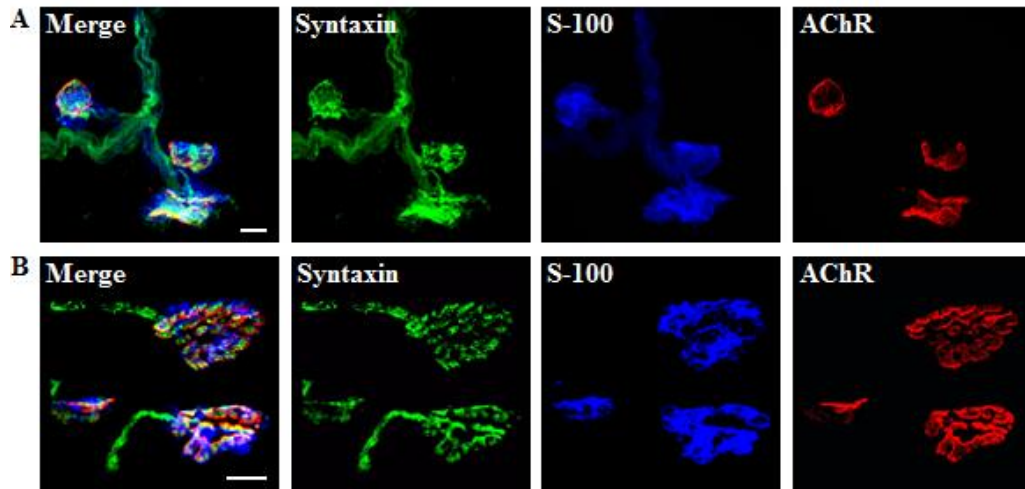


Figura M.3. Exemples d'immunohistoquímiques convencionals del múscul LAL de nadó i d'adult. Immunolocalització de la NMJ neonatal (A) i adulta (B) per triple marcatge. S'ha marcat en tots els casos: el component presinàptic amb la syntaxina (de l'anglès *syntaxin*, en verd), la cèl·lula de Schwann amb l'S-100 (en blau) i el component postsinàptic (receptors d'acetilcolina, AChRs) en vermell amb la toxina α -bungarotoxina conjugada amb TRITC (α -BTX-TRITC). La primera columna correspon a la imatge colocalitzada (*merge*) dels tres components que conformen la NMJ. Barra d'escala: 10 μ m.

6.3 Procediment de la localització dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 en la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica convencional

Per l'estudi de la localització dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 , s'ha realitzat immunohistoquímica per triple marcatge en el múscul esquelètic LAL de nadó i d'adult. La finalitat de realitzar triple marcatge és poder colocalitzar, de forma simultània, la nostra proteïna d'interès amb els components de la NMJ i així, poder estudiar-ne la seva localització. El procés d'extracció, fixació, permeabilització i bloqueig de les unions inespecífiques que s'ha seguit és el mateix que s'ha explicat anteriorment en l'apartat 6.2. Els receptors purinèrgics (A_1 , A_{2A} , A_{2B} o bé A_3) s'han detectat amb els seus anticossos específics conjuntament amb l'anti-S-100 o bé l'anti-syntaxina i els AChRs. Finalment, s'ha incubat amb els anticossos secundaris que reconeixeran i s'uniran als primaris. En aquest cas s'ha marcat de la següent manera: els receptors purinèrgics amb l'Alexa fluor 488 (en color verd), l'anti-S-100 o bé l'anti-syntaxina amb l'Alexa fluor 647 (en color blau). Per últim, els AChRs s'han marcat amb l' α -BTX-TRITC (en color vermell) durant la incubació dels anticossos secundaris. Les dilucions dels anticossos primaris i secundaris emprades es resumeixen en la [taula M.8](#).

Proteïna detectada	Anticòs primari	Casa comercial	Dilució
A ₁ R	Anticòs policlonal de conill	ARR-006, Alomone Labs	1:100
A ₁ R	Anticòs policlonal de conill	AB1587P, Millipore	10 µg/ml
A _{2A} R	Anticòs monoclonal de ratolí	05-717, Millipore	0.2 µg/ml
A _{2B} R	Anticòs policlonal de conill	AB1589P, Millipore	1:50
A _{2B} R	Anticòs policlonal de cabra	N-19: sc-7506, Santa Cruz	1:100
A ₃ R	Anticòs policlonal de conill	AB1590P, Millipore	1:200
A ₃ R	Anticòs policlonal de conill	(H80): sc-13938, Santa Cruz	1:500
Sintaxina	Anticòs monoclonal de ratolí	S0664, Sigma	1:1000
S-100	Anticòs monoclonal de ratolí	Ab4066-500, Abcam	1:100
S-100	Anticòs monoclonal de conill	Z0311, Dako	1:1000

Anticòs secundari	Casa comercial	Dilució
Alexa Fluor 488 IgG d'ase contra-conill	A-21206, Molecular Probes	1:300
Alexa Fluor 488 IgG d'ase contra-cabra	A-1105, Molecular Probes	1:300
Alexa Fluor 488 IgG d'ase contra-ratolí	A-21202, Molecular Probes	1:300
Alexa Fluor 647 IgG d'ase contra-ratolí	A-31571, Molecular Probes	1:300
Alexa Fluor 647 IgG d'ase contra-conill	A-31573, Molecular Probes	1:300

Taula M.8. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en la immunohistoquímica convencional i d'alta resolució.

Material, reactius i solucions
PBS (Solució de fosfat salí, ajustat a pH 7.4): KCl 2.7 mM, KH ₂ PO ₄ 1.5 mM, NaCl 140 mM i Na ₂ HPO ₄ 8.1 mM
Paraformaldehid 4% (Sigma) diluït en PBS
Glicina 0.1 M
Solució de permeabilització i bloqueig: Tritó 1% + BSA 4% en PBS
Anticossos primaris i secundaris (mirar la taula M.8)
Tritó X-100 (Sigma)
Tetrametil rodamina (TRITC) (715-025-151, Molecular Probes) dilució 1:800
Pinces, pipetes, eppendorfs i plaques de petri amb el fons de Sylgard
Portaobjectes (thermo scientific Mezel-Gläser)
Cobreobjectes (Hischmann Laborgenate)
Medi de muntatge Mowiol (4-88, Calbiochem) amb P-fenildiamina (Sigma)
Microscopi làser scanning confocal Nikon (TE 2000-E)

Taula M.9. Material, reactius i solucions utilitzades per la realització de la immunohistoquímica convencional.

Totes les sals utilitzades han sigut distribuïdes per la casa comercial de Sigma.

7. TÈCNICA D'IMMUNOHISTOQUÍMICA D'ALTA RESOLUCIÓ PER FLUORESCÈNCIA

7.1 Fonament teòric

Les tres cèl·lules que formen part de la NMJ (el terminal nerviós, la cèl·lula muscular i la cèl·lula de Schwann) estan íntimament juxtaposades només a uns nanòmetres de distància unes d'altres (**Lanuza i cols., 2007**). Degut a la proximitat d'aquests components i a la localització de la cèl·lula de Schwann terminal al voltant del terminal nerviós, ens pot emascarar les possibles localitzacions dels receptors d'adenosina en la NMJ. Per poder obtenir una localització cel·lular i subcel·lular específica i precisa d'aquestes molècules en la NMJ, és imprescindible poder discernir entre el component presinàptic i postsinàptic d'una forma clara i precisa, ja que ens ajudarà a entendre i a caracteritzar millor la seva funció. En aquest treball, amb l'objectiu de confirmar la presència dels receptors d'adenosina en els terminals nerviosos i de millorar la resolució de les imatges, en alguns casos i sempre que ha sigut necessari, s'ha realitzat la tècnica de la immunohistoquímica d'alta resolució mitjançant l'obtenció de talls transversals semifins en músculs LALs neonatals i adults (**Garcia i cols., 2005; Lanuza i cols., 2007**).

L'obtenció de talls transversals semifins consta de diferents passos, primer es realitza una immunohistoquímica convencional on es marquen les proteïnes d'interès, després es selecciona les àrees d'innervació visualitzant els nAChRs. A continuació, es deshidrata la mostra amb una bateria d'alcohols i cetones, i per últim, es fa una inclusió de la mostra amb resina *spurr* i s'obtenen talls transversals semifins de 0.5-0.7 µm de gruix amb un 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 *scanning confocal Nikon (TE 2000-E)*.

La immunohistoquímica de talls transversals semifins presenta una sèrie d'avantatges respecte altres tècniques que podríem haver utilitzat; per exemple, els talls transversals del múscul fixat amb respecte els inclosos per congelació (**Tokuyasu, 1973, 1980; Lafarga i cols., 1997**). El principal avantatge d'aquesta tècnica és que els talls són més fins (talls semifins d'un gruix de 0.5-0.7 µm) amb això s'augmenta la resolució. El fet de tindre talls transversals semifins ens permetrà visualitzar els tres components per separat, en un mateix pla, i de forma més precisa.

Aquesta tècnica ens garanteix l'antigenicitat respecte unes altres tècniques que s'hagi d'extreure la resina d'un tall abans de tenyir-lo. Això fa que s'hagi d'utilitzar solvents

agressius que fan perdre l'antigenicitat de moltes molècules, al no aguantar el procés d'extracció. En el nostre cas, al realitzar prèviament la immunohistoquímica, el procés d'inclusió fa que no afecti a l'antigenicitat (el múscul ja està marcat). A més, al no ser necessari el procés d'extracció de resina, minimitza la pèrdua de la molècula d'interès. En la **figura M.4** es mostra una imatge d'un tall transversal semifi (0.5 μm) d'una NMJ del múscul LAL, en aquest cas tenyit amb blau de metilè, en el es que pot observar de forma independent els tres components que conformen la NMJ (**Lanuza i cols., 2007, 2014**). Es pot visualitzar de forma precisa com els botons terminals (en color verd) es troben situats entre la cèl·lula de Schwann (en color blau) i els AChRs (en color vermell) indicant que els tres marcadors moleculars específics de les tres cèl·lules sinàptiques estan ben separades per aquest procediment (**figures M.4B-C**).

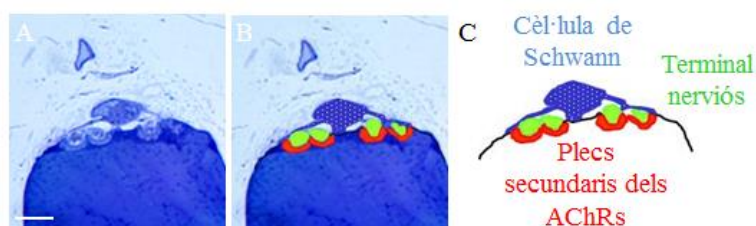


Figura M.4. Imatge de la unió neuromuscular d'un tall semifi tenyit amb blau de metilè. (A) Imatge d'un tall semifi de la NMJ tenyit amb blau de metilè. (B) Mateixa imatge que la primera on s'ha resseguit en blau la cèl·lula de Schwann, el terminal nerviós en verd i els plecs secundaris dels receptors d'acetilcolina (AChRs) en vermell. (C) Esquema dels tres components que conformen la NMJ representats en la segona imatge. Imatges obtingudes de la publicació de **Lanuza i cols. (2007, 2014)**. Barra d'escala: 10 μm .

7.2 Localització de les tres cèl·lules de la sinapsi neuromuscular per immunohistoquímica d'alta resolució

Per la localització de les tres cèl·lules que conformen la NMJ s'ha realitzat la combinació d'ambdues tècniques (la immunohistoquímica de fluorescència i l'obtenció de talls transversals semifins) per poder discernir entre el component presinàptic i postsinàptic. Aquesta tècnica consisteix en fer una immunohistoquímica convencional amb mostres senceres de LAL de nadó i d'adult. S'ha marcat el recorregut axonal amb l'anti-sintaxina, la cèl·lula de Schwann amb l'anti-S-100 durant una nit a 4°C. A continuació, s'ha incubat amb els anticossos secundaris corresponents on s'ha utilitzat l'Alexa fluor 488 (en verd) per marcar el recorregut axonal, l'Alexa fluor 647 (en blau) per localitzar la cèl·lula de Schwann i la toxina α -BTX-TRITC (en vermell) per identificar el component postsinàptic. Una vegada realitzada la

Capítol III. Material i Mètodes

immunohistoquímica convencional, les mostres s'han estirat sobre un portaobjectes amb PBS i amb l'ajuda del microscopi de fluorescència s'ha fet una selecció de les zones amb més contactes sinàptics, és a dir, s'ha tallat una secció (3 mm^2 , aproximadament) de la mostra del LAL on hi ha més quantitat de nAChRs. A continuació, cada tall seleccionat s'ha posat en un vial per mostra amb PBS. Seguidament, s'ha deshidratat la mostra amb incubacions de 10 minuts a temperatura ambient amb una bateria d'alcohols de menys a més proporció d'alcohol: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i l'últim pas d'aquest alcohols són tres incubacions de 10 minuts amb alcohol absolut (al 100%) (veure la preparació d'alcohols en la [taula M.10](#)). Per últim, s'han fet tres incubacions de 15 minuts amb acetona. El següent pas, és la preinclusió de resina *spurr* de la mostra. Consisteix en fer diferents incubacions disminuint la proporció d'acetona i augmentant la de resina lentament, fent incubacions d'1 hora 30 minuts a temperatura ambient i en agitació. La inclusió de resina en la mostra s'ha fet de forma progressiva, començant amb una proporció 3:1 (acetona: resina), després s'ha fet un altre incubació a una proporció 1:1. I per últim, s'han incubat les mostres amb una proporció 1:3 durant 1 hora a temperatura ambient i seguidament tota la nit a 4°C remenant. En acabar la preinclusió, on la resina s'ha introduït de forma progressiva i a poc a poc dins de la mostra, s'ha fet la inclusió amb resina pura. Els fragments de múscul LAL s'han incubat tres vegades amb resina *spurr* pura durant 2 hores cadascuna, a temperatura ambient i en agitació amb els vials destapats per a que s'evapori l'acetona que s'hagi pogut quedar durant el procés.

Finalitzada la inclusió de la mostra, el fragment del múscul s'ha orientat transversalment sota lupa en un motlle de silicona, sobre un llit de resina prèviament fet i s'ha cobert de resina *spurr*. A continuació, el motlle amb les mostres s'han col·locat en l'estufa a 60°C durant 48 hores per a que la resina es solidifiqui i formin els blocs. Transcorregut aquest temps, quan els blocs ja estan solidificats, els blocs s'han piramidat per l'extrem que conté el tros de múscul LAL i s'han realitzat seccions transversals semifines de $0.5\text{-}0.7 \mu\text{m}$ de gruix, amb el micròtom (*Reichert Ultracut E microtome, Leica Microsystems*). D'aquesta manera obtenim les tres cèl·lules situades en un pla. Els talls semifins resultants s'han col·locat en portaobjectes i s'han observat mitjançant el microscopi làser *scanning confocal Nikon (TE 2000-E)*. (El material i solucions utilitzades per l'obtenció de talls semifins es mostren en les [taules M.10](#) i [M.11](#)).

En la [figura M.5](#), es mostra un exemple del tipus d'imatge que s'obté amb aquest tipus de tècnica. Es mostra els tres components de la NMJ en un tall transversal semifí d'un múscul esquelètic LAL de nadó i d'adult. Podem distingir com entre la cèl·lula de Schwann (en blau) i la cèl·lula muscular (en vermell), es troben els botons terminals (en verd) fent contacte

amb la membrana postsinàptica dels miòcits. Els tres fluorocroms queden perfectament ben separats augmentant la resolució de la imatge on s'observen escassos o nuls punts de coincidència entre ells. Els anticossos utilitzats són els mateixos que en la immunohistoquímica convencional i es mostren en la [taula M.8](#).

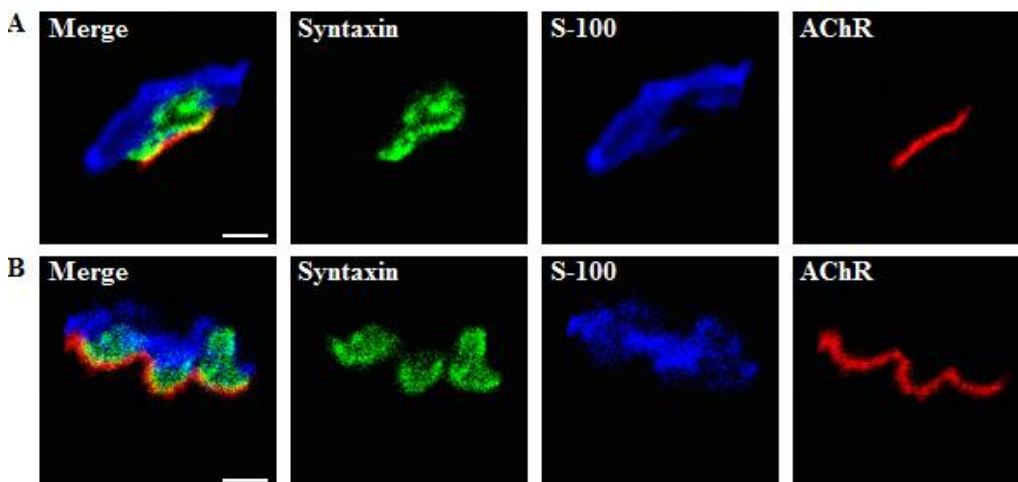


Figura M.5. Exemple d'una unió neuromuscular neonatal i adulta en una secció transversal semifina. Imatge d'un tall semif transversal realitzat en un múscul LAL neonatal (*A*) i adult (*B*). La primera columna és la imatge colocalitzada (*merge*) dels tres components que conformen la NMJ. En tots els casos, el terminal nerviós s'ha marcat amb la syntaxina (de l'anglès *syntaxin*, en verd), la cèl·lula de Schwann amb l'S-100 (en blau) i els AChRs amb l' α -BTX-TRITC (en vermell). Les imatges *A* i *B*, ens permeten veure de forma clara i precisa com els botons terminals es troben situats entre la cèl·lula muscular i la cèl·lula Schwann. Barra d'escala: 10 μ m.

7.3 Localització dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 en la sinapsi neuromuscular mitjançant immunohistoquímica d'alta resolució

En els estudis de localització dels receptors d'adenosina, amb l'objectiu de determinar de forma precisa i exacta la possible localització d'aquests receptors en la NMJ i evitar els punts de coincidència entre cèl·lules, sempre que ha sigut necessari, s'ha realitzat la immunohistoquímica d'alta resolució. Primer, s'ha realitzat una immunohistoquímica convencional com s'ha explicat anteriorment en l'apartat 6.3. Posteriorment, tal i com es mostra en l'apartat anterior s'ha procedit a seleccionar la zona amb més AChRs, a la deshidratació i a la inclusió amb resina *spurr*. Concretament en aquest cas, s'ha localitzat els receptors d'adenosina amb els seus anticossos específics conjuntament amb l'anti-S-100 o bé l'anti-syntaxina, i amb els marcatge dels receptors d'AChRs. Finalment, s'ha incubat amb els anticossos secundaris que reconeixeran i s'uniran als primaris, on s'ha marcat els receptors

Capítol III. Material i Mètodes

d'adenosina amb l'Alexa fluor 488 (en color verd), l'anti-S-100 o bé l'anti-sintaxina amb l'Alexa fluor 647 (en color blau). Els AChRs s'han marcat amb l' α -BTX-TRITC (en color vermell) durant la incubació dels anticossos secundaris. Les dilucions dels anticossos primaris i secundaris utilitzades es resumeixen en la **taula M.8**.

En tots els experiments d'immunohistoquímica realitzats s'han observat un mínim de sis músculs i 150 NMJ per cada receptor i edat. I sis músculs addicionals han sigut utilitzats com a controls negatius.

Material i solucions
PBS (Solució de fosfat salí, ajustat a pH 7.4): KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, NaCl 140 mM i Na_2HPO_4 8.1 mM
Alcohols al: 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i absolut al 100% (<i>Panreac</i>). Diluïts en aigua bidestil·lada
Acetona 100% ultrapura (<i>Panreac</i>)
Resines <i>spurr</i> (veure taula M.11)
Vials de vidre (Afora)
Motlle de silicona per fer els blocs (<i>Aname</i>)
Lupa
Estufa a 60°C.
Placa calefactora
Portaobjectes (<i>thermo scientific Mezel-Gläser</i>)
Micròtom (<i>Reichert Ultracut E microtome, Leica Microsystems</i>)
Microscopi làser <i>scanning confocal Nikon (TE 2000-E)</i>

Taula M.10. Material i solucions utilitzades per la realització de la immunohistoquímica d'alta resolució. Totes les sals utilitzades han sigut distribuïdes per la casa comercial de *Sigma*.

Reactiu	Casa comercial
ERL (vinil ciclohexenedioxid)	<i>Electron Microscopy Sciences</i>
DER (diglicidil èter polupropolè glicol)	<i>Electron Microscopy Sciences</i>
NSA (nonenil succínic anhidre)	<i>Electron Microscopy Sciences</i>
DMAE (dimetilamino etanol)	<i>Electron Microscopy Sciences</i>

Taula M.11. Resines *spurr* utilitzades per l'obtenció de blocs.

8. CONTROLS NEGATIUS PER LA IMMUNOHISTOQUÍMICA CONVENCIONAL I D'ALTA RESOLUCIÓ PER FLUORESCÈNCIA

Prèviament als experiments d'immunohistoquímica, s'han realitzat controls negatius per corroborar l'especificitat dels anticossos utilitzats i per tal de descartar les possibles unions inespecífiques dels anticossos primaris i les reaccions creuades que es puguin donar entre els anticossos primaris i secundaris. S'han realitzat diferents controls negatius:

1) S'ha avaluat la possible unió inespecífica de l'anticòs secundari a altres estructures de la NMJ. S'ha incubat el múscul LAL amb la presència dels anticossos secundaris i en absència dels anticossos primaris (*resultats no il·lustrats*).

2) S'ha fet una preincubació de l'anticòs primari amb un excés del seu pèptid de bloqueig (proporció 5 vegades pèptid control: 1 vegada anticòs primari) durant 2 hores a temperatura ambient o bé tota la nit a 4°C, donant lloc a la formació d'un complex pèptid-anticòs. A continuació, el múscul LAL s'ha incubat amb aquest complex format, seguint el procediment d'una immunohistoquímica convencional o d'alta resolució (*resultats no il·lustrats*). Els pèptids utilitzats es mostren en la **taula M.7**.

3) Per confirmar que no hi ha reaccions creuades entre els anticossos primaris i secundaris utilitzats s'han dut a terme els següents controls:

3.1) Com a controls negatius pels anticossos dels receptors desenvolupats en conill: A₁, A_{2B} de *Millipore (AB1589P)* i A₃ s'ha incubat el múscul LAL amb l'anticòs monoclonal anti-S-100 o l'anti-sintaxina desenvolupat en ratolí. També s'ha marcat el component postsinàptic amb l' α -BTX-TRICT, en vermell. Com anticossos secundaris s'han utilitzat l'Alexa 647 d'ase contra ratolí (que ens detectarà la marca positiva de l'S-100 o la sintaxina) i l'Alexa 488 d'ase contra conill (que ens donarà marca negativa pel/s receptor/s) (**figures M.6A i M.6C**).

3.2) Com a control negatiu per l'anticòs del receptor A_{2A} desenvolupat en ratolí s'ha incubat el múscul LAL amb l'anticòs monoclonal anti-S-100 desenvolupat en conill. Els AChRs s'han marcat en vermell amb l' α -BTX-TRICT. A continuació, s'ha incubat amb els anticossos secundaris l'Alexa 647 d'ase contra conill (que ens detectarà marca positiva per l'S-100) conjuntament amb l'Alexa 488 d'ase contra ratolí (que donarà marca negativa del receptor) (**figura M.6B**).

3.3) Com a control negatiu per l'anticòs del receptor A_{2B} desenvolupat en cabra de *Santa Cruz (sc-7506)*, també s'ha incubat el múscul LAL amb l'anticòs monoclonal anti-S-100 de conill. Com en els casos anteriors, també s'ha marcat el component postsinàptic amb l' α -BTX-TRICT, en vermell. Els anticossos secundaris que s'han utilitzat són l'Alexa 647 d'ase contra conill (que donarà marca positiva per l'S-100) conjuntament amb l'anticòs Alexa 488 d'ase contra cabra (que donarà marca negativa pel receptor) (**figura M.6C**).

En les imatges obtingudes dels controls negatius es mostra que els anticossos secundaris presenten especificitat única en vers al seu corresponent anticòs primari, i per tant no permeten reaccions creuades.

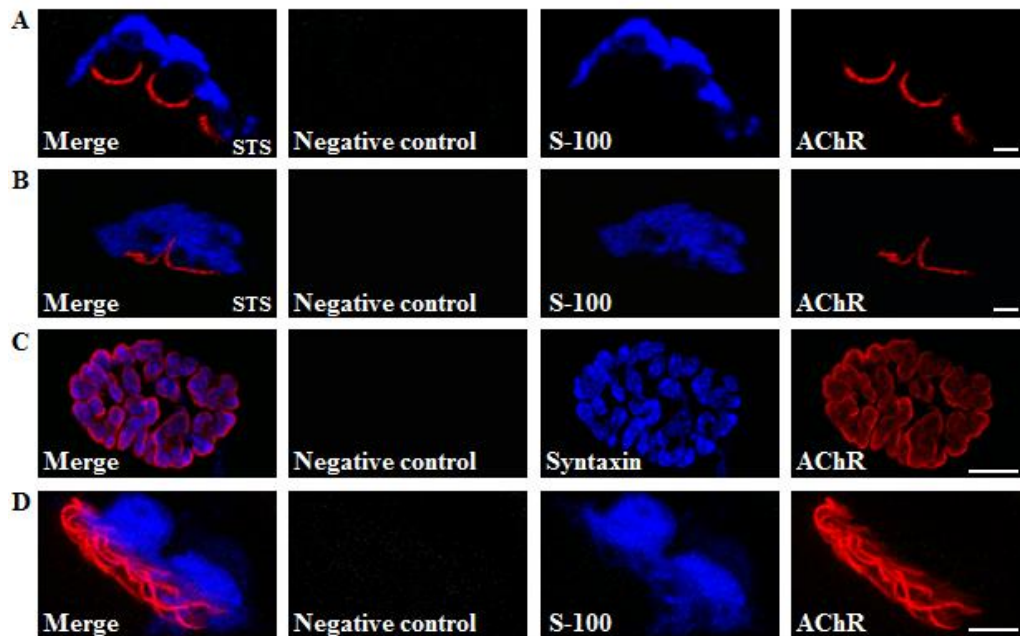


Figura M.6. Controls negatius amb la tècnica d'immunohistoquímica d'alta resolució i convencional en músculs LALs adults. Exemples de controls negatius dels receptors d'adenosina. A i B són immunohistoquímiques d'alta resolució (STS de l'anglès *semithin cross-section*) i les imatges C i D són immunohistoquímiques convencionals. (A i C) Control per l'anticòs d'ase contra conill conjugat amb l'Alexa 488. (B) Control per l'anticòs d'ase contra ratolí conjugat amb l'Alexa 488. (D) Control per l'anticòs d'ase contra cabra conjugat amb l'Alexa 488. En tots els casos els anticossos secundaris no reaccionen amb els altres anticossos utilitzats. Barra d'escala: 10 µm.

9. MICROSCÒPIA LÀSER CONFOCAL

Per poder visualitzar les immunohistoquímiques convencionals o d'alta resolució marcades mitjançant fluorescència, s'ha utilitzat un microscopi làser *scanning confocal Nikon (TE 2000-E)*. Les imatges s'han captat amb un objectiu de 63x o 100x d'1.4 d'obertura numèrica oil, (*UPlan-Apochromatic objective*). Els fluorocroms Alexa fluor 488 (verd), TRITC (vermell) i Alexa fluor 647 (blau) s'exciten seqüencialment amb les línies de 488 nm, 568 nm i 633 nm, respectivament, 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.

10. METODOLOGIA ELECTROFISIOLÒGICA

10.1 Fonament de la tècnica

L'electrofisiologia ens permet conèixer l'activitat iònica en el citoplasma dels miòcits en resposta a estímuls nerviosos. Es reproduïx "*ex-vivo in vitro*" la fisiologia neuromuscular mantenint el múscul LAL viu. Per tant, l'equip d'electrofisiologia en el model neuromuscular constarà d'una unitat estimuladora per a que provoqui un estímulo o generi un potencial d'acció i un equip que registri la resposta neuromuscular que es genera, que es comentarà més endavant. En tots els experiments realitzats, s'ha fet el registre intracel·lular on l'elèctrode s'introdueix en el citoplasma de la cèl·lula muscular i s'estudia la resposta evocada (EPPs) o l'espontània. L'EPP és el procés de l'intercanvi iònic postsinàptic desencadenat per la unió de l'acetilcolina amb els seus receptors. L'altre forma d'estudi d'activitat sinàptica és l'activitat espontània. De forma espontània apareixen EPPs en miniatura (mEPPs) a una freqüència de 60 per minut. L'estudi de l'activitat espontània no precisa del bloqueig de la contracció muscular ni l'activació del potencial d'acció axonal per part de la unitat estimuladora.

Els experiments d'electrofisiologia que s'han realitzat en aquest treball, ens permeten veure l'efecte dels receptors purinèrgics en la neurotransmissió i la funció que tenen els receptors purinèrgics com a neuromoduladors mitjançant l'ús d'antagonistes i agonistes. Així com, la relació d'aquests en diferents rutes i canals iònics, com els receptors mAChRs, PKA, PKC i VDCCs, tots ells en la NMJ adulta.

10.2 Preparació de la mostra pels estudis electrofisiològics

Tots els experiments d'electrofisiologia que s'han realitzat han sigut per registre intracel·lular i el model neuromuscular que s'ha utilitzat ha sigut el múscul LAL conjuntament amb el seu nervi. El procediment que s'ha seguit per l'extracció d'aquest múscul s'ha comentat en l'apartat 3.1. Concretament, pels estudis d'electrofisiologia, s'ha fet la dissecció del múscul LAL en una placa amb el fons de *Sylgard* contenint solució de Ringer. S'ha procedit amb molta cura de no lesionar el teixit fins arribar a l'última capa que és el LAL i aïllar el nervi que es troba molt pròxim al cartílag. Durant la dissecció es fan canvis molt freqüents de Ringer per evitar l'osmosi i durant el registre electrofisiològic cada 30 minuts, excepte en els experiments

d'activitat sinàptica que es fan canvis després de cada registre. Finalment, la mostra es col·loca en una camareta de registre (de volum 1.5 ml) que permet mantenir el múscul viu mitjançant un sistema de perfusió continu. L'orientació de la mostra en la camareta és de tal forma que l'orella queda orientada a la paret de la camareta i el nervi queda per sobre dels dos elèctrodes de platí (càtode positiu i el negatiu), incorporats a un extrem de la camareta, per on arriba l'estímul elèctric administrat (veure [figura M.7](#)). En experiments de freqüència d'estimulació a 1 Hz s'ha de procurar que el nervi quedi entre aquests dos elèctrodes per després poder fixar-ho amb vaselina i evitar la discontinuïtat, ja que és per on s'administrarà l'estímul elèctric. Pels experiments d'esgotament (trens d'estímul a 40, 100 Hz i facilitació) el nervi es succiona amb un elèctrode de succió, on simultàniament aquest elèctrode administra l'estímul elèctric.

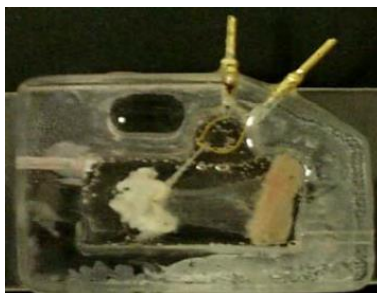


Figura M.7. Camareta de registre.

10.3 Mètodes de prevenció de la contracció

En els experiments d'electrofisiologia, prèviament a fer els registres controls és imprescindible bloquejar la contracció muscular natural. D'aquesta manera, es pot observar els EPPs quan se li aplica un estímul i es pot evitar ruptures anòmales de la membrana postsinàptica amb l'elèctrode de registre. Hi ha diversos mètodes que eviten la contracció:

1) Reduint l'alliberació de neurotransmissor modificant el medi extracel·lular amb baix Ca^{+2} o alt Mg^{+2} . Ambdós, interfereixen directament sobre la maquinària de la neurotransmissió. Concretament, a altes concentracions de Mg^{+2} o bé a baixes concentracions de Ca^{+2} es redueix l'alliberació d'acetilcolina. El Mg^{+2} és bivalent i competeix amb el Ca^{+2} durant la neurotransmissió (**Jenkinson, 1957; Kharasch i cols., 1981**). El Ca^{+2} intervé en la neurotransmissió ja que quan arriba el potencial d'acció s'activen els VDCCs fent que el Ca^{+2} entri dins de la neurona. El Ca^{+2} fa que les vesícules que contenen el neurotransmissor s'uneixin a la membrana cel·lular del terminal nerviós

alliberant l'acetilcolina a l'espai extrasinàptic, entre el terminal nerviós i la fibra muscular estriada.

2) *D-tubocurarine o curare* (0.7 μM). El *d-tubocurarine* s'extreu de la planta *strychnos o Chondrodendron tomentosum*, funciona com un agent bloquejador o un relaxant neuromuscular. El *d-tubocurarine* actua entre la unió del nervi i el múscul, bloquejant la transmissió dels impulsos nerviosos. Té la mateixa afinitat que l'acetilcolina, competeix amb ella per unir-se als nAChRs de les cèl·lules musculars. Quan el *d-tubocurarine* s'uneix enlloc de l'acetilcolina, els receptors no s'activen i hi ha una pèrdua de funció muscular, paràlisi inclús la mort per asfíxia. Per tant, el *d-tubocurarine* redueix la resposta postsinàptica a més d'influir sobre els receptors presinàptics nicotínics i muscarínics (Ferry i Kelly, 1988; Santafé i cols., 2006).

3) μ -conotoxina GIIIB (μ -CgTx GIIIB de l'anglès *μ -conotoxin GIIIB*, 1.5-3 μM). Aquesta neurotoxina prové dels cargols marins de la família *Conoidea*, en especial dels cargols del gènere *Conus* (López-Vera, 2010). La μ -CgTx GIIIB bloqueja selectivament els canals de sodi voltatge dependents musculars evitant la contracció, impeding la propagació del potencial d'acció axonal i permetent el registre de l'EPP mantenint la maquinària de neurotransmissió intacte.

4) N-benzil-p-toluè sulfonamida (BTS de l'anglès *N-benzyl-p-toluene sulphonamide*, 200 μM), hidrolitza els túbuls T del reticle sarcoplasmàtic evitant la contracció muscular i permetent el registre de l'EPP. Els túbuls T són els responsables de la contracció uniforme de cada fibra muscular esquelètica. Aquest sistema està constituït per una xarxa d'invaginacions tubulars de la membrana plasmàtica de la fibra muscular, on les branques envolten les unions de les bandes A i I de cada sarcòmer. Els túbuls T permeten que l'ona de despolarització, responsable de la contracció muscular, es distribueixi ràpidament des de la superfície cel·lular fins a l'interior del citoplasma arribant a cada miofibril·la. La despolarització de la membrana plasmàtica de la cèl·lula muscular que es propaga al llarg dels túbuls T, produeix l'obertura dels canals de Ca^{+2} cap al citosol.

5) La tècnica del "cut". Consisteix en tallar les fibres musculars a costat i costat de la principal branca nerviosa intramuscular on les fibres musculars queden parcialment despolaritzades amb la inactivació dels canals de sodi (Hubbard i Wilson, 1973; Santafé i cols., 2001, 2009).

Prèviament en el nostre grup, s'han realitzat experiments utilitzant dues tècniques diferents per evitar la contracció: el *cut* i l'addició de la μ -CgTx GIIIB en la mostra. En aquests experiments no s'han trobat diferències significatives entre els dos mètodes utilitzats. Només en la diferència de potencial de membrana on s'obtenen millors potencials de membrana amb l'addició de la μ -CgTx GIIIB que amb la tècnica del *cut* (Santafé i cols., 2009). Per aquestes característiques, perquè l'ús de la μ -CgTx GIIIB és menys laboriosa (ja que només cal afegir-la a la preparació), perquè és la més fisiològica i perquè és la que menys interfereix en la maquinària sinàptica escollim la μ -CgTx GIIIB com a mètode per prevenir la contracció.

Prèviament a iniciar els experiments pels receptors d'adenosina, s'ha realitzat un experiment control amb l'objectiu de confirmar que la μ -CgTx GIIIB bloqueja selectivament els canals de sodi voltatge dependents, paralitza el múscul, deixa la maquinària de la neurotransmissió intacte i no afecta a la neurotransmissió. En aquest estudi control, s'ha evitat la contracció amb la tècnica del *cut* amb un reforçament de BTS (200 μ M) per posteriorment poder incubar la preparació amb la μ -CgTx GIIIB, i poder estudiar el seu efecte en la neurotransmissió. En primer lloc, s'ha fet un registre control durant 1 hora amb Ringer normal. A continuació, s'ha incubat la preparació amb la μ -CgTx GIIIB (1.5-3 μ M), en presència de BTS durant 1 hora i en la tercera hora addicional s'ha fet el registre experiment. Experimentalment, aquest estudi control que s'ha realitzat mostra que la μ -CgTx GIIIB no afecta a cap paràmetre de la neurotransmissió (contingut quàntic, freqüència i amplada del mEPPs, curs del temps de l'EPP; % de variació del contingut quàntic 6.97 ± 3.58 , % de variació de la freqüència dels mEPPs: 7.20 ± 6.22) i no s'observen respostes dels EPPs properes a la saturació (donat que hi ha molt neurotransmissor alliberat en músculs tractats amb μ -CgTx GIIIB). Confirmant que la μ -CgTx GIIIB no afecta a la funció sinàptica en les nostres condicions experimentals.

En els experiments on s'ha utilitzat només la μ -CgTx GIIIB (1.5-3 μ M) per bloquejar la contracció s'ha afegit aquesta substància cada mitja hora alterna. En la majoria d'experiments per tal de reduir la quantitat de μ -CgTx GIIIB, durant la preincubació dels 30 minuts abans de realitzar el registre control i durant l'hora d'incubació de la substància purinèrgica s'ha afegit una barreja de μ -CgTx GIIIB (3 μ M) i BTS (200 μ M). Excepte, en els experiments d'activitat sinàptica on només s'ha utilitzat la μ -CgTx GIIIB (3 μ M).

10.4 Equip d'electrofisiologia

Les tècniques electrofisiològiques pretenen reproduir artificialment la resposta fisiològica d'un sistema en diferents condicions experimentals pel seu estudi. Per tant, en el model neuromuscular es necessitarà un equip que provoqui un estímul nerviós (unitat estimuladora) i un equip que registri (sistema de registre) aquesta resposta neuromuscular que es genera.

L'equip d'electrofisiologia consta de la unitat estimuladora, l'amplificador, la unitat aïlladora, la taula digitalitzadora i el sistema informàtic (*Axoscope 9.0*). La unitat estimuladora (*CS-20 Cibertec Stimulator*) està associada a una unitat d'aïllament d'estímul, i genera contínuament polsos de 1-10 V a una freqüència entre 0.5 i 100 Hz i amb una durada de 0.1-0.2 ms. L'administració de l'estímul és a través de l'elèctrode de platí que està en contacte amb el nervi del múscul. En el cas dels experiments d'activitat sinàptica, que es comentaran més endavant, es fa mitjançant succió. Concretament, es treballa a un voltatge determinat que ve donat pel llindar d'estímul (intensitat mínima per generar activitat elèctrica en la preparació neuromuscular). Per tal d'assegurar que la totalitat de les fibres responen a l'estímul aplicat, aquest llindar es multiplica per 3.

El sistema de registre intracel·lular consta: d'un elèctrode de registre, d'un elèctrode de referència, d'un amplificador i d'un sistema informàtic. L'elèctrode de registre que s'introdueix dins del citoplasma de la fibra muscular és un capil·lar de borosilicat (*GC150F-10, Harvard Apparatus Ltd.*, diàmetre intern 0.86 mm, diàmetre extern 1.5 mm) que conté una solució de KCl 3 M. L'obtenció de l'elèctrode de registre és mitjançant un *puller* (*Narishige, Japó*), que escalfa el capil·lar i l'estira formant dos elèctrodes de registre amb una punta fina de menys de 1 μm i d'una resistència de: 20-70 $\text{M}\Omega$ ideal pel registre intracel·lular. Aquest elèctrode està connectat a un amplificador (*Tecktronics, AMS02, Tektronix, Inc., Beaverton, OR, US*) per tal d'amplificar 10 vegades la senyal. L'elèctrode de referència és un filament de plata clorurat submergit en Ringer normal, col·locat a una distància petita de la preparació i està connectat amb el bany amb un pont d'agar (3.5% agar en 137 mM NaCl) (veure la composició de la solució a la [taula M.12](#)). Aquest elèctrode ens permetrà conèixer l'estat del medi extracel·lular per poder comparar-lo amb les modificacions del medi intracel·lular que es pretén valorar. Les senyals enregistrades es digitalitzen (*DIGIDATA 1322A, Interface, Axon Instrument Inc., Weatherford, TX, USA*), s'emmagatzemen i s'analitzen amb el *software Axoscope 9.0* (*Axon Instruments Inc.*) a l'ordinador. En tots els experiments, les senyals s'han filtrat tant per l'alliberació evocada com per l'espontània. Per a la neurotransmissió evocada ha

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'equip d'electrofisiologia es mostra en la **figura M.8**. Tot el sistema va ser muntat damunt d'una taula antivibratòria per minimitzar les possibles vibracions de l'entorn del treball i evitar pertorbacions mecàniques en l'elèctrode, situat a la vegada dins d'una caixa de *Faraday* construïda d'un material conductor per bloquejar les interferències elèctriques externes.

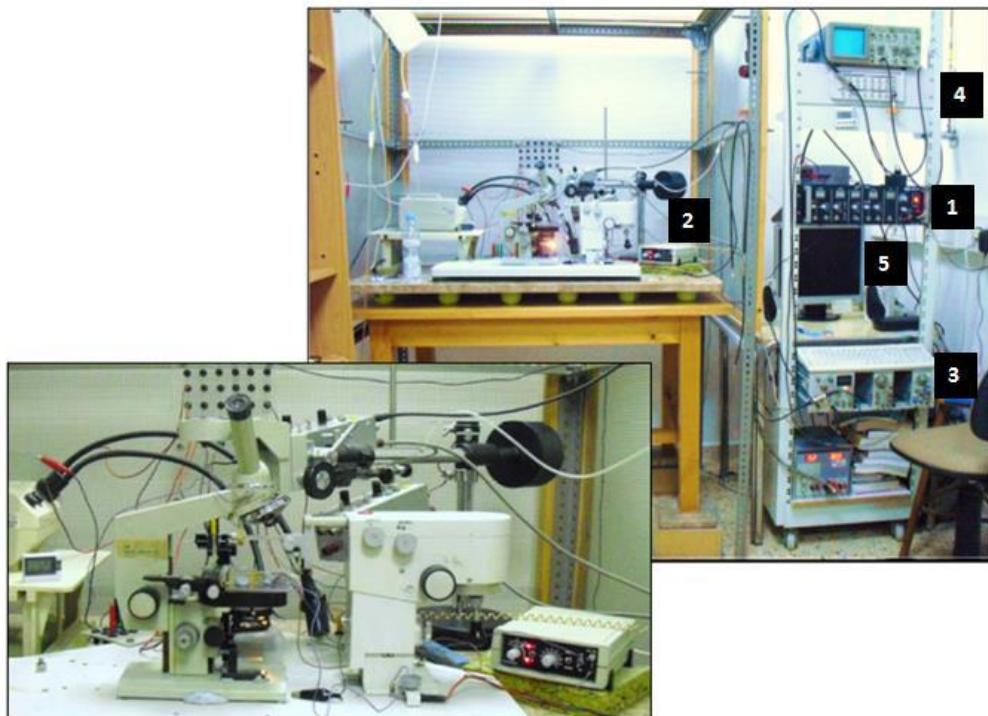


Figura M.8. Equip bàsic d'electrofisiologia de registre intracel·lular. Elements bàsics d'un equip d'electrofisiologia. 1) Unitat estimuladora; 2) Unitat aïlladora; 3) Amplificador; 4) Taula digitalitzadora; 5) Sistema informàtic (*Axoscope 9.0*).

10.5 Registre de la neurotransmissió

10.5.1 Neurotransmissió evocada

La neurotransmissió evocada parteix de l'administració d'un estímul (a 1 Hz) al nervi de la preparació neuromuscular i es registre a nivell de la cèl·lula postsinàptica. La resposta de la despolarització local de la membrana de la cèl·lula muscular és l'EPP. El registre de l'EPP té una forma molt característica. D'esquerra a dreta, consisteix en una línia de base que presenta

un pic de poca duració provocat per l'experimentador corresponent a "l'artefacte d'estímul elèctric". Seguit per un curt lapsus de temps d'1-2 ms, que s'anomena latència (**figura M.9**, *fletxa rosa*), s'observa una ona semblant a una paràbola de major duració mesurada en mV que puja fins a un màxim, en l'eix Y, i torna a baixar, corresponent a l'EPP. Per tant, l'EPP correspon al procés d'intercanvi iònic postsinàptic desencadenat per la unió de l'acetilcolina amb els seus receptors. L'amplada de l'EPP és la distància des de la base fins al punt màxim de l'EPP en l'eix de les Y (es mesura en mV, **figura M.9**, *fletxa blava*) i ens dóna informació de l'eficàcia sinàptica. Algun canvi en la latència ens indica que s'està produint canvi en la conducció de l'estímul.

En tots els experiments d'electrofisiologia per escollir la fibra adequada, s'ha observat el temps de pujada que és la pendent de l'EPP, és a dir, la distància des de la base on comença l'episodi fins el punt més alt mesurat en ms. Intentant que en cap cas superi 1.5 ms en els músculs adults. Ens dóna informació de la proximitat de l'elèctrode de registre a la placa motora.

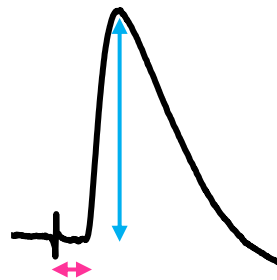


Figura M.9. Potencial de placa evocat. Esquema d'un EPP (de l'anglès *evoked endplate potential*). La distància des de l'artefacte d'estímul (que és l'ona petita que s'observa) fins l'inici del propi EPP és la latència (*fletxa rosa*). L'amplada és la distància des de la base fins al punt màxim de l'episodi (*fletxa blava*).

10.5.2 Neurotransmissió espontània

La neurotransmissió espontània són EPPs miniatura que apareixen de forma espontània a una freqüència mínima de 60 per minut. L'estudi dels mEPPs no precisa de bloqueig de la contracció ni de l'activació del potencial d'acció per part de la unitat estimuladora.

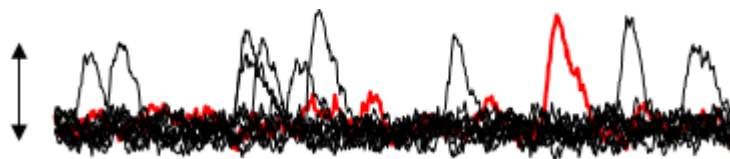


Figura M.10. Exemples dels potencials de placa miniatura (mEPPs de l'anglès *miniature endplate potential*). La *fletxa negra* indica l'amplada d'un dels mEPPs.

10.6 Depressió i facilitació. Registre de l'activitat sinàptica a 40 i 100 Hz

S'han realitzat experiments on s'han avaluat dos paràmetres: la depressió i la facilitació. La depressió o l'activitat sinàptica consisteix l'aplicació d'estímuls continus per succió a 40 o bé a 100 Hz en el múscul LAL durant dos minuts on s'estudia la seva resposta postsinàptica. Es registren els episodis ocasionats durant aquest temps i es deixa descansar la fibra un interval de 10 minuts entre registre i registre. Es registren un total de 8-10 fibres entre el registre control i l'experiment. S'avalua els canvis en la depressió com la ràtio de la mitjana de l'amplada dels 15 últims EPPs i l'amplada dels 15 primers EPPs. Els *paired pulses* o facilitació es considera generalment com el resultat de l'augment d'alliberació evocada del segon potencial d'acció respecte el primer degut al Ca^{+2} residual presinàptic (**del Castillo i Katz, 1954; Katz i Miledi, 1968**). L'estudi dels *paired pulses* ens permet identificar modificacions en la gestió intracel·lular del Ca^{+2} com per exemple, canals, bombes o receptors de la rianodina.

Experimentalment en aquesta tesi, els *paired pulses* sorgeixen de l'aplicació de dos estímuls a 40 Hz en la preparació on es registra la resposta postsinàptica. I s'ha avaluat com la ràtio de l'amplada del segon EPP entre el primer en tots els trens.

10.7 Registre continu a 1 Hz o a altes concentracions de calci

Els experiments realitzats en el nostre grup amb els inhibidors de la PKC s'ha vist es necessita una situació d'alta neurotransmissió (altes concentracions de Ca^{+2} o bé estímul continu a 1 Hz) per a que la PKC s'acobli a la neurotransmissió i els inhibidors puguin inhibir a la PKC (**Santafé i cols., 2005, 2009; Besalduch i cols., 2010**). En aquest tipus d'experiments també s'ha seguit el mateix criteri per seleccionar la fibra adequada, procediment que es descriurà en el següent apartat (10.8) i on també s'han registrat 15 fibres control i 15 fibres experiment.

10.8 Procediment de l'experiment d'electrofisiologia

En els experiments d'electrofisiologia, per poder mantenir la mostra viva (el múscul LAL) es posa en una solució oxigenada de composició i osmolaritat similar al sèrum, el Ringer (veure composició de Ringer a la **taula M.12**), amb un bombardeig constant d'una barreja del 95% d' O_2 i un 5% de CO_2 . Per tal de minimitzar la vibració durant el registre, el bombardeig no s'ha aplicat directament sobre la placa de Petri, ni la camareta de registre, si no que va ser en la solució. Una vegada la mostra s'ha muntat en la camareta de registre, s'ha bloquejat la

contracció durant 30 minuts de la forma que s'ha comentat en l'apartat 10.3. Transcorregut aquest temps, es selecciona la fibra adequada introduint l'elèctrode de registre dins del citoplasma de la fibra muscular observant que el potencial de membrana sigui superior o igual a -65 mV (amb excepció del registre de la fibra única; veure més endavant). Durant el registre, el potencial no pot decaure més de 5 mV si és així, aquella fibra s'anul·la. A continuació, s'estimula i s'observa el temps de pujada de l'EPP (que ha de ser < 1.5 m/s). Una vegada escollida la fibra adequada, es registra els mEPPs durant 1 minut o bé fins l'adquisició de 100 episodis/esdeveniments a partir del primer mEPP que surt de forma espontània dins dels deu primers segons per a cada fibra avaluada i on no es necessita bloquejar la contracció muscular, ni l'activació del potencial d'acció i a continuació, es registren els EPPs durant 50 episodis (70 estímuls a 1 Hz on es descarten els 20 primers). Es registren un total de 15 fibres control i a continuació, s'incuba el múscul LAL amb la substància d'estudi durant 1 hora. Durant aquest temps es registra la fibra única. La fibra única és el registre dels mEPPs i dels EPPs en la mateixa fibra muscular sense moure de posició l'elèctrode de registre de la preparació. S'obtenen dades cada 15 minuts (t_0' , t_{15}' , t_{30}' , t_{45}' i t_{60}' , on t_0' és el mateix moment en que s'ha afegit la substància d'estudi). Aquests registres obtinguts, permeten conèixer quin efecte té aquesta substància en la neurotransmissió en una mateixa fibra durant la primera hora d'incubació. En aquest període de temps en ocasions al afegir la substància d'estudi, el potencial de membrana va caure per sota de -65 mV. En aquests casos, s'han descartat els registres que han estat per sota de -45 mV. Per últim, transcorregut aquest temps d'incubació, es registren (mEPPs i EPPs) de les 15 fibres experiment recurrent la mateixa zona que s'ha fet durant el registre control. En tot l'experiment es canvia el Ringer o bé la solució d'estudi cada 30 minuts per mantenir viva la mostra en tot moment. S'ha realitzat un mínim de 5 músculs per substància estudiada.

S'han realitzat experiments de dobles incubacions (combinacions seriades d'antagonistes amb agonistes o bé a la inversa) com a eina farmacològica per investigar el possible efecte oclusiu o additiu entre la interacció de les substàncies. En aquest tipus d'experiments s'ha seguit el mateix procediment anteriorment comentat però en aquest cas, s'ha fet una preincubació d'1 hora amb la primera substància conjuntament amb la substància de prevenció de la contracció. A continuació, s'ha fet el registre control i, posteriorment s'incuba durant 1 hora amb la segona substància en presència de la primera. Per últim, en la quarta hora es fa el registre experiment.

En els experiments d'activitat sinàptica a 40 o a 100 Hz, el procediment a seguir és molt similar. S'ha bloquejat la contracció i s'ha seleccionat la fibra adequada seguint els

critèris que s'han comentat anteriorment. S'aplica l'estímul a 40 o bé a 100 Hz durant 2 minuts. A continuació, es deixa descansar la fibra un interval de 10 minuts entre registre i registre per a que es recuperi. En aquest tipus d'experiments, no es registre la fibra única perquè a tants Hz la fibra s'esgota. En aquest cas, s'ha registrat 8-10 fibres entre el control i l'experiment, i un mínim de 5 músculs per substància estudiada.

En tots els experiments la temperatura i la humitat en l'àrea de treball està controlada a 26°C i 50% (vaporitzador convencional *Chicco*) respectivament, per evitar les diferències de temperatura entre l'hivern i l'estiu. La temperatura del bany està monitoritzada durant els experiments (23.4 ± 1.7 °C, *Digital Thermometer TMP 812, Letica, Barcelona, Spain*). La humitat sempre s'ha mantingut constant per evitar la diferència de concentració de les solucions i drogues utilitzades.

Per descartar la influència de l'adenosina amb la temperatura, s'han realitzat alguns experiments en els quals la solució del bany estava a 31°C i no s'han trobat canvis significatius de l'efecte de l'adenosina (25 µM) amb la temperatura (% de variació: 0.96 ± 2.26).

10.9 Paràmetres avaluats en els experiments funcionals

10.9.1 Amplada dels potencials de placa evocats

L'amplada, com s'ha explicat anteriorment, és l'alçada des de la línia base fins el punt màxim de l'episodi. L'amplada pot arribar fins a uns 30-40 mV i ens dóna informació de la neurotransmissió. Per exemple, un augment de l'amplada ens indicarà que hi haurà una potenciació d'alliberació, mentre que una disminució en l'amplada serà indicatiu d'una disminució en l'alliberament d'acetilcolina.

En tots els experiments la mitjana de l'amplada (mV) de cada fibra s'ha calculat pel mètode de sumació no lineal (**McLachlan i Martin, 1981**) assumint en aquest cas un potencial de membrana de -80 mV.

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

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

On:

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

V_{EPP} : amplada mitjana de l'EPP registrat

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

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

V_m : potencial de membrana registrat

10.9.2 Amplada dels potencials de placa espontanis

La mesura de l'amplada dels mEPPs ens dóna informació sobre el component postsinàptic, com seria la quantitat de nAChRs disponibles en la membrana de la fibra muscular o bé la cinètica d'aquest canals (veure fletxa negra de la **figura M.10**). La forma de calcular l'amplada dels mEPPs és la mateixa que l'amplada dels EPPs, també s'ha corregit assumint el potencial de membrana de -45 mV pel mètode de sumació no lineal (**McLachlan i Martin, 1981**) com en el cas dels EPPs. L'amplada mitja dels mEPPs és de 0.5 mV.

En el cas dels registres a 40 Hz s'ha tingut en compte la possible modificació en la sensibilitat dels nAChRs. S'ha avaluat l'amplada dels mEPPs durant els trens d'esgotament i no s'ha observat cap canvi amb les diferents drogues utilitzades. Per exemple, la variació de l'amplada dels mEPPs durant els trens a 40 Hz en presència de l'adenosina (25 µM) ha sigut de $14.90 \pm 2.07\%$ i per l'antagonista purinèrgic inespecífic 8-SPT (100 µM) ha sigut de $2.41 \pm 4.65\%$ ($P < 0.05$).

10.9.3 Freqüència dels potencials de placa espontanis

Són els episodis que apareixen de forma espontània en un minut. La freqüència dels mEPPs dóna informació de canvis a nivell presinàptic com pot ser el número de vesícules d'acetilcolina disponibles per a ser alliberades.

10.9.4 Contingut quàntic

El contingut quàntic (de l'anglès *quantal content*) ens dóna informació sobre el número de vesícules sinàptiques o quantes alliberades per impuls nerviós. La forma de calcular la mitjana del contingut quàntic (m) és mitjançant la mitjana de la ràtio entre l'amplada mitjana dels EPPs de cada fibra entre l'amplada mitjana dels mEPPs de la mateixa fibra.

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

10.9.5 Potencial de membrana

El potencial de membrana s'efectua durant el registre dels episodis de control i problema. Durant l'experiment es procura que no caigui de 5 mV i si és així, es desestima la fibra. A més a més, es compara la mitjana del potencial de membrana entre el grup control i el problema per veure si ha hagut variació. Si hi hagués una caiguda del potencial de membrana després del tractament amb la substància d'interès podria significar que la mostra s'ha degradat o bé que la membrana està en mal estat.

10.10 Anàlisi d'electrofisiologia

Els experiments d'electrofisiologia s'ha utilitzat el *software* estadístic *SPSS® v17.0* per analitzar els resultats. Els valors s'han expressat com a mitjana \pm SEM (de l'anglès *Standard Error of the Mean*) o bé el valor s'ha expressat com a % de variació, definit com [valor final/valor inicial] x 100. S'ha utilitzat el *Welch's t-test* de dos cues per valors no aparellats perquè els nostres valors no són iguals. S'ha escollit aquest test perquè és més conservatiu que l'ordinari *test t*. Les diferències es consideren significatives $P < 0.05$.

En resum, l'ús de les tècniques com la immunohistoquímica per tenir un coneixement de la localització dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_2 i A_3 , conjuntament amb els estudis funcionals ens permetran conèixer i entendre el paper dels receptors purinèrgics en el manteniment de la sinapsi i en la modulació de la neurotransmissió.

Material i solucions
Tribromoetanol (<i>TBE, Sigma</i>) 2% w/v
Solució Ringer: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, CaCl ₂ 2 mM, MgSO ₄ 1 mM, NaHCO ₃ 12 mM, Na ₂ HPO ₄ 1 mM i glucosa 11 mM
Sistema de Bombolleg constant amb un 95% d'O ₂ i un 5% de CO ₂ per oxigenar el Ringer
Placa Petri amb el fons de <i>Sylgard</i> i got de precipitats
Camareta de registre
Sistema d'estimulació elèctrica
Elèctrodes de platí
Elèctrodes de registre, capil·lar de borosil·licat convencional (<i>GC150F-10 Harvard Apparatus Ltd</i>)
Elèctrode de referència Ag-AgCl
Pont Agar (Agar 3.5% en 137 mM NaCl)
<i>Puller (Narishige, Japó)</i>
Material quirúrgic
Equip d'electrofisiologia: unitat estimuladora, amplificador, unitat aïlladora, taula digitalitzadora i sistema informàtic
Estimulador (<i>Cibertec Stimulator CS-20</i>)
Amplificador (<i>tektromix, AM502 Differential Amp</i>)
<i>Software Axoscope 9 (Axon Instruments Inc.)</i>

Taula M.12. Material i solucions utilitzades en electrofisiologia. Totes les sals utilitzades han sigut distribuïdes per la casa comercial de *Sigma*.

10.11 Substàncies utilitzades en electrofisiologia

Per avaluar la neurotransmissió i els efectes d'activitat-dependència en el nostre model neuromuscular de LAL, s'han utilitzat les següents substàncies que s'enumeren a continuació. Totes les solucions *stock* s'han guardat a -20°C durant menys de 4 setmanes. Prèviament a fer els estudis funcionals, per escollir la concentració de la solució de treball adequada s'han fet experiments controls per analitzar la relació dosi-resposta i s'han escollit aquelles concentracions que no han afectat a l'amplada dels mEPPs per tant, no afecten a la part postsinàptica. Per la preparació de les solucions *stock* de les substàncies utilitzades s'han dissolt en aigua bidestil·lada, Ringer o bé en dimetil sulfòxid (DMSO de l'anglès *dimethyl sulfoxide*, *Tocris*). La concentració final de les substàncies preparades en DMSO és $\leq 0.1\%$ (v/v). S'han realitzat experiments controls per avaluar l'efecte del dissolvent i s'ha vist que en aquestes concentracions de DMSO no afecten a cap paràmetre estudiat (Katz, 1996; Rosato Siri i Uchitel, 1999; Tomàs i cols., 2000; Santafé i cols., 2001).

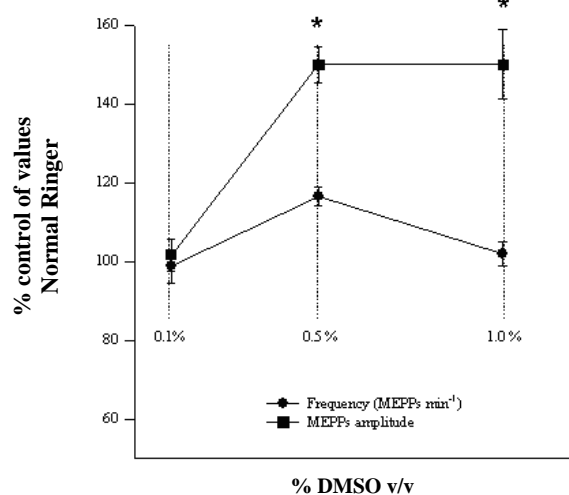


Figura M.11. Relació dosi-resposta del DMSO en la neurotransmissió. La utilització de solucions que contenen 0.1% v/v de DMSO no induïx canvis en els paràmetres estudiat atribuïts a aquest dissolvent (Katz, 1996; Rosato Siri i Uchitel, 1999; Tomàs i cols., 2000; Santafé i cols., 2001). * $P > 0.05$.

Substàncies de prevenció de la contracció

La solució *stock* de la μ -Cgtx GIIIB s'ha preparat a una concentració de 300 μ M en Ringer, pel BTS 100 mM en DMSO i pel *d-tubocurarine* 1 mM. S'ha treballat a unes concentracions de: 1-3 μ M, 200 μ M i 0.7 μ M, respectivament.

Substàncies moduladores purinèrgiques

L'agonista inespecífic. La solució *stock* de l'adenosina (de l'anglès *Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 100 mM en aigua bidestil·lada. Les solucions de treball han estat: 300 nM, 10 μ M i 25 μ M.

L'anàleg de l'adenosina. La solució *stock* de la CADO (de l'anglès *2-chloroadenosine, Sigma*) s'ha preparat a una concentració 10 mM en aigua bidestil·lada. Les solucions de treball han sigut: 300 nM i 10 μ M.

L'antagonista inespecífic. La solució *stock* del 8-SPT (de l'anglès *8-(p-Sulphophenyl)theophylline hydrate, Sigma*), s'ha preparat a una concentració de 100 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 100 μ M.

L'agonista i antagonista específic del receptor A_1 . La solució *stock* de l'agonista CCPA (de l'anglès *2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine, Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 10 mM i la de l'antagonista DPCPX (de l'anglès *8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, Sigma*) a 50 mM ambdós en DMSO. La solució de treball pel CCPA ha sigut 1 μ M i la del DPCPX a 100 nM.

L'agonista i antagonista específic del receptor A_{2A} . La solució *stock* de l'agonista CGS-21680 (de l'anglès *(2-p-(2-carboxyethyl) phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine, Sigma-Aldrich)*) s'ha preparat a una concentració 10 mM i la de l'antagonista SCH-58261 (de l'anglès *2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine, Tocris*) a 100 mM ambdós dissolts en DMSO. La solució de treball pel CGS-21680 ha sigut 1 μ M i la del SCH-58261 a 50 nM.

Antagonista específic del receptor A_{2B} . La solució *stock* del MRS1706 (de l'anglès *(N-(4-acetylphenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl) phenoxy]acetamide, Tocris*) s'ha preparat a una concentració 5 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 100 nM.

Antagonista específic del receptor A₃. La solució *stock* del MRS1334 (de l'anglès *1,4-Dihydro-2-methyl-6-phenyl-4-(phenylethynyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid 3-ethyl-5-[(3nitrophenyl)methyl] ester, Tocris*) s'ha preparat a una concentració 100 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 100 nM.

La solució *stock* de l'enzim d'hidròlisi de l'adenosina, l'ADA (de l'anglès *adenosine deaminase, Sigma*) s'ha preparat a una concentració 9.1 mg/ml en aigua bidestil·lada. La solució de treball ha sigut de 2 U/ml.

Substàncies moduladores de l'activitat dels mAChRs (M1 i M2)

Antagonista inespecífic. La solució *stock* de l'atropina (de l'anglès *atropine, Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 200 µM en aigua bidestil·lada i s'ha guardat a 4°C. La solució de treball ha sigut 2 µM.

L'antagonista del receptor M1. La solució *stock* de l'antagonista amb més afinitat pel receptor M1, la pirenzepina (de l'anglès *pirenzepine, Tocris*) s'ha preparat a una concentració de 10 mM en aigua bidestil·lada i s'ha guardat a 4°C. La solució de treball ha sigut 10 µM.

L'antagonista del receptor M2. La solució *stock* de l'antagonista amb més afinitat pel receptor M2, la metoctramina (de l'anglès *methoctramine tetrahydrochloride, Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 1 mM en aigua bidestil·lada i s'ha guardat a 4°C. La solució de treball ha sigut 1 µM.

Substàncies moduladores de l'activitat PKA

Activador selectiu de la PKA. La solució *stock* de l' Sp-8-BrcAMPs (de l'anglès *Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphorothioate, 8-Bromo-, Rp-Isomer, Sodium Salt, Calbiochem*) s'ha preparat a una concentració de 5 mM en aigua bidestil·lada. La solució de treball ha sigut 10 µM.

Inhibidor selectiu de la PKA. La solució *stock* de l'H-89 (de l'anglès *N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl, Calbiochem*) s'ha preparat a una concentració de 5 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 5 µM.

Substàncies moduladores de l'activitat PKC

Activador selectiu de la PKC. La solució *stock* del PMA (de l'anglès *Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 10 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 10 nM.

Capítol III. Material i Mètodes

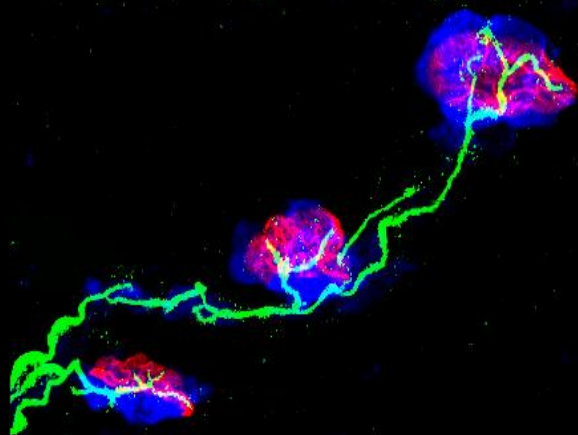
Inhibidor selectiu de la PKC. La solució *stock* de la CaC (de l'anglès *Calphostin C*, *Sigma*) s'ha preparat a una concentració de 2.5 mM en DMSO. La solució de treball ha sigut 10 μ M.

Substàncies moduladores dels VDCCs

Antagonista dels VDCCs tipus P/Q. La solució de treball de ω -Aga IVA (de l'anglès *ω -Agatoxin IVA*, *Calbiochem*) ha sigut directament afegida a la solució del bany a una concentració de 100 nM.

Condicions de baix Ca^{+2}

S'han realitzat experiments en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} , en les quals s'ha preparat una solució *stock* de Mg^{+2} de concentració 250 mM en Ringer i s'ha treballat a dues concentracions: 0.5 i 1 mM.



Capítol IV.

Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC LAL

Amb l'objectiu de determinar la presència dels receptors d'adenosina A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 en múscul esquelètic LAL de nadó i d'adult, s'ha realitzat tècnica del Western blot (veure amb més detall l'apartat 5. *Detecció de proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE i Western blot a Material i Mètodes*). S'han utilitzat com a controls positius lisats del teixit del sistema nerviós central, com és el cas del cervell i la medul·la espinal adulta. En els Westerns blots s'han realitzat estudis quantitius, per analitzar la densitat de les bandes i avaluar la quantitat relativa dels receptors d'adenosina en els músculs de nadó i adult. En alguns casos, l'expressió dels receptors d'adenosina en el múscul LAL s'ha comparat amb els lisats de cervell i la medul·la espinal adulta.

La tècnica del Western blot també ens ha permès determinar l'especificitat dels anticossos utilitzats, requisit imprescindible per després poder-los utilitzar en els estudis d'immunomarcatge concretament, per la tècnica de la immunohistoquímica per les diferents proteïnes d'estudi. La localització d'aquests receptors en els components cel·lulars que conformen la NMJ ens permetrà entendre millor la seva funcionalitat.

1.1 Expressió del receptor d'adenosina A_1

Amb el propòsit de determinar l'expressió del receptor A_1 en el múscul esquelètic LAL, s'ha utilitzat l'anticòs policlonal de conill contra A_1R d'*Alomone* (AAR-006). Els anàlisis de Western blot han mostrat la presència d'una única banda pel receptor d'adenosina A_1 a 35 kDa en les quatre mostres de lisat: múscul LAL adult i nadó, cervell i medul·la espinal adulta (**figura R.1A**). Les bandes que s'han detectat coincideixen amb el pes molecular pronosticat. En el mateix Western blot, s'ha normalitzat amb la proteïna actina (de pes molecular de 45 kDa; anticòs policlonal de conill contra l'actina *pan-actin*; 4969, *Cell Signaling*) per poder fer els anàlisis de quantificació. Els resultats evidencien que el receptor A_1 és més abundant en el múscul adult que en el nadó (ràtio múscul adult/nadó = 4.76 ± 0.74 , $n = 5$, $P < 0.05$; veure **figura R.1B**). També, s'ha testat l'especificitat de l'anticòs policlonal de conill contra A_1R de *Millipore* (AB1587P) mitjançant Western blot en les quatre mostres de lisat. Les bandes i l'especificitat detectada ha sigut similar a l'observada amb l'anticòs de d'*Alomone* (AAR-006) (*resultats no il·lustrats*). En resum, els Western blots realitzats mostren l'especificitat d'aquests anticossos per aquesta proteïna i la presència d'aquests receptors en les quatre mostres de lisat.

Capítol IV. Resultats

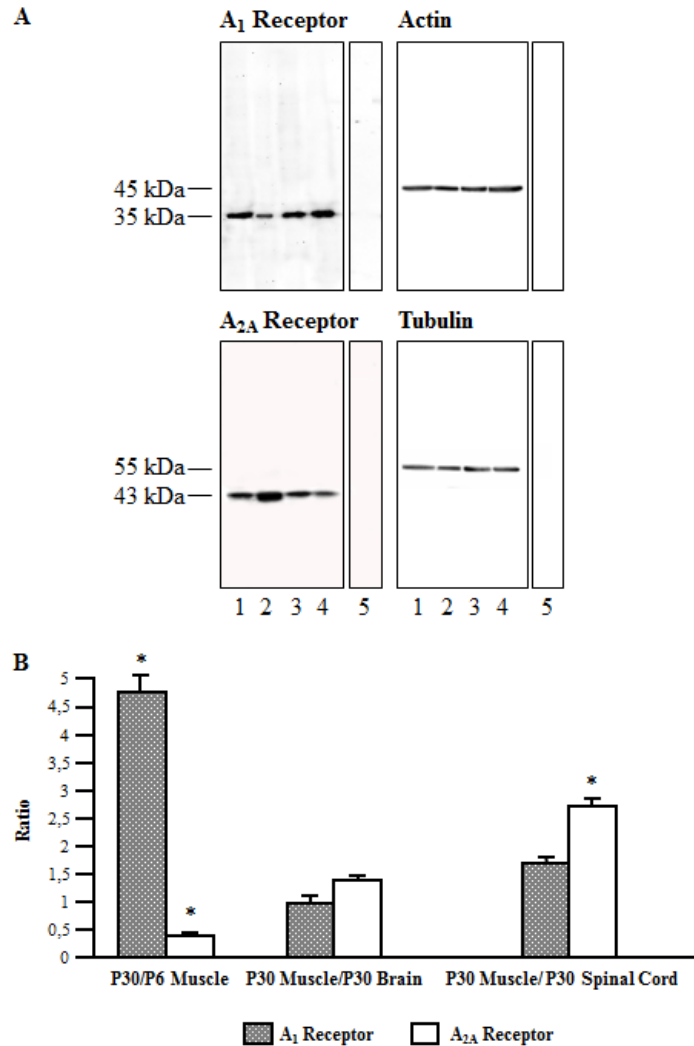


Figura R.1. Western blot dels receptors d'adenosina A₁ i A_{2A} en els músculs LALs P6 i P30. (A) Western blot representatiu del receptor A₁ (a dalt) amb l'anticòs policlonal de conill contra A₁R d'*Alomone (AAR-006)* i del receptor A_{2A} (a baix) amb l'anticòs monoclonal de ratolí contra A_{2A}R de *Millipore (05-717)*. S'ha detectat la presència dels receptors A₁ i A_{2A} en els lisats de múscul adult (P30, carril 1), de múscul nadó (P6, carril 2), de cervell adult (carril 3) i de medul·la espinal adulta (carril 4). El carril 5 és el control negatiu on s'ha incubat la membrana en absència de l'anticòs primari i en presència de l'anticòs secundari. Com a controls positius, s'han utilitzat les mostres de cervell i de medul·la espinal adulta. La quantitat de mostra que s'ha carregat en el gel és de 100 µg de proteïna total. Com a proteïnes de control de càrrega s'han utilitzat l'actina i la tubulina. (B) Anàlisi quantitativa dels receptors A₁ i A_{2A}. Els Westerns blots han sigut normalitzats amb l'actina pel receptor A₁ i la tubulina pel receptor A_{2A}. El gràfic mostra que el receptor A₁ és més abundant en el múscul adult que en el nadó, mentre que el receptor A_{2A} és més abundant en el múscul nadó que en l'adult. En l'adult, el receptor A_{2A} és més abundant en la medul·la espinal adulta que en el múscul (2.71 vegades). Els resultats s'han expressat com mitjana ± SEM, n = 5 experiments independents, *P < 0.05.

1.2 Expressió del receptor d'adenosina A_{2A}

La presència del receptor A_{2A} en el múscul esquelètic LAL en desenvolupament i en l'adult, s'ha detectat amb l'anticòs monoclonal de ratolí contra A_{2A}R de *Millipore (05-717)* pels quatre teixits: múscul adult i nadó, cervell i medul·la espinal adulta. Les bandes que s'han observat corresponen amb el pes molecular esperat de 43 kDa (**figura R.1A**). En aquest cas, s'ha utilitzat la tubulina com a proteïna de control de càrrega (pes molecular 55 kDa; anticòs monoclonal de ratolí contra la tubulina *anti-β-Tubulin, clone TUB2.1, T 4026, IGg1, Sigma*). Els estudis de densitometria realitzats mostren que el receptor d'adenosina A_{2A} és més abundant en el múscul de nadó que en l'adult (ràtio múscul adult/nadó = 0.39 ± 0.06 , $n = 5$, $P < 0.05$; veure **figura R.1B**). En l'adult, s'ha observat 2.71 vegades més d'expressió de proteïna en la medul·la espinal que en el múscul ($P < 0.05$).

1.3 Expressió del receptor d'adenosina A_{2B}

L'expressió del receptor A_{2B} s'ha determinat amb l'anticòs de cabra contra A_{2B}R de *Santa Cruz (sc-7506)* i amb l'anticòs de conill contra A_{2B}R de *Millipore (AB1589P)*. Amb els dos anticossos policlonals s'ha trobat la presència d'aquesta proteïna en les quatre mostres: múscul adult i nadó, cervell i medul·la espinal adulta. Per l'anticòs de *Santa Cruz (sc-7506)* s'ha observat una banda a 47 kDa pel múscul esquelètic LAL d'adult i nadó, i un altre banda a 45 kDa pel cervell i la medul·la espinal adulta (**figura R.2A**). Per un altre banda, usant l'anticòs de *Millipore (AB1589P)* s'ha detectat una banda a 52 kDa pel múscul esquelètic LAL d'adult i nadó, i una banda a 51 kDa per les mostres de cervell i medul·la espinal adulta (**figura R.2A**). S'ha utilitzat l'actina (de pes molecular 45 kDa; anticòs policlonal de conill contra l'actina *pan-actin; 4969, Cell Signalling*) com a proteïna de control de càrrega pels dos anticossos (veure **figura R.2A**, exemple representatiu d'una imatge de l'actina per l'anticòs de *Santa Cruz (sc-7506)*). Els estudis de quantificació realitzats mostren que pels dos anticossos, el receptor A_{2B} s'expressa més en el múscul adult que en el nadó (ràtio múscul adult/nadó = 1.34 ± 0.2 i 1.41 ± 0.1 per *Santa Cruz (sc-7506)* i *Millipore (AB1589P)*, respectivament; $n = 5$, $P < 0.05$). En l'adult, s'ha trobat que l'expressió del receptor A_{2B} és aproximadament 2.5 vegades més abundant en el cervell que en el múscul, pels dos anticossos utilitzats. A més a més, aquest receptor utilitzant l'anticòs de *Santa Cruz (sc-7506)* és 1.92 vegades més expressat en la medul·la espinal que en el múscul, i és 1.78 vegades usant l'anticòs de *Millipore (AB1589P)* ($n = 5$, $P < 0.05$; veure **figura R.2B**). Per tant, es posa de manifest que el receptor A_{2B} es troba present en el múscul adult i neonatal.

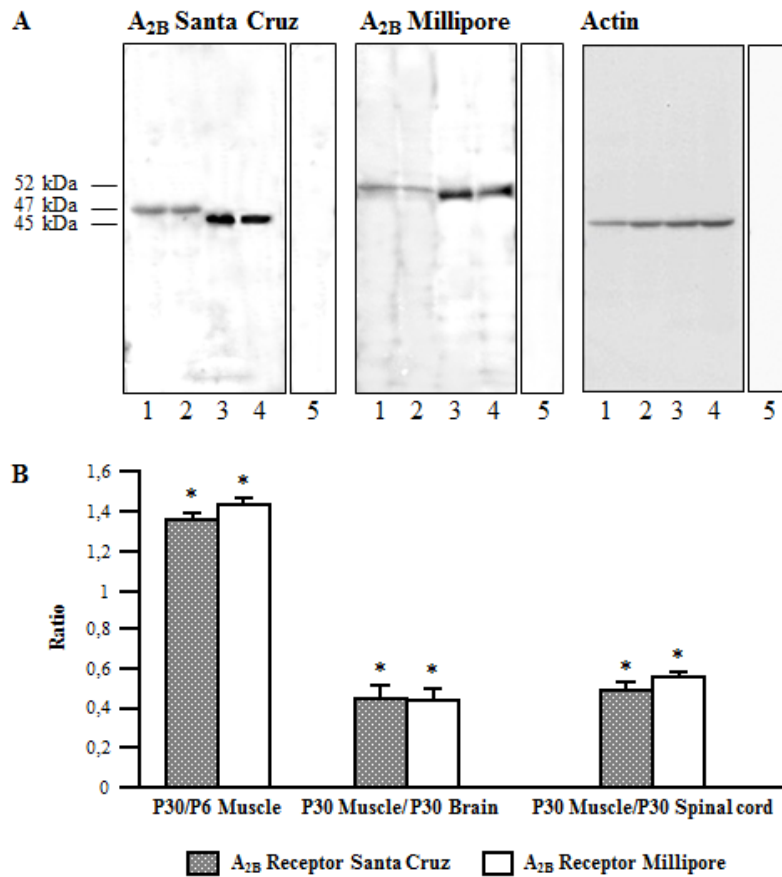


Figura R.2. Western blot del receptor d'adenosina A_{2B} en els músculs LALs P6 i P30. (A) Western blot representatiu del receptor A_{2B} amb dos anticossos policlonals de dues cases comercials diferents: un d'ells, s'ha obtingut amb l'anticòs de cabra contra A_{2B}R de Santa Cruz (*sc-7506*) i l'altre amb l'anticòs de conill contra A_{2B}R de Millipore (*AB1589P*). Es mostra la presència del receptor A_{2B} en els lisats de múscul adult (P30, carril 1), de múscul nadó (P6, carril 2), de cervell adult (carril 3) i de medul·la espinal adulta (carril 4). El carril 5 és el control negatiu. Per l'anticòs del receptor A_{2B} de Santa Cruz (*sc-7506*) s'ha incubat la membrana en absència de l'anticòs primari i en presència de l'anticòs secundari. En el cas de l'anticòs del receptor A_{2B} de Millipore (*AB1589P*), s'ha incubat la membrana amb el seu corresponent pèptid de bloqueig. Com a controls positius s'han utilitzat el cervell i la medul·la espinal adulta. La quantitat de mostra que s'ha carregat en el gel és de 100 µg de proteïna total. Com a proteïna de control de càrrega s'ha utilitzat l'actina pels dos anticossos. En la figura R.2A es mostra un exemple representatiu d'una imatge de l'actina per l'anticòs de Santa Cruz (*sc-7506*). (B) Estudi de l'anàlisi quantitatiu del receptor A_{2B} normalitzat amb l'actina. Les dades mostren que el receptor A_{2B} és més abundant en múscul adult que en el nadó, i que és més abundant en el cervell i la medul·la espinal adulta que en el múscul. Els resultats s'han expressat com mitjana ± SEM, n = 5 experiments independents, *P < 0.05.

1.4 Expressió del receptor d'adenosina A₃

Per determinar la presència receptor A₃ en el múscul esquelètic LAL adult i nadó, cervell i medul·la espinal adulta, també s'han fet servir dos anticossos policlonals de conill contra A₃R de dues cases comercials diferents: un d'ells ha estat l'anticòs de *Santa Cruz* (*sc-13938*) i l'altre, l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*). Els dos anticossos han presentat una única banda d'immunoreactivitat a 44 kDa, similar al pes molecular pronosticat (**figura R.3A**). En aquest cas, s'ha utilitzat la tubulina (de pes molecular de 55 kDa; anticòs monoclonal de ratolí contra la tubulina *anti β-Tubulin, clone TUB2.1, T 4026, IGg1, Sigma*) com a proteïna de control de càrrega pels dos anticossos (veure **figura R.3A**, exemple representatiu d'una imatge de la tubulina per l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*)). Els estudis densitomètrics realitzats mostren que aquest receptor està més expressat en el múscul adult que en el nadó (ràtio múscul adult/nadó = 1.7 ± 0.15 i 1.6 ± 0.07 per a *Santa Cruz* (*sc-13938*) i *Millipore* (*AB1590P*), respectivament; $n = 5$, $P < 0.05$). A més a més, el receptor A₃ es troba més expressat en el múscul adult, que en el cervell i la medul·la espinal (ràtio múscul adult/cervell = 1.43 ± 0.13 i 1.6 ± 0.1 , per *Santa Cruz* (*sc-13938*) i *Millipore* (*AB1590P*), respectivament, $n = 5$; ràtio múscul adult/medul·la espinal = 1.7 ± 0.1 i 1.73 ± 0.03 per *Santa Cruz* (*sc-13938*) i *Millipore* (*AB1590P*), respectivament; $n = 5$, $P < 0.05$; veure **figura R.3B**). Per tant, mitjançant aquest anticòs específic per aquest receptor s'ha evidenciat la seva presència en el teixit muscular d'adult i en el nadó.

En resum, els resultats obtinguts per la tècnica del Western blot evidencien que els receptors d'adenosina (A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃) es troben presents en el múscul esquelètic LAL. En concret, s'ha observat que els receptors A₁, A_{2B} i A₃ són més abundants en el múscul esquelètic adult que en el nadó, en canvi el receptor A_{2A} és més abundant en el nadó que en el múscul LAL adult.

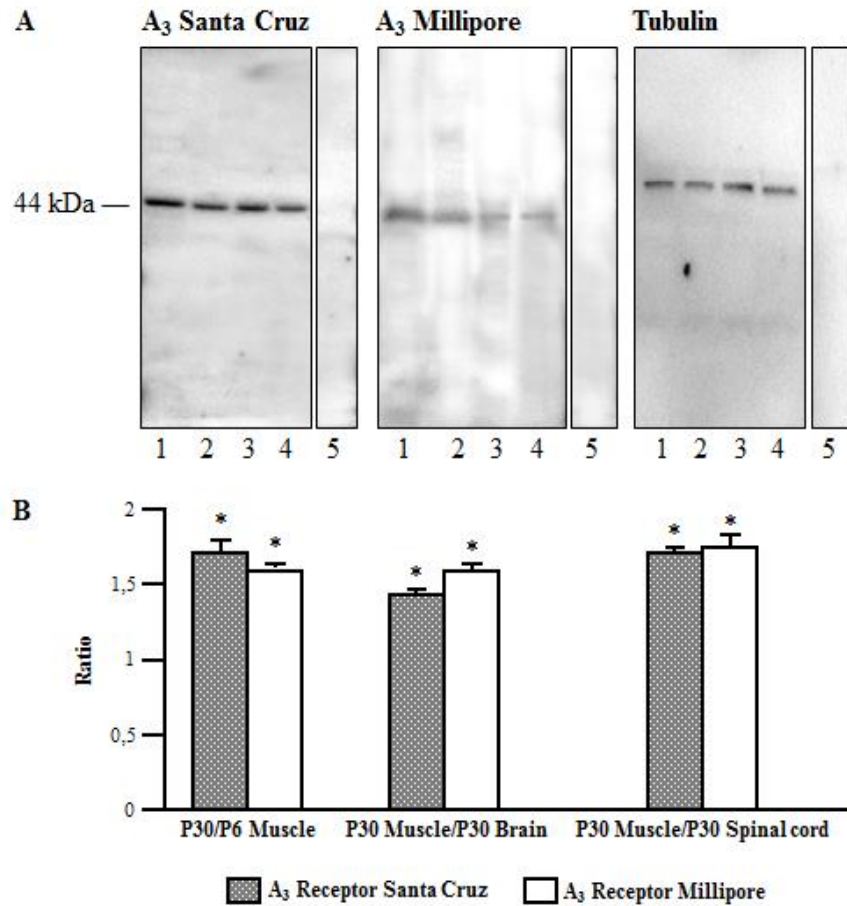


Figura R.3. Western blot del receptor d'adenosina A₃ en els músculs LALs P6 i P30. (A) Western blot representatiu del receptor A₃ amb dos anticossos policlonals de conill contra A₃R de dues cases comercials diferents, *Santa Cruz* (*sc-13938*) i *Millipore* (*AB1590P*). Es mostra la presència del receptor en els lisats de múscul adult (P30, carril 1), de múscul nadó (P6, carril 2), de cervell adult (carril 3) i de medul·la espinal adulta (carril 4). El carril 5 és el control negatiu. Per l'anticòs de *Santa Cruz* (*sc-13938*) s'ha incubat la membrana amb el seu corresponent pèptid de bloqueig. En el cas de l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*), s'ha incubat la membrana en absència de l'anticòs primari i en presència de l'anticòs secundari. Com a controls positius s'han utilitzat el cervell i la medul·la espinal adulta. La quantitat de mostra que s'ha carregat en el gel és de 100 µg de proteïna total. Com a proteïna de control de càrrega s'ha utilitzat la tubulina pels dos anticossos, en la **figura R.3A** es mostra un exemple representatiu d'una imatge de la tubulina per l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*). (B) Anàlisi quantitatiu del receptor A₃ normalitzat amb la tubulina. Les dades mostren que el receptor A₃ és més abundant en múscul adult que en nadó, i que és més abundant en múscul que en cervell i medul·la espinal adulta (M. Espinal). Els resultats s'han expressat com mitjana ± SEM, n = 5 experiments independents, *P < 0.05.

2. LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA (A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃) EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

El fet de conèixer la localització específica subcel·lular dels receptors d'adenosina en els elements presinàptics, postsinàptics i en la cèl·lula glial, és important per determinar la funció d'aquestes proteïnes. Fins el moment, s'ha descrit poc sobre la localització d'aquest receptors en la NMJ. Per aquesta raó, un dels principals objectius d'aquest treball és determinar la localització d'aquests receptors d'adenosina en la NMJ del múscul esquelètic LAL, mitjançant immunohistoquímica convencional i de seccions transversals semifines (STS de l'anglès *semithin cross-sections*) per fluorescència. Per dur a terme els següents objectius, s'han utilitzat els mateixos anticossos primaris que en el Western blot. Posteriorment, per poder detectar-los en la NMJ s'han utilitzat anticossos secundaris fluorescents marcats amb diferents fluorocroms (veure el procediment detallat a l'apartat 6 a *Materials i Mètodes*). Conjuntament amb els anticossos primaris, per poder determinar específicament la localització dels receptors d'adenosina en la NMJ, s'han utilitzats anticossos primaris específics dels diferents components cel·lulars que formen aquesta unió. Aquestes proteïnes són la syntaxina, que ens permet detectar el terminal nerviós i la proteïna S-100, que ens localitza la cèl·lula de Schwann (CS en anglès *Schwann cell*). A més a més, s'ha utilitzat l' α -BTX marcada amb rodamina per poder detectar els nAChRs postsinàptics. Amb la utilització del microscopi làser confocal i amb aquests marcadors ens ha permès determinar de forma precisa la localització dels receptors d'adenosina en la NMJ, és a dir, si està en el terminal nerviós, en la CS o la cèl·lula muscular postsinàptica.

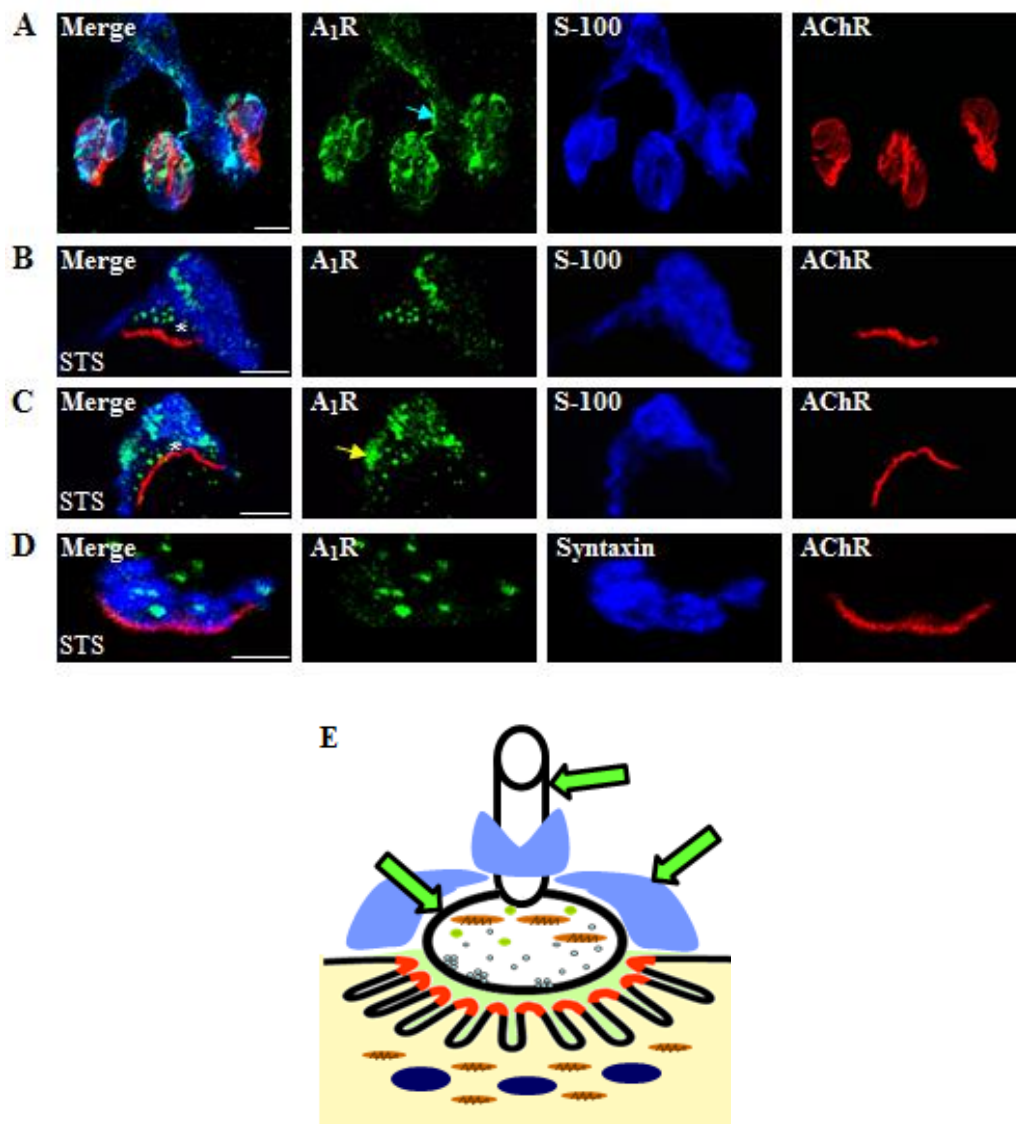
En els casos que ha estat necessari, a més a més, de la immunohistoquímica convencional s'ha ampliat l'estudi de localització realitzant STS a partir de mostres processades per immunohistoquímica convencional (veure el procediment amb més detall a l'apartat 7 a *Materials i Mètodes*). Aquesta tècnica ens ha permès determinar la localització d'aquestes proteïnes d'una forma simple, incrementant la resolució i la precisió en l'anàlisi de la distribució específica cel·lular i subcel·lular dels diferents receptors. També s'han realitzat diferents controls negatius, per assegurar-nos que no hi ha marca inespecífica dels anticossos secundaris o creuaments no desitjats. Les làmines dels controls negatius es mostren en la **figura M.6** de l'apartat 8. *Controls negatius amb la tècnica d'immunohistoquímica d'alta resolució i convencional en músculs LALs adults a Materials i Mètodes.*

En cada làmina de localitzacions dels receptors d'adenosina s'ha adjuntat un esquema adaptat de la publicació de **Lanuza i cols. (2014)**, resumint i mostrant en quines àrees de les tres cèl·lules que conformen la NMJ es troben present aquests receptors.

2.1 Localització del receptor d'adenosina A₁ en el múscul LAL de nadó i d'adult

Per l'estudi de la localització del receptor A₁ en el múscul esquelètic LAL de nadó s'ha realitzat triple marcatge. El receptor A₁ s'ha marcat en verd conjuntament amb l'S-100 (**figures R.4A-C**) o bé la syntaxina (*syntaxin*, **figura R.4D**) en blau, i els nAChRs en vermell. En aquesta immunohistoquímica s'han utilitzat dos anticossos policlonals de conill de dues cases comercials diferents: l'anticòs d'*Alomone* (AAR-006) i l'anticòs de *Millipore* (AB1587P). El patró de localització del receptor A₁ utilitzant aquests dos anticossos ha estat el mateix. En la làmina de nadó de la **figura R.4A**, s'observa un filament intens de color verd corresponent a l'axó terminal i preterminal (*fletxa blava de la imatge verda*) que s'introdueix dins de la placa sinàptica cap als botons terminals. Per tal de determinar quines cèl·lules són positives pel receptor A₁, es pot veure en més claredat en la STS un granulat intens entre la CS i la línia postsinàptica corresponent als terminals nerviosos (*asterisc blanc*, **figures R.4B i R.4C**). En la **figura R.4C**, la *fletxa groga de la imatge verda* mostra la coincidència del receptor A₁ amb l'S-100 indicant marca positiva del receptor en la CS terminal. En la **figura R.4D** es corrobora la marca en el terminal nerviós i en l'espai de la cèl·lula glial, ja que s'observa un granulat dens en l'àrea del terminal que coincideix amb la marca de la syntaxina i per sobre d'ella. Les STS permeten veure d'una forma més precisa la no presència d'aquesta proteïna en la cèl·lula muscular, al no observar-se marca per sota dels nAChRs. Per tant, es pot concloure que el receptor d'adenosina A₁ es troba present en la NMJ neonatal, concretament en l'axó preterminal, el terminal nerviós i en la CS terminal.

Figura R.4. Triple marcatge del receptor d'adenosina A₁ (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P6. (Veure la figura a la pàgina següent). Immunohistoquímica convencional (**figura R.4A**) i d'alta resolució (STS) (**figures R.4B-D**), usant els anticossos policlonals de conill d'*Alomone* (AAR-006) (**figures R.4A, R.4C i R.4D**) i de *Millipore* (AB1587P) (**figura R.4B**). En la imatge colocalitzada (*Merge*) **R.4A**, s'observa una marca intensa filamentosa i ben determinada de color verd que indica marca en l'àrea de la NMJ concretament en el terminal nerviós i preterminal (*fletxa blava*). En les STS de les **figures R.4B i R.4C**, la marca granulada situada entre la CS i la línia postsinàptica correspon als terminals nerviosos (*asteriscs blancs*). A més, s'observa un granulat molt intens que coincideix amb la marca de la proteïna S-100 indicant la presència del receptor A₁ en la CS terminal (*fletxa groga*, **figura R.4C**). La **figura R.4D** corrobora la presència del receptor A₁ en el terminal nerviós i en la cèl·lula glial. No s'observa marca d'aquest receptor en la cèl·lula muscular. Barra d'escala: 10 µm. En la **figura R.4E** es presenta un resum de les localitzacions positives del receptor A₁ en la NMJ neonatal. Esquema adaptat de la publicació de **Lanuza i cols. (2014)**.



En la NMJ adulta, les immunohistoquímiques realitzades també s'han fet per triple marcatge on el receptor A₁ s'ha marcat en verd conjuntament amb l'S-100 (figures R.5A i R.5B) o bé la syntaxina (figures R.5C i R.5D) en blau, i els nAChRs en vermell. En la figura R.5A, s'observa una gran coincidència del receptor A₁ amb la proteïna S-100 indicant marca en la CS terminal. En la STS de la figura R.5B, s'aprecia un marca granulada intensa concentrada en l'àrea situada entre la CS i la cèl·lula muscular, mostrant marca en el terminal nerviós (*asterisc blanc*). A més, en la mateixa figura, s'observa una gran coincidència del

Capítol IV. Resultats

receptor A_1 amb l'S-100, el que afirma la presència d'aquest receptor en la CS terminal. En la **figura R.5C**, la *fletxa groga* assenyala un granulat per sobre dels botons terminals i la syntaxina, corroborant la marca positiva en la cèl·lula glial terminal. Així mateix, en la STS de la **figura R.5D** s'observa amb més claredat, una marca intensa concentrada per sobre de la syntaxina confirmant la marca positiva en la CS terminal (*fletxa groga*). En aquest cas, igual que en el nadó, tampoc s'observa presència d'aquest receptor en la cèl·lula muscular postsinàptica, al no observar-se marca verda per sota dels nAChRs.

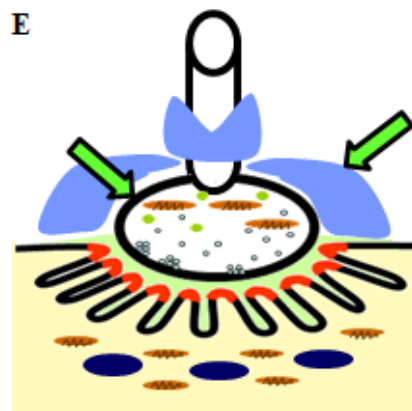
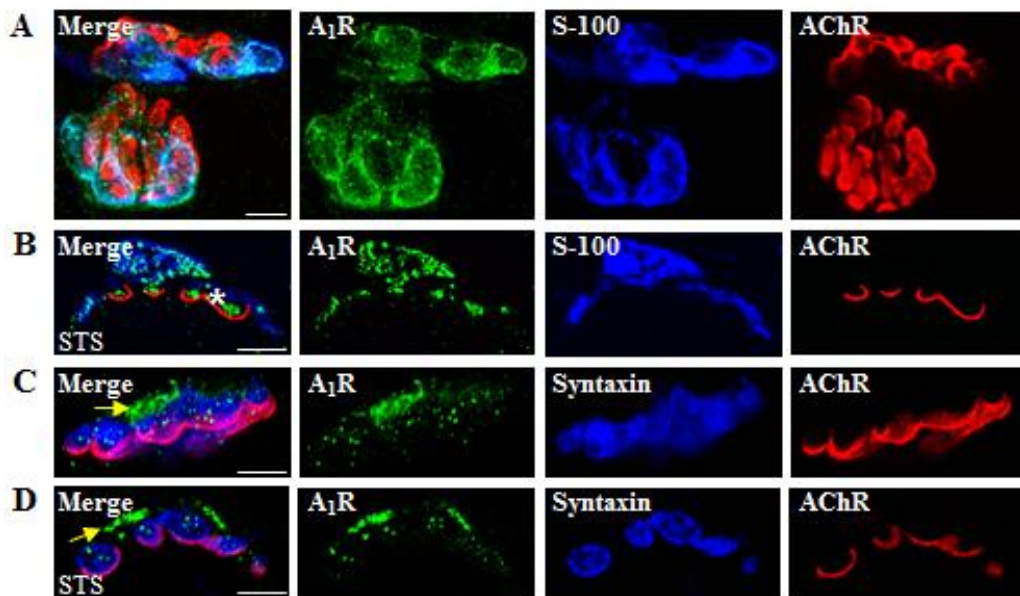


Figura R.5. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_1 (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30. (Peu de figura de la pàgina anterior). Immunohistoquímica convencional (figures R.5A i R.5C) i d'alta resolució (STS) (figures R.5B i R.5D), usant dos anticossos policlonals de conill: l'anticòs d'Alomone (AAR-006) (figures R.5A-C) i de Millipore (AB1587P) (figura R.5D). En la figura R.5B es mostra uns depòsits granulars densos en l'espai situat entre la CS i la línia postsinàptica, indicant la presència d'aquesta proteïna en els terminals nerviosos (*asterisc blanc*). En la mateixa STS, es pot veure com un granulat verd coincideix amb l'S-100 mostrant marca en la CS terminal. A més, en la figura R.5C, la *fletxa groga* mostra una marca granular situada per damunt de la syntaxina, el que ens indica la presència del receptor A_1 en la CS terminal. En la STS de la figura R.5D, de forma més precisa, ens corrobora la presència d'aquest receptor en la CS terminal on es pot veure una marca granular densa per sobre de la syntaxina (*fletxa groga*). No hi ha presència d'aquest receptor en el component postsinàptic. Barra d'escala: 10 μm . En la figura R.5E es mostra un resum de la localització positiva del receptor A_1 en la NMJ adulta. Esquema adaptat de la publicació de Lanuza i cols. (2014).

En conclusió, el receptor d'adenosina A_1 es localitza en el component presinàptic i en la CS terminal en la NMJ adulta. No s'ha trobat presència d'aquesta proteïna en la cèl·lula muscular.

2.2 Localització del receptor d'adenosina A_{2A} en el múscul LAL de nadó i d'adult

El receptor A_{2A} s'ha estudiat la localització en la NMJ neonatal (figura R.6) i adulta (figura R.7) en el múscul esquelètic LAL amb l'anticòs monoclonal de ratolí de Millipore (05-717). En color verd s'ha detectat el receptor A_{2A} colocalitzat amb la syntaxina (figures R.6A i R.6B) o bé amb l'S-100 (figures R.6C i R.6D) en blau, i en vermell els nAChRs. Els resultats mostren que en la NMJ de nadó s'observa una marca forta del receptor en els axons intramusculars i en els terminals (figures R.6A i R.6B, *fletxa blava*), però en les arboritzacions la marca sembla més fragmentada. Els *asteriscs blancs* de la STS de la figura R.6C mostren de forma més precisa un granulat intens en l'espai situat entre la CS i els nAChRs, indicant la presència del receptor A_{2A} en els botons terminals. La figura R.6D ens corrobora la localització d'aquesta proteïna en el terminal nerviós, donat que s'observa immunoreactivitat en l'espai comprès entre la CS i el component postsinàptic. En la mateixa figura s'observa marca en la cèl·lula muscular, ja que s'aprecia un granulat intens per sota de la línia postsinàptica com indica la *fletxa rosa* de la imatge colocalitzada de la figura R.6D. A diferència del receptor A_1 , en la majoria de sinapsis el receptor A_{2A} no colocalitza amb la proteïna S-100, encara que una marca gairebé imperceptible, molt dèbil, pot ser observada en la CS en algunes de les STS (veure exemple figura R.6D). Per tant, segons els resultats

Capítol IV. Resultats

obtinguts podem concloure que el receptor d'adenosina A_{2A} es localitza en l'axó preterminal, el terminal nerviós i la cèl·lula muscular en la NMJ neonatal.

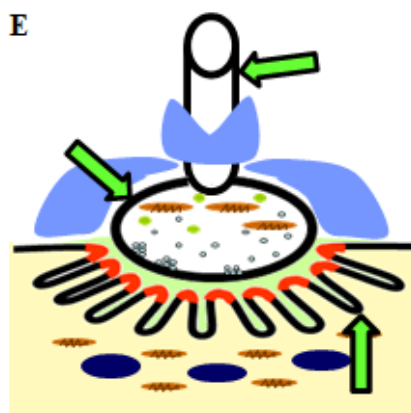
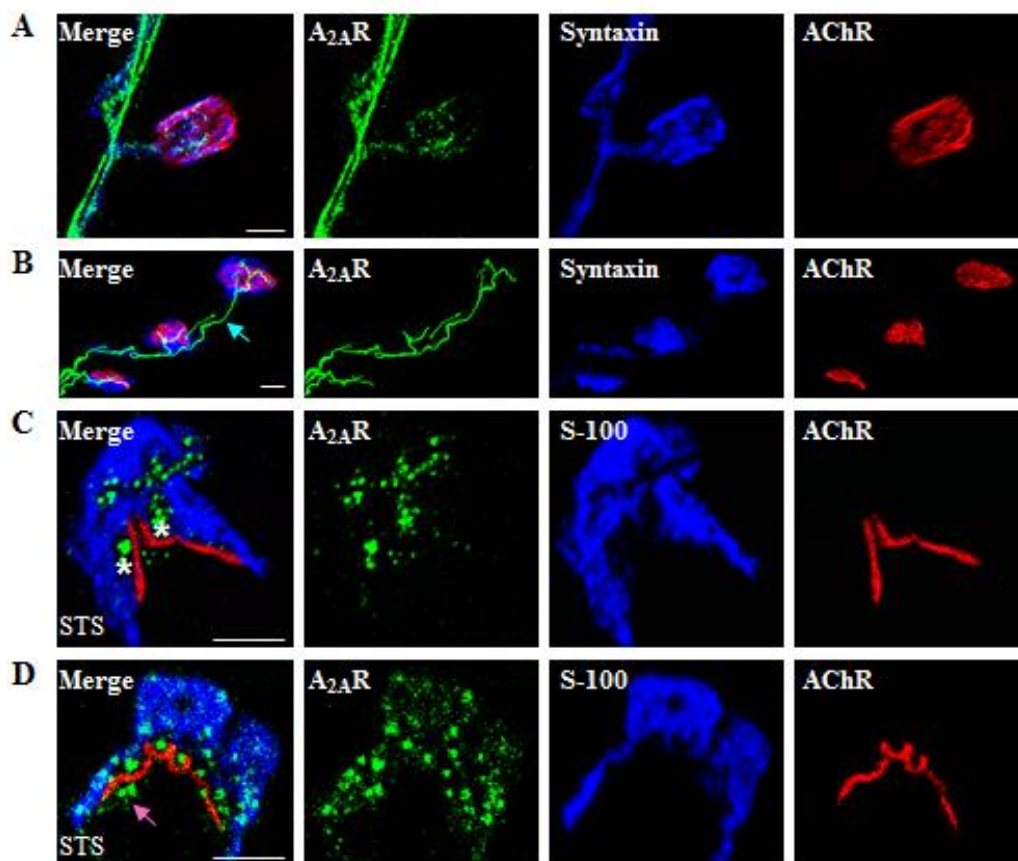


Figura R.6. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2A} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P6. (Peu de figura de la pàgina anterior). Immunohistoquímica convencional (figures R.6A i R.6B) i d'alta resolució (STS) (figures R.6C i R.6D), usant l'anticòs monoclonal de ratolí de Millipore (05-717). En les figures R.6A i R.6B, s'observa un fil intens que coincideix amb la syntaxina, el que indica marca en el recorregut axonal i en l'axó preterminal tal com mostra la fletxa blava. En la STS es pot veure amb més detall, un granulat dens entre la CS i el component postsinàptic indicant marca positiva en el terminal nerviós (figura R.6C, asteriscs blancs). En la figura R.6D, la fletxa rosa mostra cúmuls densos per sota de la línia dels nAChRs mostrant marca subsarcolèmica postsinàptica. En la majoria de sinapsis no s'aprecia coincidència entre el receptor A_{2A} i la proteïna S-100, el que mostraria que no hi ha presència d'aquesta proteïna en la CS terminal, però en algunes sinapsis es pot observar en la CS una marca molt dèbil i fina, quasi imperceptible (exemple, figura R.6D). Barra d'escala: 10 μ m. En la figura R.6E, es mostra un resum de la localització positiva del receptor A_{2A} en la NMJ neonatal. Esquema adaptat de la publicació de Lanuza i cols. (2014).

La localització del receptor A_{2A} en la NMJ adulta és molt similar a la del nadó. Com en la situació neonatal, les immunohistoquímiques realitzades s'han marcat per triple marcatge on el receptor A_{2A} s'ha detectat en color verd conjuntament amb la syntaxina (figures R.7A i R.7B) o bé l'S-100 en blau (figures R.7C i R.7D) i els nAChRs en vermell. En la figura R.7A s'aprecia una forta coincidència amb la syntaxina, mostrant marca positiva d'aquest receptor en el recorregut axonal i en l'axó preterminal (fletxa blava). A més, en la figura R.7B, s'observa la presència d'uns cúmuls intensos de fluorescència que coincideixen amb l'àrea de la syntaxina indicant la presència del receptor en el terminal nerviós i en l'axó preterminal. Per confirmar aquesta localització, en la STS de la figura R.7C s'observa un granulat intens que ocupa l'espai corresponent al terminal nerviós (asteriscs blancs), entre la CS terminal i els nAChRs. La fletxa rosa assenyalava un granulat difós per sota dels nAChRs, indicant la presència d'aquesta proteïna en l'àrea subsarcolèmica postsinàptica (figura R.7D). Com en la situació de la NMJ en desenvolupament, en la majoria de sinapsis adultes la marca del receptor A_{2A} no colocalitza amb la proteïna S-100, el que indicaria la no presència d'aquest receptor en la CS terminal. No obstant, en algunes sinapsis, escasses, es pot observar una marca molt dèbil i gairebé inapreciable en part de l'espai ocupat per l'S-100 (veure exemples, figures R.7C i R.7D). Veient les imatges obtingudes s'arriba a la conclusió, que el receptor d'adenosina A_{2A} es localitza en l'axó preterminal, en el terminal nerviós, en la cèl·lula muscular de la NMJ adulta igual que en la situació immadura.

Capítol IV. Resultats

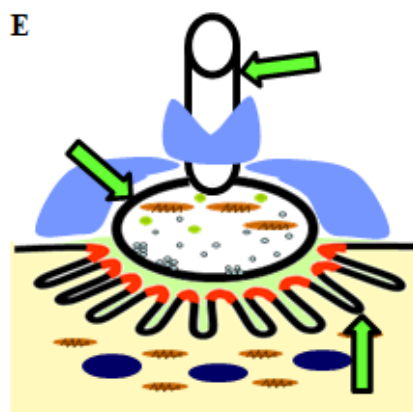
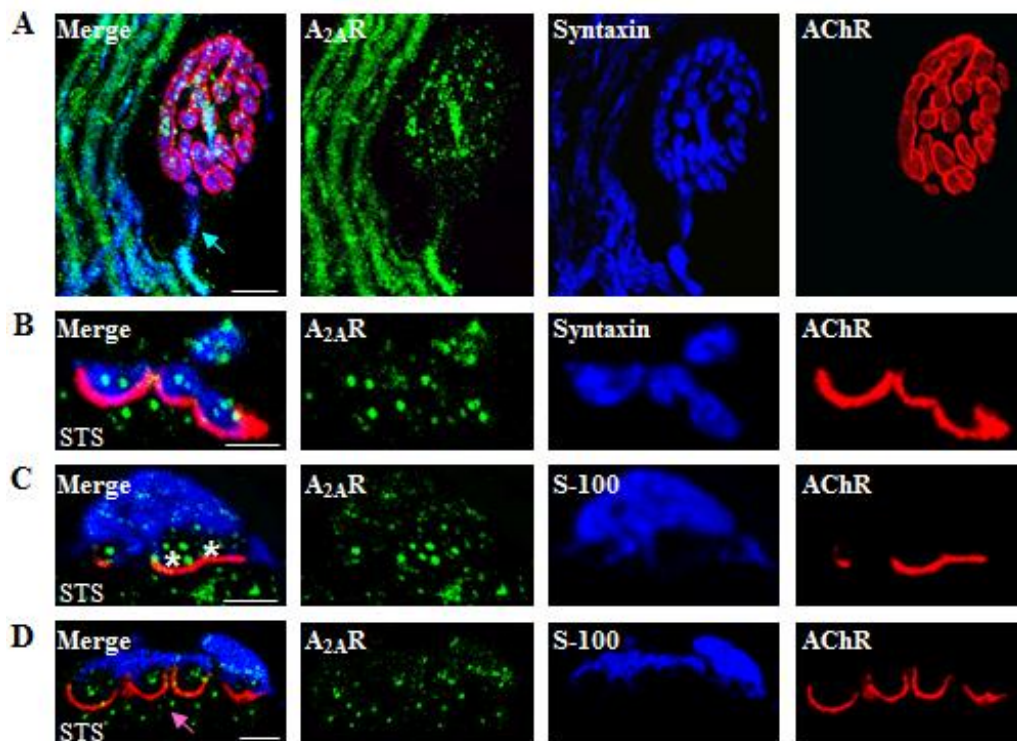


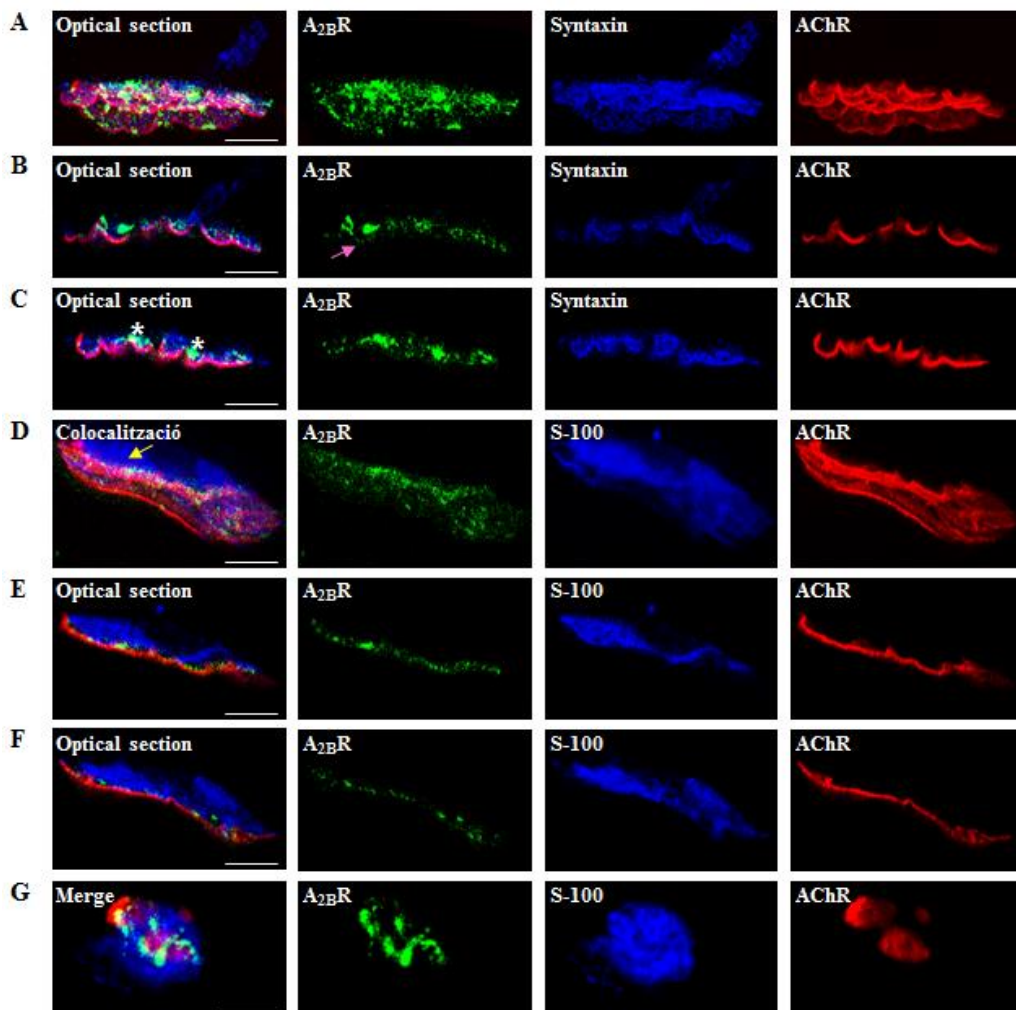
Figura R.7. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2A} (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30. (Peu de figura de la pàgina anterior). Immunohistoquímica convencional (**figura R.7A**) i d'alta resolució (STS) (**figures R.7B-D**), usant l'anticòs monoclonal de ratolí de Millipore (05-717). En la **figura R.7A**, s'observa gran coincidència amb la syntaxina el que indica marca positiva del receptor en el recorregut axonal i en l'axó preterminal (*fletxa blava*). Es confirma aquesta localització en la **figura R.7B** on s'aprecia un granulat intens que coincideix lleugerament amb la syntaxina mostrant marca del receptor en el terminal i en l'axó preterminal. El receptor A_{2A} es localitza en la part central dels terminals nerviosos syntaxina positiva sense ocupar la totalitat de l'àrea, ocupant la part de l'espai corresponent al terminal nerviós comprès entre la CS i la membrana postsinàptica rica en nAChRs (**figura R.7C**, *asteriscs blancs*). En les **figures R.7C i R.7D** s'observa marca granular per sota dels nAChRs indicant marca subsarcolèmica postsinàptica (*fletxa rosa*). En la major part de les sinapsis no s'observa coincidència entre el receptor i la proteïna S-100, però en algunes sinapsis, escasses, es pot observar una marca dèbil i fina, quasi imperceptible, ocupant l'espai de l'S-100 (veure exemples, **figures R.7C i R.7D**). Barra d'escala: 10 μm . En la **figura R.7E**, es mostra un resum de la localització positiva del receptor A_{2A} en la NMJ adulta. Esquema adaptat de la publicació de Lanuza i cols. (2014).

2.3 Localització del receptor d'adenosina A_{2B} en el múscul LAL adult

El receptor A_{2B} està present en la NMJ adulta. Per determinar la seva localització cel·lular s'ha realitzat una immunohistoquímica convencional utilitzant l'anticòs policlonal de conill de Millipore (AB1589P) i l'anticòs policlonal de cabra de Santa Cruz (sc-7506). Els dos anticossos utilitzats han donat el mateix patró de localització. S'ha marcat en verd el receptor A_{2B} , en blau la syntaxina (**figures R.8A-C**) o bé l'S-100 (**figures R.8D-G**), i en vermell els nAChRs. Per les imatges colocalitzades **R.8A i R.8D** es mostren dues seccions òptiques d'una NMJ **R.8B-C**, i **R.8E-F**, respectivament. En la **figura R.8A** s'observa una marca molt fina lineal que penetra en els plecs postsinàptics, indicant marca en la cèl·lula muscular postsinàptica. Per confirmar aquesta localització, en les seccions òptiques de les **figures R.8B i R.8C** ens permeten veure una imatge en posició lateral on es mostra una línia positiva molt fina que coincideix amb dels plecs postsinàptics, confirmant la presència d'aquest receptor en la membrana postsinàptica (*fletxa rosa de la imatge verda*, **figura R.8B**). A més a més, els *asteriscs blancs* mostren una forta coincidència en forma granular del receptor A_{2B} amb l'àrea de la syntaxina, indicant marca positiva en els terminals nerviosos (**figura R.8C**).

La *fletxa groga* assenyala que no s'aprecia coincidència de la proteïna S-100 amb el receptor, el que indica que no hi ha marca del receptor A_{2B} en la CS terminal ni preterminal (**figura R.8D**). En les **figures R.8E i R.8F** es presenten dues seccions òptiques obtingudes de la sinapsi **R.8D**. En aquestes seccions òptiques es corrobora que no hi ha colocalització entre les dues proteïnes (A_{2B} R i S-100), indicant que no hi ha presència d'aquesta proteïna en la CS.

En les mateixes figures, es pot veure una línia fina granulada corresponent a l'àrea entre els nAChRs de color vermell i la CS terminal de color blau que correspon a la regió del terminal nerviós (**figures R.8D-F**), coincidint amb la marca trobada en el terminal nerviós per l'anticòs de *Millipore* (*AB1589P*). En la **figura R.8G**, s'observen marques de color groc que sorgeixen del solapament del color verd i vermell el que mostren que el receptor es localitza en la cèl·lula muscular, just en l'àrea dels plecs postsinàptics. En la mateixa figura es pot veure immunoreactivitat del receptor A_{2B} en els botons terminals. Per tant, veient les imatges obtingudes s'arriba a la conclusió, que el receptor d'adenosina A_{2B} es troba present en el component presinàptic i postsinàptic però no en la CS en la NMJ adulta.



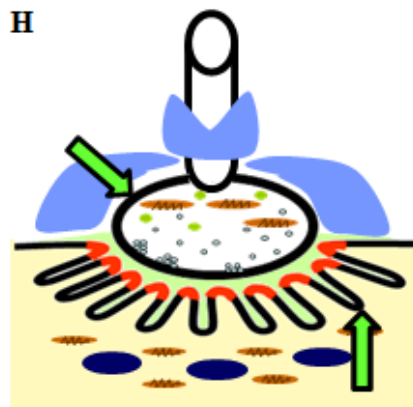


Figura R.8. Triple marcatge del receptor d'adenosina A_{2B} (en verd) amb la sintaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30. Immunohistoquímiques convencionals amb l'anticòs policlonal de conill de *Millipore* (AB1589P) (figures R.8A-C) i l'anticòs policlonal de cabra de *Santa Cruz* (sc-7506) (figures R.8D-G). Per les imatges colocalitzades R.8A i R.8D es mostren dues seccions òptiques d'una NMJ R.8B-C i R.8E-F, respectivament. En la imatge colocalitzada de la figura R.8A es mostra un filament granulat verd que coincideix amb la línia dels nAChRs, mostrant marca en la cèl·lula muscular postsinàptica. En les seccions òptiques R.8B i R.8C s'evidencia una gran coincidència del receptor amb la sintaxina mostrant marca en els terminals. Concretament en la figura R.8B, la fletxa rosa de la imatge en verd confirma la presència d'aquesta proteïna en la membrana postsinàptica. Els asteriscs blancs de la figura colocalitzada R.8C, confirmen la presència del receptor en els terminals nerviosos. No s'aprecia colocalització entre la proteïna S-100 i el receptor, el que indica que no hi ha presència del receptor en la CS (fletxa groga, figura R.8D). En les figures R.8E i R.8F s'observa un fil granulat en l'espai entre els nAChRs i l'S-100, el que ens mostra marca positiva en el terminal nerviós igual que en el cas de l'anticòs de *Millipore* (AB1589P). En la figura R.8G, es veu un cúmul dens de color groc fruit del solapament del color verd i vermell, el que ens indica marca en la cèl·lula muscular postsinàptica coincidint amb la marca de l'anticòs de *Millipore* (AB1589P). També s'aprecia en la mateixa figura, immunoreactivitat en els botons terminals. Barra d'escala: 10 μ m. En la figura R.8H es mostra un resum de la localització positiva del receptor A_{2B} en la NMJ adulta. Esquema adaptat de la publicació de Lanuza i cols. (2014).

2.4 Localització del receptor d'adenosina A_3 en el múscul LAL adult

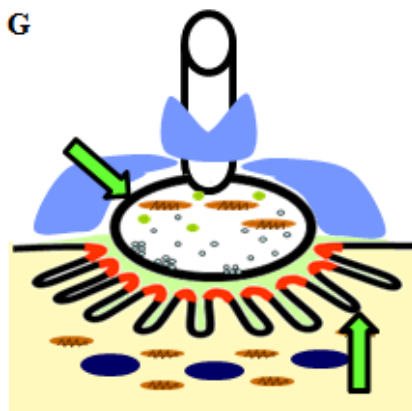
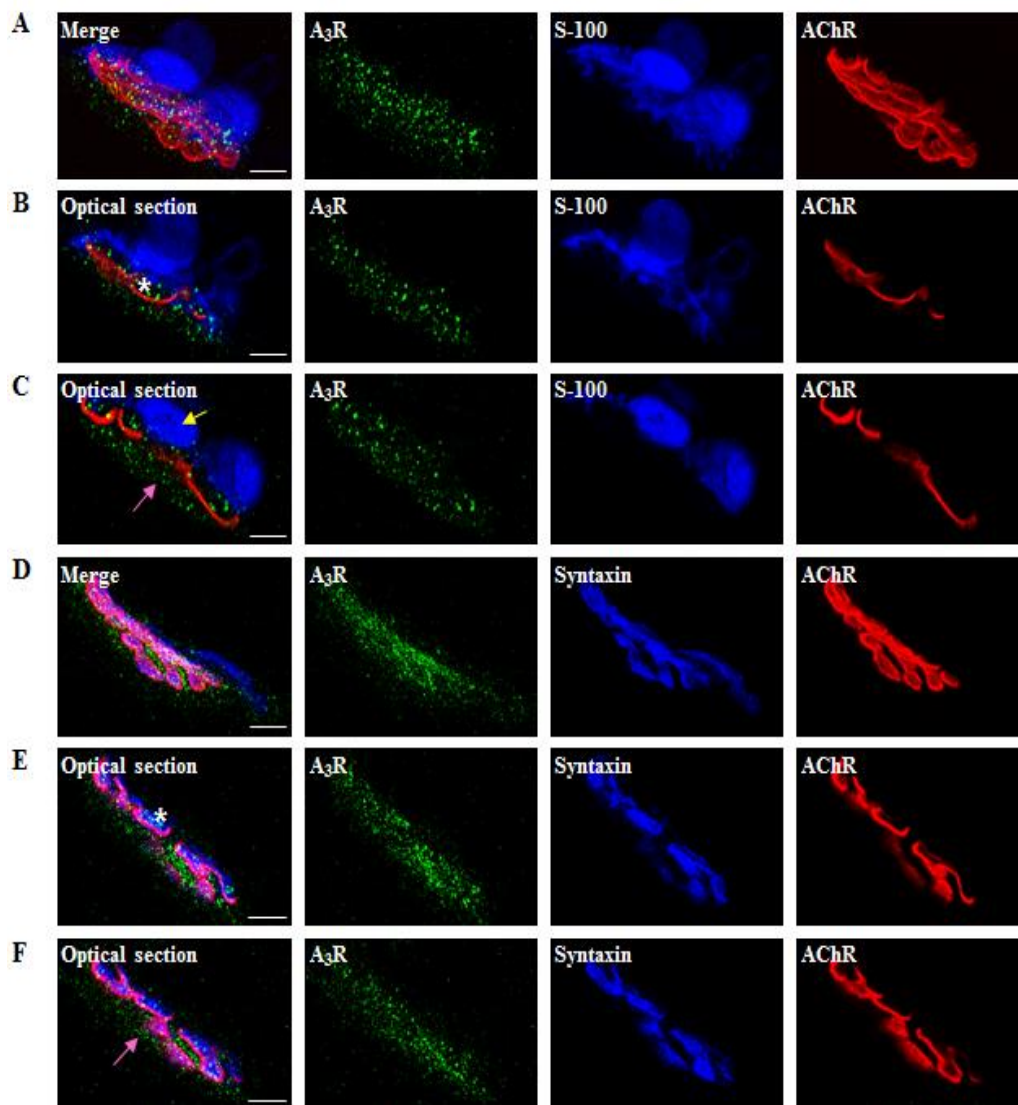
En les immunohistoquímiques convencionals de la figura R.9 es mostra la localització del receptor A_3 en la NMJ adulta, on s'han utilitzat dos anticossos policlonals de conill de dues cases comercials diferents: l'anticòs de *Millipore* (AB1590P) (figures R.9A-C) i l'anticòs de *Santa Cruz* (sc-13938) (figures R.9D-F). Els dos anticossos utilitzats mostren la mateixa localització en la NMJ. Com en tots els casos anteriors també s'ha realitzat triple marcatge, es presenta el receptor A_3 en verd, l'S-100 (figures R.9A-C) o bé la sintaxina (figures R.9D-F) en blau, i els nAChRs en vermell.

En la primera immunohistoquímica s'observa un granulat fi intens que penetra entre els nAChRs i la CS que correspon als terminals nerviosos. Per confirmar aquesta localització, es van realitzar dues seccions òptiques (figures R.9B i R.9C) de la sinapsi R.9A. L'asterisc

blanc assenyala un granulat verd situat entre la línia postsinàptica i la CS terminal, el que indica marca en el terminal nerviós (**figura R.9B**). En la secció òptica de la **figura R.9C** es pot veure un granulat difós distribuït per sota de la línia postsinàptica, mostrant immunoreactivitat en l'àrea subsarcolèmica postsinàptica (*fletxa rosa*). S'ha colocalitzat el receptor A₃ amb l'S-100 i es pot apreciar que no hi ha coincidència entre aquestes dos proteïnes, el que indica que aquest receptor no es troba present en la CS (*fletxa groga*, **figura R.9C**).

La vista lateral de la NMJ de la **figura R.9D** mostra una alta coincidència del receptor amb la syntaxina, el que indica marca positiva en el component presinàptic concretament en el terminal nerviós. Per confirmar aquesta localització s'han realitzat dues seccions òptiques (**figures R.9E i R.9F**) de la sinapsi **R.9D**. L'*asterisc blanc* de la secció òptica assenyala un fil granulat intens que penetra entre els plecs postsinàptics indicant marca positiva en els terminals nerviosos (**figura R.9E**), corroborant la marca de l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*). En la mateixa figura no s'aprecia marca verda per sobre de la syntaxina, el que es pot concloure que el receptor A₃ no es localitza en la CS. La secció òptica de la **figura R.9F** permet veure amb més claredat cúmuls difosos per sota dels nAChRs, el que indica marca subsarcolèmica postsinàptica (*fletxa rosa*) igual que en el cas de l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*). Aparentment doncs, segons els resultats obtinguts, el receptor A₃ es situa principalment en el component presinàptic i postsinàptic de la NMJ adulta però no en la CS.

Figura R.9. Triple marcatge del receptor d'adenosina A₃ (en verd) amb la syntaxina o l'S-100 (en blau) i els nAChRs (en vermell) en músculs LALs P30. (Veure la figura a la pàgina següent). Immunohistoquímica convencional usant dos anticossos policlonals de conill de dues cases comercials diferents: l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*) (**figures R.9A-C**) i l'anticòs *Santa Cruz* (*sc-13938*) (**figures R.9D-F**). Les **figures R.9B-C i R.9E-F** són dues seccions òptiques de les sinapsis **R.9A i R.9D**, respectivament. En la **figura R.9A** s'observa un granulat difós entre els plecs postsinàptics i la proteïna S-100, el que indica marca positiva en el terminal nerviós. De forma més clara, es veu en la secció òptica (*asterisc blanc*, **figura R.9B**). En la secció òptica de la **figura R.9C** no s'observa coincidència entre la marca verda del receptor i l'S-100 el que mostra que no hi ha immunoreactivitat d'aquesta proteïna en la CS (*fletxa groga*). En la mateixa figura, s'aprecia un granulat intens per sota de la línia postsinàptica, el que ens indica marca en l'àrea subsarcolèmica postsinàptica (*fletxa rosa*). En la **figura R.9D**, s'observa un fil granulat que coincideix amb la marca de la syntaxina confirmant la marca en el terminal nerviós, igual que en el cas que l'anticòs de *Millipore* (*AB 1590P*). Aquesta marca es corrobora amb més claredat en la secció òptica de la **figura R.9E** (*asterisc blanc*). No s'observa marca per sobre de la syntaxina, el que ens indica que no hi ha immunoreactivitat d'aquesta proteïna en la CS (**figura R.9E**). En la secció òptica de la **figura R.9F** s'aprecia marca granulada per sota dels nAChRs, mostrant marca en l'àrea subsarcolèmica postsinàptica (*fletxa rosa*). Barra d'escala: 10 µm. En la **figura R.9G** es mostra un resum de la localització positiva del receptor A₃ en la NMJ adulta. Esquema adaptat de la publicació de Lanuza i cols. (2014).



En resum, segons els resultats obtinguts per la tècnica de la immunohistoquímica es mostra que els receptors d'adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) es troben presents en les cèl·lules que conformen la NMJ. Principalment es localitzen en el terminal nerviós, sent una condició necessària per realitzar els estudis electrofisiològics i estudiar la possible participació d'aquests receptors en la modulació de l'alliberació de neurotransmissor.

3. EXPERIMENTS FUNCIONALS

Com s'ha comentat en l'apartat de la *Introducció*, existeixen estudis pioners que han mostrat que l'adenosina, i l'ATP alliberat pels terminals nerviosos modulen el metabolisme presinàptic a través dels autoreceptors d'adenosina i els P2 (**Correia-de-Sá i cols., 1991**). No obstant, la majoria d'aquests estudis funcionals s'han realitzat en condicions de registre interferint directament en la fisiologia de la sinapsi. En aquesta tesi, una vegada s'ha detectat la presència dels receptors d'adenosina en els nervis terminals mitjançant la immunohistoquímica (veure l'apartat 2 de *Resultats*), el següent objectiu proposat ha sigut estudiar l'acoblament dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió amb la fisiologia de la sinapsi plenament operativa i intacte. En tots els experiments s'ha bloquejat la contracció amb la neurotoxina μ -CgTx GIIB, i en alguns casos que s'ha cregut oportú, s'ha usat conjuntament amb el BTS. Com s'ha mencionat en la *Introducció* s'ha descrit que els receptors d'adenosina són pleiotròpics i s'ha trobat interessant estudiar la relació dels receptors d'adenosina amb altres vies de senyalització que participen en el control de la neurotransmissió. Per dur a terme aquests objectius, s'han fet diversos tipus d'experiments electrofisiològics que es descriuen a continuació en diferents blocs: (1) s'ha estudiat l'acoblament dels receptors d'adenosina en l'alliberació evocada en condicions basals (a 1 Hz). Per poder estimar el contingut quàntic pel mètode directe, s'ha registrat simultàniament i intracel·lularment els EPPs i els espontanis (mEPPs), que es veuran més endavant en l'apartat 5; (2) s'ha analitzat la possible implicació cooperativa dels receptors d'adenosina en la modulació de l'alliberació de transmissor durant una intensa activitat repetitiva i esgotadora (registres de trens a 40 o 100 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*); (3) s'ha analitzat la possible facilitació *o pair pulse* estimulant a 40 Hz; (4) s'ha estudiat la relació funcional dels receptors d'adenosina amb altres vies de senyalització que participen en el control de la neurotransmissió en l'alliberació evocada i espontània. Cal anotar que un dels objectius principals d'aquesta tesi és l'estudi dels receptors d'adenosina, en concret els receptors A_1 i A_{2A} , en la neurotransmissió. En alguns experiments s'ha estudiat la

implicació dels receptors A_{2B} i A_3 per tenir un punt de vista més global i comparatiu, i per conèixer de forma general la funció dels receptors d'adenosina en la NMJ adulta.

En els experiments electrofisiològics realitzats s'ha utilitzat la preparació neuromuscular del LAL adult, muntada en una camareta de registre on després s'incuben les diferents substàncies o proteïnes, com per exemple diferents antagonistes i agonistes purinèrgics, els efectes dels quals es volen avaluar. En alguns casos s'han realitzat experiments de dobles incubacions com una eina farmacològica per investigar el possible efecte oclusiu o additiu entre els receptors d'adenosina o bé, amb altres vies de senyalització. En tots els experiments s'han registrat un mínim de 15 fibres musculars control i 15 fibres experiments, excepte en els experiments d'activitat sinàptica que es registren 8-10 fibres en total, i s'han utilitzat 5-8 músculs per substància estudiada mantenint en tot moment la funció sinàptica preservada.

El procediment i la metodologia emprada, així com l'elecció del mètode de prevenció de la contracció s'han descrit i discutit (més endavant) en els apartats de *Materials i Mètodes* i a la *Discussió*. A més a més, en l'apartat 10.11 de *Materials i Mètodes* es mostra descrita la nomenclatura completa, la concentració *stock* i de treball i el tipus de cada substància utilitzada en aquesta tesi. A continuació, es mostren els resultats obtinguts per aquesta metodologia en diferents blocs d'apartats. Com s'ha mencionat en l'apartat de *Materials i Mètodes* els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, en la majoria de casos són expressats com % de variació definit com: $[\text{valor final/valor inicial}] \times 100$.

4. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA

El primer objectiu dels experiments funcionals és estudiar la participació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada. Per dur a terme aquest objectiu, s'han utilitzat moduladors exògens inespecífics i específics així com, un anàleg de l'adenosina, la 2-cloroadenosina, i l'enzim adenosina deaminasa. Aquests estudis s'han realitzat en condicions normals on únicament s'estimula el nervi (a 1 Hz) per analitzar l'alliberació evocada d'acetilcolina i s'ha mantingut la funció sinàptica preservada en tot moment. A continuació, s'exposen els resultats obtinguts.

4.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada

4.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada

Per conèixer l'acció global dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada s'ha realitzat diferents experiments electrofisiològics. En primer lloc, s'ha bloquejat completament tots els receptors amb un antagonista inespecífic, 8-SPT (100 μ M). En la **figura R.10** es mostra que la incubació no específica dels receptors d'adenosina no modifica el contingut quàntic (% de variació: 2.00 ± 7.22 ; *primera columna*).

Seguint aquesta línia d'estudi s'ha avaluat l'efecte de l'estimulació inespecífica dels receptors d'adenosina amb l'addició exògena de l'adenosina (ADO). Donat que, segons la bibliografia s'ha descrit que l'ADO pot treballar de forma bifàsica si s'usa a concentracions nanomolars o micromolars (**Pousinha i cols., 2010**), en aquest treball s'ha realitzat experiments a concentracions 300 nM, 10 i 25 μ M. Sorprenentment, en les nostres condicions experimentals no s'ha observat variació en el contingut quàntic (% de variació de l'ADO (300 nM): 9.15 ± 2.60 ; de l'ADO (10 μ M): 9.07 ± 1.20 ; de l'ADO (25 μ M): 15.79 ± 2.20 , *columnnes 2-4*). No obstant, els experiments descrits segons la bibliografia usen *d-tubocurarine* o bé concentracions d'alt Mg^{+2} en la solució fisiològica per bloquejar la contracció muscular, i a diferència de nosaltres, si que obtenen resultats amb l'ADO (**Pousinha i cols., 2010**). Així que degut a aquestes discrepàncies, s'ha decidit estudiar l'efecte d'aquest estimulador inespecífic evitant la contracció amb altes concentracions de Mg^{+2} (5 mM) en la solució fisiològica o bé amb el pretractament del *d-tubocurarine* (0.7 μ M). En aquestes condicions, s'ha vist que es canvia directament la fisiologia de la sinapsi: el Mg^{+2} produeix una reducció en l'alliberació d'acetilcolina, i el *d-tubocurarine* intervé en els nAChRs i els mAChRs, i també pot unir-se a antagonistes i donar efectes al·lostèrics (**Ferry i Kelly, 1988; Santafé i cols., 2006**) (per a més informació sobre l'elecció del mètode de prevenció de la contracció veure l'apartat 10.3 a *Materials i Mètodes* o més endavant en l'apartat 2.1 de la *Discussió*). En canvi, tal i com s'ha treballat en aquest estudi evitant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB, no s'ha alterat la funció normal de la sinapsi neuromuscular. En la **figura R.10** (*columnnes 5 i 6*) es mostra com evitant la contracció amb altes concentracions de Mg^{+2} o bé amb *d-tubocurarine*, l'ADO a concentracions micromolars (25 μ M) redueix el contingut quàntic tal i com prèviament s'havia descrit (**Ginsborg i Hirst, 1972; Ribeiro i Walker, 1975; Pousinha i cols., 2010**) (% de variació de l'ADO (25 μ M) amb alt Mg^{+2} : 46.65 ± 9.04 ; % de variació de l'ADO (25 μ M) en presència de *d-tubocurarine*: 37.12 ± 3.23). A més, en la mateixa **figura R.10** es mostra uns exemples de registres de l'ADO (25 μ M) evitant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB (1-3 μ M) o bé amb el

d-tubocurarine (0.7 μ M).

En resum, en condicions en les quals la funció sinàptica no està alterada (bloquant la contracció muscular amb la μ -CgTx GIIIB), el bloqueig o l'estimulació inespecífica dels receptors d'ADO no modifica el contingut quàntic. En canvi, si modifiquem directament la seva fisiologia (prevenint la contracció amb altes concentracions de Mg^{+2} o bé amb el *d*-tubocurarine), l'ADO a concentracions micromolars indueix una disminució en l'alliberació evocada.

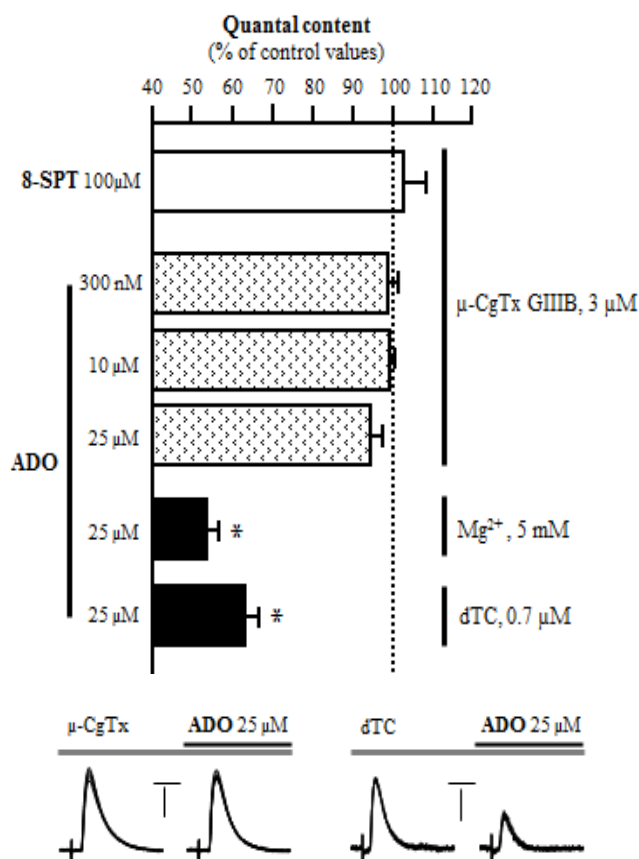


Figura R.10. Modulació inespecífica en la neurotransmissió evocada. L'histograma mostra que el bloqueig no selectiu (8-SPT, 100 μ M) o l'estimulació inespecífica a diferents concentracions (ADO 300 nM, 10 i 25 μ M; columnnes 2-4), en músculs paralitzats amb la μ -CgTx GIIIB no modifica l'alliberació evocada d'acetilcolina. En canvi, en una situació de reducció de la secreció de neurotransmissor amb altes concentracions de Mg^{+2} (5 mM) o bé, bloquejant els nAChRs amb *d*-tubocurarine (dTC; columnnes negres), l'ADO a altes concentracions redueix el contingut quàntic. Per a cada columna: n = 5 músculs i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, * P < 0.05 respecte als valors inicials (línia puntejada). A sota, es mostra la superposició d'episodis evocats obtinguts des de la mateixa fibra abans i després de l'addició de l'ADO (25 μ M) bloquejant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB (esquerra) i amb el dTC (dreta). Barra d'escala horitzontal: 5 ms i verticals: 10 mV (esquerra) i 2 mV (dreta).

4.1.2 Modulació del receptor A₁ en la neurotransmissió evocada

Veient que bloquejant i estimulants inespecíficament no es modificava l'alliberació evocada d'acetilcolina, s'ha valorat el possible efecte individual de dos tipus de receptors d'ADO presents. En la **figura R.11** es mostra que el bloqueig específic del receptor A₁ amb l'antagonista DPCPX (100 nM) no modifica el contingut quàntic (% de variació: 8.12 ± 9.66). De la mateixa manera, s'ha valorat el possible efecte de l'estimulació específica del receptor A₁ amb l'agonista selectiu CCPA (1 μ M) i tampoc afecta a l'alliberació evocada (% de variació: 6.51 ± 6.49). En resum, la modulació específica del receptor A₁ no modifica el contingut quàntic (veure *columnnes 1 i 2*).

4.1.3 Modulació del receptor A_{2A} en la neurotransmissió evocada

Com s'ha pogut veure, l'efecte de l'estimulació i la inhibició inespecífica dels receptors d'ADO no s'ha observat canvis significatius en l'alliberació evocada, així com tampoc en la modulació del receptor A₁. Seguint amb aquesta línia d'estudi, s'ha decidit estudiar l'efecte del bloqueig del receptor A_{2A} amb l'antagonista específic SCH-58261 (50 nM) així com, l'estimulació selectiva d'aquest receptor amb l'agonista específic CGS-21680 (1 μ M) en experiments independents. En els dos casos no s'ha observat cap canvi significatiu en el contingut quàntic (% de variació: 1.66 ± 7.42 i 1.89 ± 7.29 , respectivament; **figura R.11**, *columnnes 3 i 4*). Per tant, la modulació específica del receptor A_{2A} no modifica l'alliberació evocada.

4.1.4 Efecte de la inhibició específica dels receptors A_{2B} i A₃ en la neurotransmissió evocada

En els estudis de localització realitzats, s'ha confirmat la presència dels receptors A_{2B} i A₃ en els nervis terminals de la NMJ adulta (veure l'apartat 2.3 i 2.4 dels *Resultats*), sent una condició necessària per la seva participació directa en la neurotransmissió. Així que s'ha estudiat la possible participació dels receptors A_{2B} i A₃ en l'alliberació evocada inhibint-los en experiments independents. L'histograma (*columnnes 5 i 6*) i els exemples de registres evocats de la **figura R.11** evidencien que el bloqueig específic del receptor A_{2B} amb l'antagonista MRS1706 (100 nM) i el bloqueig del receptor A₃ amb l'antagonista MRS1334 (100 nM) no modifiquen el contingut quàntic (% de variació pel MRS1706: 10.14 ± 29.60 i pel MRS1334: 10.02 ± 29.43). Per tant, es pot concloure que aquests receptors (A_{2B} i A₃) no es troben acoblats en l'alliberació evocada tot i ser presents en la NMJ.

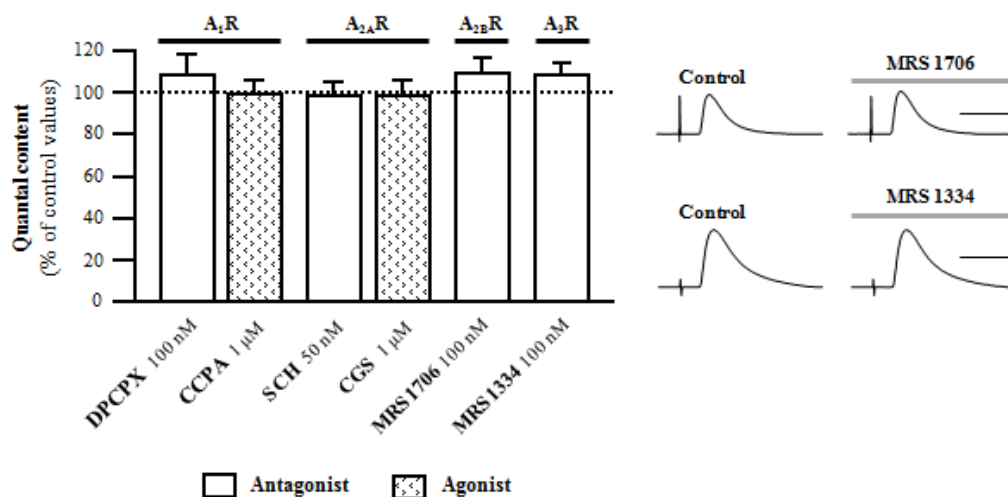


Figura R.11. Modulació específica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada. L'histograma mostra que l'efecte dels moduladors específics (antagonistes *columnnes blanques* i agonistes *columnnes farcides*) dels receptors d'ADO no modifiquen l'alliberació evocada en condicions normals (a 1 Hz). Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM. A la dreta, exemples de registres d'EPPs on es mostra la falta d'efecte del bloqueig del receptor A_{2B} (a dalt) i A₃ (a baix), abans i després d'afegir la substància purinèrgica. Barra d'escala horitzontal: 5 ms i vertical: 10 mV.

4.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) en la neurotransmissió evocada

La manca de resultats obtinguts afegint agents moduladors externs, ens ha fet pensar que possiblement l'ADO endògena era suficient per mantenir els receptors ocupats. Per aquest motiu, s'ha estudiat l'efecte de l'ADO endògena en l'alliberació evocada. Amb aquesta finalitat, s'ha realitzat experiments amb l'enzim adenosina deaminasa (ADA, 2 U/ml) que hidrolitza l'ADO en inosina inactivant-la. Experimentalment, la incubació de l'ADA no produeix variació en el contingut quàntic (% de variació 1.07 ± 6.50). En la **figura R.12** (*columnna 1*), es mostra com l'ADO endògena tampoc és responsable de modular la neurotransmissió evocada a baixa freqüència d'estímul a 1 Hz.

4.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió evocada

Com l'efecte de l'addició de l'ADO exògena i de la pròpia ADO endògena no ha modificat el contingut quàntic. A més com s'ha comentat anteriorment, l'ADO és metabòlicament inestable, està subjecta a l'absorció per les cèl·lules neuronals i gials, i a la inactivació enzimàtica ja que pot ser substrat de diversos enzims (**Clarke i cols., 1952; Phillis i Wu, 1982**). S'ha estudiat l'efecte en la neurotransmissió evocada d'un anàleg estable de

l'ADO, la 2-cloroadenosina (CADO), a dues concentracions (300 nM i 10 µM). La CADO s'ancora als P1Rs com l'ADO endògena, però aquest s'uneix irreversiblement al receptor i no es pot catabolitzar (Daly, 1982) tenint menys afinitat pel metabolisme d'absorció que l'ADO (Jarvis i cols., 1985). La CADO, promou un efecte prolongat en els receptors. Els nostres resultats han mostrat que la CADO (300 nM) no modifica l'alliberació evocada (% de variació: 7.13 ± 9.03), mentre que la CADO (10 µM) causa una disminució del contingut quàntic (% de variació: 34.44 ± 3.57 , figura R.12) (veure columnes 2 i 3). En estudis recents s'ha descrit que en altres vies de senyalització, com per exemple el receptor de les neurotrofines Trk (de l'anglès *Tropomyosin-related kinase*), una vegada la neurotrofina s'ha unit al receptor, el receptor pot ser ràpidament marcat i endocitat per la via de senyalització de les ubiquitinases (Arévalo i cols., 2006). I posteriorment, la via de l'endocitosi del Trk pot seguir dues vies alternatives es pot donar el seu *trafficking* a lisosomes o bé pot ser reciclat i tornar a la membrana plasmàtica. La via degradativa a lisosomes es caracteritza per una *down-regulation* del nombre total de receptors de superfície cel·lular i una disminució de la resposta al lligand (Chen i cols., 2005). En general, el reciclatge dels receptors a la membrana pot promoure la resensibilització i la prolongació d'esdeveniments de senyalització específics, és a dir, es facilita la recuperació de la resposta cel·lular amb el subseqüent estímul de l'agonista (Ferguson, 2001). Segons la literatura, s'han descrit alguns receptors de superfície cel·lular com el receptor de la transferrina, que es reciclen a la superfície de membrana via *bulk membrane flow*. O bé, certs receptors acoblats a proteïnes G, com els receptors de dopamina D1, que són internalitzats i poden ser ràpidament reciclats i ser eficients en la membrana plasmàtica (Dumartin i cols., 1998). Encara que tot i així, el mecanisme pel qual aquests receptors són internalitzats i són eficientment reciclats no és conegut amb profunditat (Vargas i von Zastrow, 2004; Arévalo i cols., 2006). Per tant, en el nostre cas tal i com passa amb el Trk i el receptor de dopamina D1, és possible que al haver-hi més concentració de CADO (10 µM) s'acceleri el *turnover* proteic amb un resultat net de menys receptors operatius i al no activar tant la neurotransmissió es produeixi aquesta inhibició. A més, aquest resultat pot revelar que els receptors d'ADO tinguin un paper negatiu en l'alliberació de transmissor, com prèviament s'ha descrit (Di Angelantonio i cols., 2011; Pousinha i cols., 2012).

A continuació, s'estudiarà quins receptors d'ADO es troben implicats en l'efecte de la CADO mitjançant experiments de dobles incubacions (veure el protocol detallat de les dobles incubacions a l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

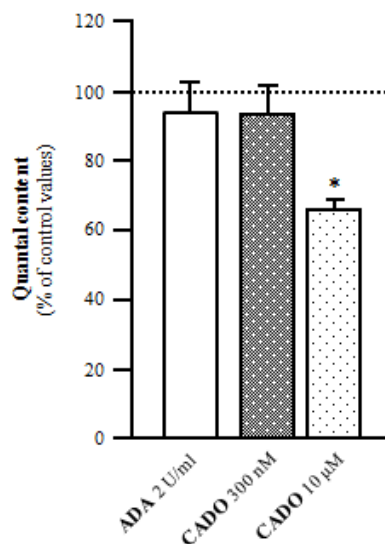


Figura R.12. Efecte de l'adenosina endògena i de la CADO en la neurotransmissió evocada. L'eliminació de l'ADO endògena amb l'enzim ADA (*columna blanca*), ni l'efecte prolongat de l'anàleg de l'ADO a baixes concentracions, la CADO (300 nM) (*columna negra*), no induïx canvis en l'alliberació evocada, mentre que la CADO a altes concentracions (10 µM) (*columna puntejada*) disminueix el contingut quàntic. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, * $P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

4.3.1 Efecte de la CADO a concentracions micromolars en la neurotransmissió evocada quan els receptors d'adenosina estan bloquejats

En els experiments de l'apartat anterior s'ha observat que la CADO (10 µM) té un efecte inhibitori. A continuació, s'ha estudiat l'efecte de la CADO (10 µM) en presència d'un bloquejador inespecífic dels receptors d'ADO com és el 8-SPT (100 µM). En aquestes condicions, no es produeix una modificació en el contingut quàntic (% de variació: 17.82 ± 5.67 ; **figura R.13**, *columna 6*). La CADO no pot activar als receptors d'ADO degut a que tots els receptors d'ADO estan bloquejats amb el 8-SPT. Per tant, si bloquegem inespecíficament els receptors d'ADO no es produeix una modificació en l'alliberació evocada. El següent pas serà estudiar l'efecte de cada receptor per separat.

En primer lloc, s'ha bloquejat el receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX (100 nM) i després s'ha incubat amb la CADO (10 µM) on s'ha observat una reducció del contingut quàntic (% de variació: 26.62 ± 0.05 , **figura R.13**, *columna 8*). Possiblement, la CADO al unir-se als receptors lliures fa que s'acceleri el *turnover* proteic i aquest faci disminuir l'alliberació.

En segon lloc, seguint el mateix procediment i en les mateixes condicions experimentals, s'ha estudiat l'efecte de la CADO (10 µM) en presència del bloquejador específic SCH-58261 (50 nM). Igual que en el cas anterior, hi ha una reducció del contingut quàntic (% de variació: 34.68 ± 4.18 , **figura R.13**, *columna 10*). Possiblement, la CADO s'uneix al receptor A_1 activant-lo i això fa que es redueixi l'alliberació o bé, la CADO s'uneix

als receptors que van quedant lliures i s'accelera el *turnover* fent disminuir l'alliberació evocada.

En resum, la CADO després del bloqueig inespecífic dels receptors d'ADO no té efecte en l'alliberació, mentre que després del bloqueig selectiu del receptor A_1 o bé del receptor A_{2A} es redueix l'alliberació evocada.

4.3.2 Efecte de la CADO a concentracions nanomolars en la neurotransmissió evocada quan els receptors d'adenosina estan bloquejats

De la mateixa manera que s'ha estudiat la CADO (10 μM), en experiments paral·lels s'ha avaluat la CADO (300 nM) en presència del 8-SPT (100 μM). En aquest cas, no s'ha observat una modificació en l'alliberació evocada (% de variació: 4.94 ± 3.33 , [figura R.13](#), *columna 7*). Per tant, la CADO en presència d'un antagonista inespecífic no modifica el contingut quàntic.

També, s'ha estudiat l'efecte de la CADO (300 nM) en presència dels bloquejadors selectius dels receptors d'ADO. En aquestes condicions, la CADO (300 nM) en presència del DPCPX (100 nM), bloquejador del receptor A_1 , o bé de l'SCH-5261 (50 nM), bloquejador del receptor A_{2A} , no modifica el contingut quàntic (% de variació: 18.32 ± 6.57 i 8.02 ± 2.60 , respectivament; [figura R.13](#), *columnes 9 i 11*). És probable que la CADO a aquestes concentracions siguin insuficients per activar als receptors, perquè en presència dels antagonistes específics dels receptors A_1 o A_{2A} , inclús del bloqueig de tots els receptors d'ADO, no modifiquen el contingut quàntic.

En resum, en aquest apartat s'ha evidenciat que inhibint o estimulants els receptors d'ADO inespecíficament o específicament en condicions en les quals s'ha mantingut la maquinària sinàptica intacte, no es modifica l'alliberació d'acetilcolina evocada. Però pel contrari, si modifiquem la fisiologia de la sinapsi (bloquejant la contracció amb altes concentracions de Mg^{+2} o amb el pretractament *d-tubocurarine*), l'ADO (25 μM) provoca una disminució en l'alliberació evocada com prèviament s'havia descrit. A conseqüència dels resultats obtinguts, s'ha estudiat si l'ADO endògena era suficient per mantenir els receptors ocupats en la neurotransmissió evocada utilitzant l'enzim ADA que transforma l'ADO en inosina. Els resultats confirmen, que en les nostres condicions, l'ADO endògena no és responsable de modular la neurotransmissió evocada i que els receptors d'ADO no es troben acoblats a la neurotransmissió evocada. Donat que l'ADO és susceptible a ser ràpidament metabolitzada i no té efecte en l'alliberació evocada, s'ha estudiat l'efecte prolongat de l'anàleg CADO en la neurotransmissió. S'ha observat que a concentracions nanomolars no es

modifica el contingut quàntic, mentre que a concentracions altes (micromolars) té un efecte inhibitori.

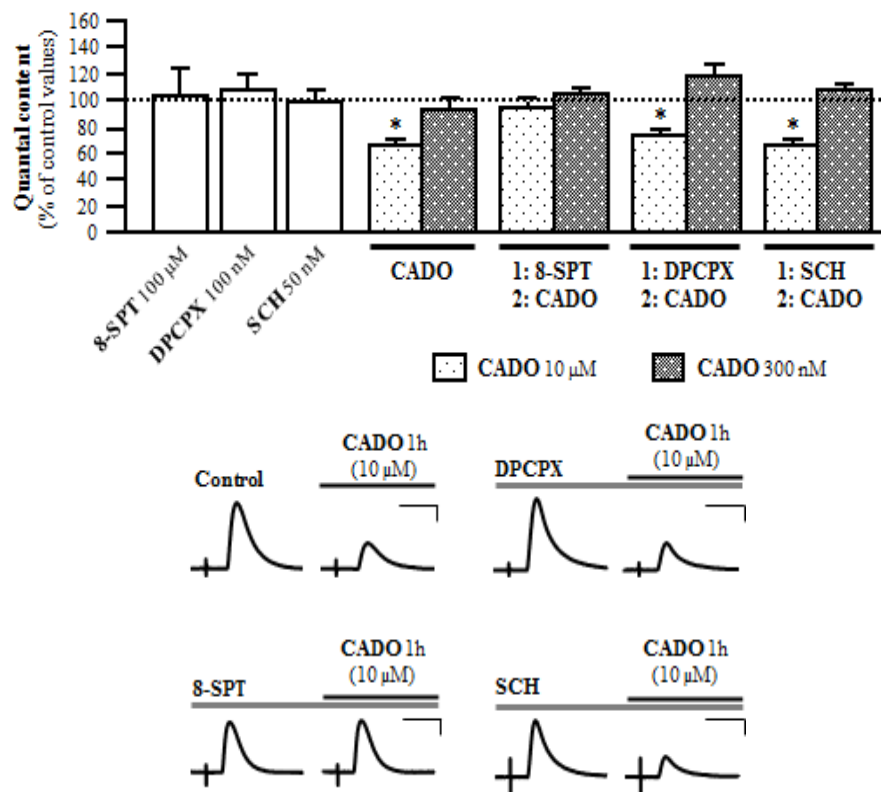


Figura R.13. Efecte de la CADO 10 μM i 300 nM en presència dels bloquejadors purinèrgics en neurotransmissió evocada. A l'esquerra (*columnes blanques*), efecte independent de cada substància purinèrgica en l'alliberació evocada. A continuació, l'efecte de la CADO (10 μM i 300 nM) en presència dels moduladors purinèrgics. L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra indicat en cada columna corresponent (a sota), assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La CADO a 10 μM pot reduir el contingut quàntic, inclús després del bloqueig del receptor A₁ amb el DPCPX o la inhibició del receptor A_{2A} amb l'SCH-58261, com ho pot fer en condicions salines. En canvi, la CADO a 300 nM en condicions basals i en presència dels agents moduladors no té efecte en l'alliberació evocada. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, *P > 0.05, respecte als valors inicials (línia puntejada). A sota, exemples de registres de la CADO en l'alliberació evocada (10 μM) en presència dels moduladors purinèrgics. Barra d'escala horitzontal: 5 ms i vertical 5 mV.

A més, s'ha observat que la CADO (10 μM) en presència del bloquejador inespecífic dels receptors d'ADO no afecta a l'alliberació evocada. No obstant, la CADO (10 μM) en presència dels antagonistes selectius dels receptors A₁ o A_{2A} produeix una reducció de l'alliberació evocada. Possiblement, l'efecte inhibitori de la CADO (10 μM) depèn d'un treball col·laboratiu dels receptors A₁ i A_{2A}. Un altre alternativa, però menys probable, és que la

CADO s'uneixi als receptors que van quedant lliures accelerant el *turnover* proteic produint una reducció de l'alliberació. Per un altre banda, la CADO (300 nM) en condicions basals i en presència dels antagonistes purinèrgics no té efecte en la neurotransmissió evocada, sent possiblement una concentració insuficient per activar als receptors d'ADO.

5. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA

Una vegada s'ha estudiat la participació dels receptors d'ADO en la neurotransmissió evocada a continuació, el següent objectiu proposat ha sigut estudiat la participació dels receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània. Com s'ha mencionat anteriorment, per poder estimar el contingut quàntic pel mètode directe s'ha registrat simultàniament i intracel·lularment els EPPs i els espontanis (mEPPs). El registre dels mEPPs són els episodis que apareixen de forma espontània sense la necessitat de bloquejar la contracció muscular, ni l'activació del potencial d'acció. A més en aquest apartat, en els experiments realitzats d'una sola incubació es mostra que l'amplada dels mEPPs no ha estat afectada, confirmant que tots els components purinèrgics utilitzats actuen de forma presinàptica. El procediment i l'anàlisi que s'ha seguit per dur a terme aquest experiment es mostra a l'apartat 10 de *Materials i Mètodes*.

Cal tenir present, que aquestes dues formes d'alliberació de l'acetilcolina (l'evocada i l'espontània) es regeixen per mecanismes diferents i per tant, no s'ha d'esperar una confirmació de les dades obtingudes amb els experiments evocats. S'ha registrat un mínim de 15 fibres musculars control (en el cas de dobles incubacions, registre de la primera substància) i 15 fibres experiment (o la incubació de la segona substància en presència de la primera). S'ha realitzat un mínim de 5-8 músculs per cada substància purinèrgica. Els valors s'expressen com a % de variació \pm SEM.

5.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània

5.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània

Amb la intenció de conèixer l'efecte dels receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània, s'han bloquejat tots els receptors d'ADO amb l'antagonista inespecífic 8-SPT (100 μ M) i s'ha observat un augment de la freqüència d'aparició dels mEPPs (% de increment:

35.47 ± 1.04 , **figura R.14A**, *columna 1*). Seguint el mateix procediment, s'ha estudiat l'efecte contrari amb l'addició de l'ADO exògena i s'observa que a concentracions nanomolars no es modifica la freqüència, mentre que a concentracions micromolars té un efecte inhibitori en la neurotransmissió espontània (% de variació de l'ADO (300 nM): 2.45 ± 5.37 ; % de disminució de l'ADO (10 μ M): 41.99 ± 2.50 ; de l'ADO (25 μ M): 37.6 ± 2.70 , **figura R.14A**, *columnes 2-4*). Aquests resultats preliminars indiquen que els receptors d'ADO es troben implicats en la neurotransmissió espontània, donat que tant el bloqueig com l'estimulació inespecífica augmenta i disminueix la freqüència dels mEPPs, respectivament.

5.1.2 Modulació del receptor A₁ en la neurotransmissió espontània

Al modular en conjunt tots els autoreceptors d'ADO, podem modificar la neurotransmissió espontània però no coneixem el grau de participació de cada un d'ells per separat. A continuació, es valorarà aquest punt concret. Si bloquegem específicament el receptor A₁ amb l'antagonista DPCPX (100 nM), s'observa un increment de l'alliberació espontània (% d'increment: 55.96 ± 17.53). Per un altre banda, si estímulen específicament el receptor d'ADO A₁ amb l'agonista CCPA (1 μ M) no es modifica la freqüència dels mEPPs (% de variació: 14.73 ± 9.16). Per tant, possiblement el responsable de l'increment de la freqüència dels mEPPs donat pel bloqueig no selectiu dels receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT sigui conseqüència del receptor A₁. Per confirmar aquesta afirmació el següent pas serà estudiar que succeeix si bloquegem o estímulen específicament el receptor A_{2A}. Els resultats d'aquest apartat es mostren en la **figura R.14B** (*columnes 1 i 2*).

5.1.3 Modulació del receptor A_{2A} en la neurotransmissió espontània

En l'experiment anterior, al bloquejar específicament el receptor A₁ augmenta la freqüència, possiblement sigui a causa d'aquest receptor o bé, pot ser degut a l'acció del receptor A_{2A} que està quedant lliure. Per confirmar-ho, s'ha bloquejat específicament el receptor A_{2A} amb l'antagonista específic SCH-58261 (50 nM), i en un altre experiment diferent, s'ha estimulat específicament el receptor A_{2A} amb l'agonista CGS-21680 (1 μ M). En els dos casos no s'ha observat modificació en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 2.27 ± 6.22 i 0.22 ± 6.17 , respectivament; **figura R.14B**, *columnes 3 i 4*). Resumint, possiblement el causant de l'augment de la freqüència donat pel 8-SPT sigui el receptor A₁, ja que la inhibició o l'estimulació específica del receptor A_{2A} no modifica l'alliberació espontània, únicament el bloqueig del receptor A₁. Per tant, es pot concloure que el receptor A_{2A} no participa en la neurotransmissió espontània.

5.1.4 Efecte de la inhibició específica del receptors A_{2B} i A_3 en la neurotransmissió espontània

En els estudis de localització amb tècniques d'immunohistoquímica s'ha demostrat la presència dels receptors d'ADO A_{2B} i A_3 en els nervis terminals, per tal efecte s'ha valorat la possible implicació d'aquests receptors en la neurotransmissió espontània. Per dur a terme aquest objectiu, s'ha bloquejat el receptor A_{2B} amb l'antagonista específic MRS1706 (100 nM) i no s'ha observat modificació en l'alliberació espontània d'acetilcolina (% de variació: 2.26 ± 23.15). En un altre experiment independent, s'ha bloquejat el receptor A_3 amb l'inhibidor específic MRS1334 (100 nM) i tampoc s'ha observat canvis en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 3.1 ± 5.22). Per tant, tal i com es mostra en la **figura R.14B** (columnes 5 i 6), segons els resultats obtinguts, els receptors A_{2B} i A_3 semblen no participar en la modulació de l'alliberació espontània, tot i sent presents en la NMJ com s'ha confirmat per immunohistoquímica i Western blot.

5.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) en la neurotransmissió espontània

Reprenent els resultats exposats, s'ha observat que el bloqueig de tots els receptors d'ADO augmenta l'alliberació, mentre que si estimulem inespecíficament disminueix aquesta alliberació espontània. Però sembla ser que aquesta disminució de l'alliberació és a través del receptor A_1 , perquè el bloqueig específic d'aquest receptor provoca un augment de la freqüència dels mEPPs. Aleshores, s'ha proposat estudiar l'efecte de la inhibició de l'ADO endògena amb l'enzim ADA (2 U/ml). En aquestes condicions, s'ha observat que l'ADA augmenta moderadament l'alliberació (% d'increment: 32.8 ± 1.8 , **figura R.15**, columna 1), tenint una tendència similar a l'observada amb el 8-SPT i el DPCPX. Per tant, es pot concloure que l'ADO endògena inhibeix l'alliberació espontània d'acetilcolina.

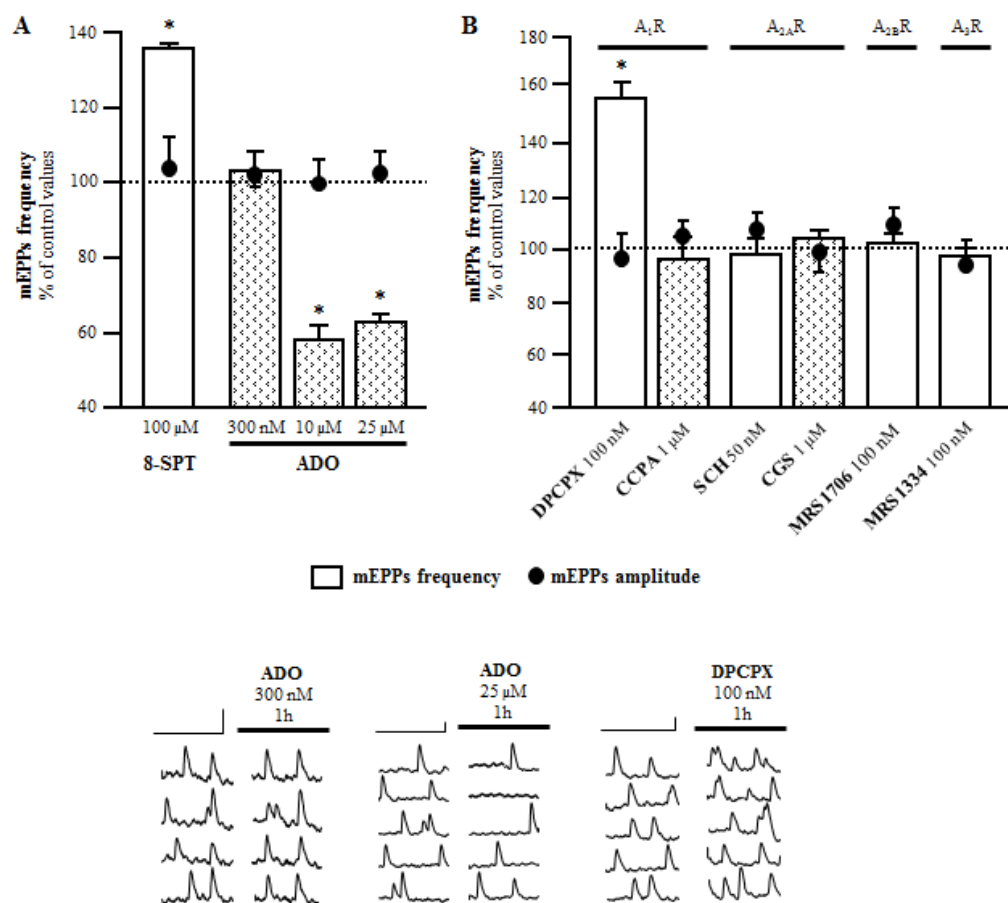


Figura R.14. Modulació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània. (A) Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina. La freqüència dels mEPPs augmenta després del bloqueig no selectiu amb el 8-SPT, però disminueix després de l'estimulació inespecífica amb l'ADO únicament a concentracions micromolars. (B) Modulació selectiva dels receptors d'adenosina. Únicament el bloqueig del receptor A₁ amb el DPCPX augmenta la freqüència dels mEPPs. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, *P > 0.05, respecte als valors inicials (línia puntejada). En els histogrames A i B es presenten les amplades dels mEPPs de cada una de les substàncies utilitzades, confirmant que tots els components utilitzats actuen de forma presinàptica. A sota, es mostren registres representatius de l'ADO (300 nM i 25 μ M) i del DPCPX des de la mateixa fibra abans (esquerra) i després d'1 hora d'afegir la substància purinèrgica (dreta). Barra d'escala horitzontal: 100 ms i vertical: 0.5 mV.

5.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) en la neurotransmissió espontània

Com en el cas de l'alliberació evocada també s'ha investigat l'efecte prolongat de l'anàleg estable no metabolitzable, la CADO, en l'alliberació espontània. Experimentalment, s'ha observat que a concentracions nanomolars augmenta l'alliberació, mentre que a concentracions micromolars no hi ha modificació en la modulació de l'alliberació espontània

Capítol IV. Resultats

(% d'increment CADO (300 nM): 41.72 ± 2.74 ; % de variació CADO (10 μ M): 7.66 ± 2.54 , **figura R.15**, columnes 2 i 3). Per tant, depenent de la concentració tindrà un efecte en l'alliberació espontània. Possiblement, a concentracions altes el sistema arriba a una saturació o bé, hi pot haver un balanç entre el receptor A_1 i A_{2A} . A continuació, s'estudiarà aquestes afirmacions mitjançant experiments de dobles incubacions (veure el procediment detallat a l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

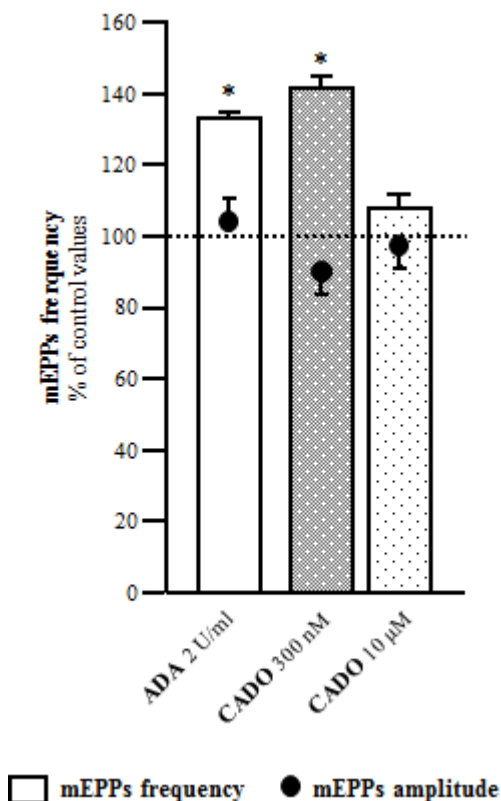


Figura R.15. Efecte de l'ADO endògena i de la CADO en la neurotransmissió espontània. L'eliminació de l'ADO endògena amb l'enzim ADA induïx un augment moderat de la freqüència dels mEPPs. Així mateix, la CADO (300 nM) augmenta la freqüència dels mEPPs, mentre que la CADO (10 μ M) no afecta a la freqüència. Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada). En l'histograma es presenten les amplades dels mEPPs de cada una de les substàncies utilitzades, confirmant que tots els components utilitzats actuen de forma presinàptica.

5.3.1 Efecte de la CADO a concentracions micromolars en la neurotransmissió espontània quan els receptors d'adenosina estan bloquejats

Com s'ha vist en l'apartat anterior, la CADO (10 μ M) no afecta a l'alliberació espontània suggerint que possiblement pot haver un balanç entre els receptors A_1/A_{2A} per tant, s'ha decidit estudiar l'efecte de la CADO (10 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M). En aquesta situació la CADO (10 μ M) tampoc modifica la freqüència de l'alliberació espontània (% de variació: 6.31 ± 3.87 , **figura R.16**, columna 6). Per tant, la CADO en presència d'un antagonista inespecífic no modifica l'alliberament espontani. Una possible explicació és que, la

CADO pot unir-se irreversiblement als llocs que el 8-SPT va deixant lliures, això farà que s'acceleri el *turnover* proteic i disminueixi la situació excitatòria produïda prèviament pel 8-SPT tornant a la situació basal.

A partir dels resultats obtinguts, s'ha pensat avaluar el possible efecte individual dels dos tipus de receptors (A_1 i A_{2A}). El bloqueig selectiu del receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX (100 nM) i la posterior incubació amb la CADO (10 μ M), no induïx un canvi en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 19.46 ± 8.09 , **figura R.16**, *columna 8*). Per tant, si el receptor A_1 està bloquejat, la CADO pot unir-se al receptor A_{2A} i activar-lo, però com s'ha vist anteriorment aquest receptor al no participar en l'alliberació espontània no modifica la freqüència dels mEPPs. O bé, com en el cas anterior, la CADO es pot unir irreversiblement als receptors lliures accelerant el *turnover* proteic, això pot fer que hi hagi menys receptors operatius i que disminueixi la situació excitatòria produïda prèviament pel DPCPX tornant a la situació basal.

Per un altre banda, quan s'estudia l'efecte de la CADO (10 μ M) en presència de l'antagonista específic del receptor A_{2A} , l'SCH-58261 (50 nM), tampoc s'observen canvis en la freqüència dels mEPPs (% de variació 19.68 ± 9.39 , **figura R.16**, *columna 10*). En aquestes condicions poden haver dues possibilitats: la primera és que la CADO es pugui unir al receptor A_1 a l'estar el receptor A_{2A} bloquejat, però tot així no afecta a l'alliberació espontània. Una segona possibilitat és que es pot suposar que la CADO s'uneixi als llocs que va deixar lliures l'antagonista SCH-58261. Si fos així el *turnover* proteic s'acceleraria. Tal com s'ha vist abans, el receptor A_{2A} no participa en la neurotransmissió espontània; així per molt que la CADO activi aquest receptor la freqüència no es veurà afectada.

5.3.2 Efecte de la CADO a concentracions nanomolars en la neurotransmissió espontània quan els receptors d'adenosina estan bloquejats

Els resultats han mostrat que la CADO (300 nM) augmenta la freqüència dels mEPPs. Amb la finalitat de conèixer quin receptor d'ADO pot estar implicat en aquest augment d'alliberació, primer s'ha estudiat l'efecte de la CADO (300 nM) en presència de l'antagonista inespecífic 8-SPT (100 μ M) i no s'ha observat canvis en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 1.08 ± 4.10 , **figura R.16**, *columna 7*). Possiblement, el 8-SPT augmenta l'alliberació espontània d'acetilcolina fent que la situació sigui excitatòria, al afegir la CADO que té el mateix efecte, fa que la situació es mantingui sense afectar a la freqüència. El següent pas serà estudiar cada receptor per separat.

En primer lloc, s'ha estudiat l'efecte de la CADO (300 nM) en presència del DPCPX (100 nM) i tampoc s'ha vist canvis en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 13.92 ± 3 , **figura R.16**, *columna 9*). En experiments anteriors, s'ha observat que la incubació del DPCPX augmenta l'alliberació espontània un comportament similar a la CADO a concentracions nanomolars. Per tant, el DPCPX provoca un increment de l'alliberació prou important, per a que la CADO no pugi augmentar més aquesta alliberació.

En segon lloc, s'ha avaluat l'efecte de la CADO (300 nM) després del bloqueig específic del receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM). Com en els casos anteriors, no s'han observat canvis en l'alliberació espontània (% de variació: 3.36 ± 2.53 , **figura R.16**, *columna 11*), donat que, com s'ha dit anteriorment, el receptor A_{2A} no participa en la neurotransmissió espontània. Es pot concloure, que la CADO en presència d'un antagonista específic, sigui el que sigui, no modifica la freqüència dels mEPPs.

En resum, segons els resultats exposats en aquest apartat, s'ha observat que els receptors d'ADO participen en l'alliberació espontània perquè tant el bloqueig com l'estimulació inespecífica augmenta i disminueix la freqüència dels mEPPs, respectivament. No obstant, sembla ser que l'ADO endògena disminueix l'alliberació espontània a través del receptor A_1 , perquè el bloqueig específic d'aquest receptor augmenta l'alliberació. I a més, aquesta acció inhibidòria de l'ADO endògena, s'ha confirmat amb la incubació de l'enzim ADA que indueix un augment de la freqüència dels mEPPs, un efecte similar a l'observat en el cas dels antagonistes 8-SPT i el DPCPX. Per un altre banda, s'ha avaluat l'efecte prolongat de la CADO en la neurotransmissió espontània. S'ha vist que a concentracions micromolars no s'observen canvis en la freqüència dels mEPPs, però a concentracions nanomolars augmenta l'alliberació espontània. No obstant, la CADO (en les dues concentracions) en presència dels inhibidors inespecífics o específics no indueixen canvis en l'alliberació. S'ha suggerit que possiblement els dos receptors (A_1 i A_{2A}) necessitin treballar conjuntament per a que la CADO a concentracions nanomolars pugui augmentar l'alliberació espontània, ja que si inhibim aquest receptors per separat no s'ha observat cap modificació en la freqüència. En canvi, a altes concentracions el sistema pot arribar a un equilibri entre els receptors A_1 i A_{2A} fent que no es modifiqui l'alliberació d'acetilcolina espontània.

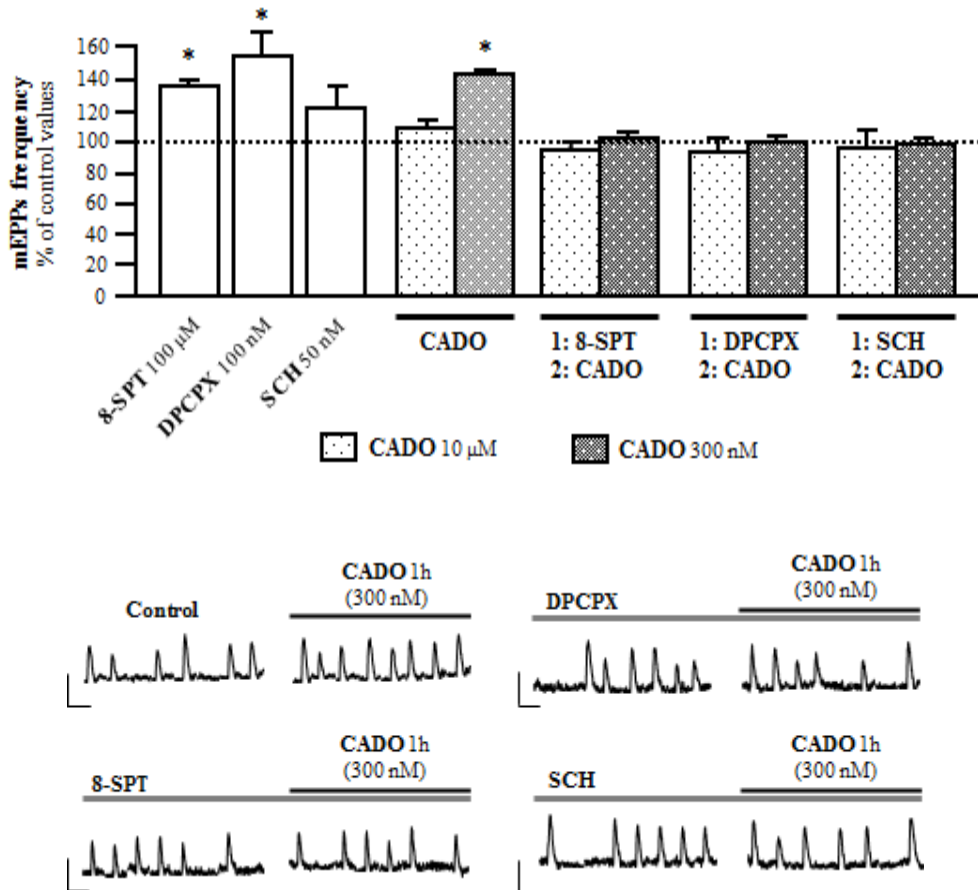


Figura R.16. Efecte de la CADO en l'alliberació espontània d'acetilcolina. A l'esquerra (*columnes blanques*) efecte individual en la freqüència dels mEPPs de cada substància purinèrgica. A continuació, es mostra l'efecte de la CADO en presència dels bloquejadors purinèrgics (*columnes farcides*) i l'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent (a sota), assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La CADO a 10 μM no canvia la freqüència dels mEPPs ni després de la preincubació del 8-SPT, el DPCPX o l'SCH-58261. No obstant, CADO a 300 nM augmenta la freqüència dels mEPPs, aquest augment és evitat per la preincubació dels moduladors 8-SPT, DPCPX o SCH-58261. Per a cada columna n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per músculs. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, * $P < 0.05$ amb respecte als valors inicials (línia puntejada). Barra d'escala horitzontal 100 ms i vertical 0.5 mV. A sota, es mostra uns exemples de registres de mEPPs de l'efecte de la CADO (300 nM, 1h) en presència dels moduladors purinèrgics. Barra d'escala horitzontal: 25 ms i vertical: 1 mV.

6. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 40 Hz

En l'apartat 4.1 s'ha demostrat que en condicions basals (a 1 Hz) i quan la funció sinàptica està inalterada (bloquejant la contracció muscular amb la μ -CgTx GIIIB 1.5-3 μ M, i en ocasions la incubació s'ha realitzat conjuntament amb el BTS 200 μ M), els receptors d'ADO no es troben acoblats en el control de la neurotransmissió evocada. A continuació, s'ha proposat analitzar la possible participació cooperativa dels receptors d'ADO durant una intensa activitat sinàptica amb la neurotoxina (μ -CgTx GIIIB, 3 μ M). Per dur a terme aquest estudi, s'ha realitzat experiments aplicant trens d'estímuls a una freqüència de 40 Hz (*estímul supra màxim*) durant dos minuts, deixant descansar la fibra un interval de 10 minuts entre registre i registre. Primer, s'ha registrat els EPPs d'un mínim de 4 fibres musculars control en Ringer normal (en el cas d'incubacions seriadades registre de la primera substància). A continuació, s'incuba amb la substància d'estudi (o bé la incubació de la segona substància en presència de la primera) i es realitza el registre experiment d'un mínim de 4 fibres més. Per l'anàlisi de la depressió sinàptica es mesura el promig de l'amplada dels últims 15 EPPs respecte el promig de l'amplada dels 15 primers EPPs de cada fibra (veure procediment en l'apartat 10.8 a *Materials i Mètodes*).

Prèviament, s'ha fet un experiment control on tant en el registre control com en l'experiment s'ha incubat la preparació amb solució Ringer normal, mantenint la funció sinàptica preservada (bloquejant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB). En aquestes condicions control s'ha observat una reducció de la depressió del 50% (és a dir, els 15 últims EPPs de cada tren són la meitat de grans que els 15 primers). A continuació, es mostren els resultats obtinguts en aquest apartat.

6.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

6.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Primer, s'ha analitzat l'efecte de l'ADO endògena a través del bloqueig de tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μ M). S'ha vist que augmenta considerablement la depressió (% d'increment de la depressió: 48.9, **figura R.17**) disminuint més que en la situació control. A continuació s'ha estudiat l'efecte contrari, l'activació de tots els receptors amb l'ADO a concentracions nanomolars (300 nM) i micromolars (10 μ M). A baixes concentracions, no s'ha trobat modificació significativa en el promig de l'amplada dels

últims 15 EPPs respecte els 15 primers (% de variació de la depressió: 17.9). Mentre que, a altes concentracions (10 μ M), l'ADO redueix considerablement la magnitud de la depressió (% de disminució de la depressió: 47.8; veure la **figura R.17**), tenint una acció protectora de la funció sinàptica. En la **figura R.17** (a sota de l'histograma) es mostra uns exemples d'un registre d'una fibra abans i després d'afegir la substància purinèrgica. S'observa com el bloqueig amb l'antagonista 8-SPT o l'addició de l'ADO exògena a concentracions micromolars, produeix un augment i una reducció de la magnitud de la depressió, respectivament. Per tant, aquests resultats preliminars mostren que els receptors d'ADO es troben implicats en la modulació de la depressió sinàptica.

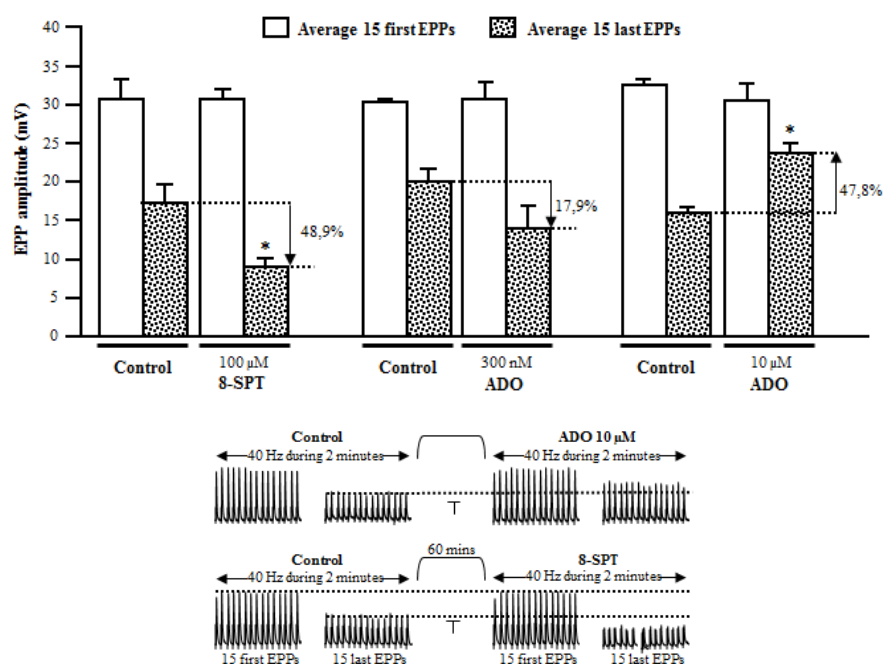


Figura R.17. Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz. S'han produït estímuls (trens a 40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte del 8-SPT (100 μ M, 1 hora) i de l'ADO (300 nM i 10 μ M, 1 hora) en la modulació de la depressió sinàptica. L'histograma mostra l'amplada mitjana dels 15 primers EPPs (*columnnes blanques*) i dels 15 últims EPPs (*columnnes farcides*) de cada tren. El control, representa els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir la substància purinèrgica (el 8-SPT o l'ADO), els valors s'han obtingut en aquest músculs després de l'addició de la substància. Per clarificar la figura, es mostra el % de variació entre les dues amplades mitges dels 15 últims EPPs en la situació control i experiment que es presenten en les *columnnes farcides* per a cada tipus d'experiment. La gràfica mostra que l'addició del 8-SPT augmenta la magnitud de la depressió, mentre que l'ADO té un efecte protector sobretot a concentracions micromolars. Per a cada columna n = 5-8 músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P < 0.05$ respecte als valors controls (línia puntejada). A sota, registre representatiu de la mateixa fibra muscular. Abans (esquerra) i després (dreta) d'afegir la substància purinèrgica. Barra d'escala horitzontal: 50 ms i vertical: 10 mV.

6.1.2 Modulació del receptor A_1 durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

A l'observar la implicació dels receptors d'ADO en la modulació de la depressió, tenint un efecte protector de la funció sinàptica amb l'addició de l'ADO exògena. Un propòsit d'aquest treball ha sigut conèixer com participen específicament cada receptor en aquest procés. En primer lloc, s'ha avaluat l'efecte del bloqueig específic del receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX (100 nM) durant l'activitat sinàptica, i s'ha vist que no indueix canvis en la magnitud de la depressió (% de variació: 3.09, [figura R.18A](#)). En segon lloc, s'ha estudiat l'efecte de l'estimulació específica d'aquest receptor amb l'agonista CCPA (1 μ M) i tampoc s'observa efecte en la depressió, tendeix a mantenir-se tal i com estaria en condicions basals (% de variació: 5.80, [figura R.18A](#)). Per tant, la modulació específica del receptor A_1 no indueix canvis en la magnitud de la depressió.

6.1.3 Modulació del receptor A_{2A} durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Per estudiar la implicació del receptor A_{2A} en la depressió, s'ha bloquejat el receptor selectivament amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM) o bé, s'ha estimulat de forma específica amb l'agonista CGS-21680 (1 μ M) en experiments per separat. En els dos casos no s'ha observat efecte en la mitjana de l'amplada dels últims 15 EPPs del tren respecte els primers (% de variació: 3.91 i 1.26, respectivament; [figura R.18A](#)).

Fins el moment segons els resultats exposats en aquest apartat, s'ha observat que si inhibim completament els receptors augmenta la depressió, mentre que si els estimulem inespecíficament l'ADO té un efecte protector que no s'observa quan es modula per separat els receptors A_1 i A_{2A} . El conjunt d'aquests resultats indiquen, que aquests receptors han de treballar de forma cooperativa.

6.1.4 Efecte de la inhibició específica dels receptors A_{2B} i A_3 durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

A conseqüència dels resultats obtinguts, s'ha qüestionat la possible participació dels altres dos receptors descrits (A_{2B} i A_3) en la modulació de la depressió sinàptica. Per aquest estudi, s'ha bloquejat aquests receptors per separat en experiments independents. S'ha trobat que el bloqueig del receptor A_{2B} amb l'antagonista selectiu MRS1706 (100 nM), com la inhibició del receptor A_3 amb l'antagonista específic MRS1334 (100 nM) no modifica la magnitud de la depressió (% de variació: 1.29 i 9.48, respectivament; [figura R.18B](#)). Amb aquests resultats es confirma que possiblement dos o més receptors d'ADO necessiten treballar de forma col·laborativa per tenir un efecte protector en la depressió sinàptica.

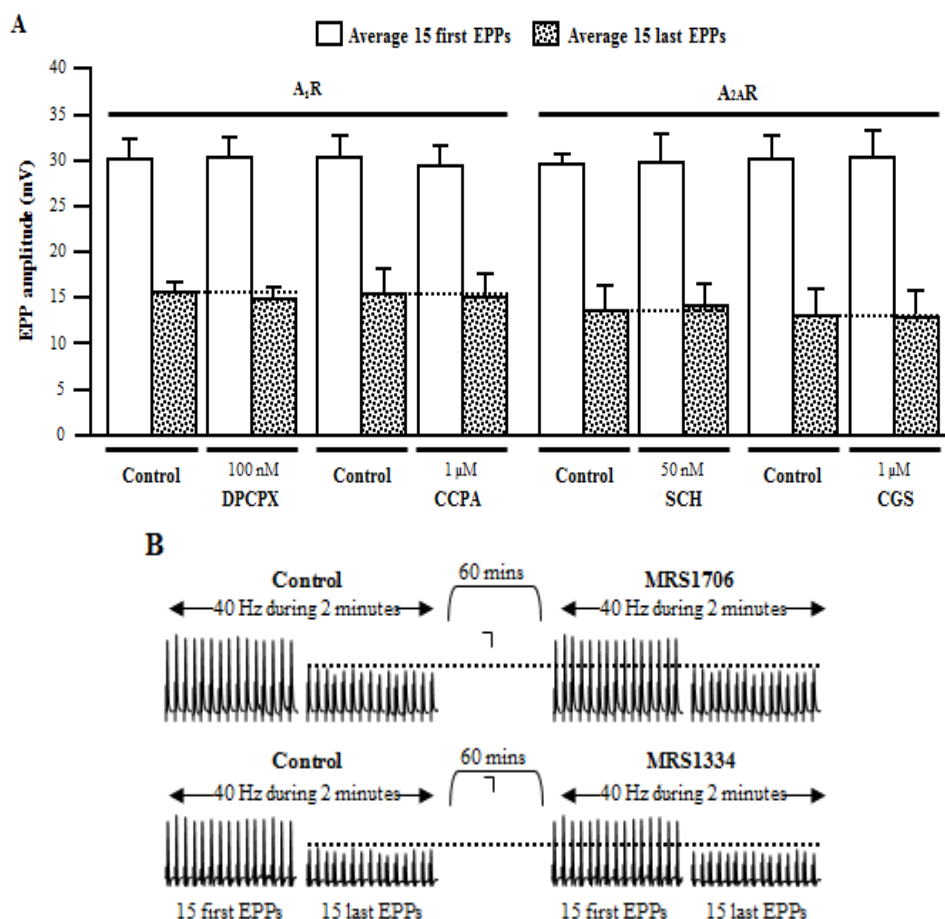


Figura R.18. Modulació específica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz. (A) S'han produït estímuls (trens a 40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte dels moduladors específics en els canvis en la modulació de la depressió sinàptica. L'histograma mostra l'amplada mitjana dels 15 primers EPPs (*columnes blanques*) i dels 15 últims de cada tren (*columnes farcides*). El control, representa els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir el modulador, els valors s'han obtingut en aquests músculs després de l'addició de la substància purinèrgica. Cap modulador específic té efecte en la depressió sinàptica. Per a cada columna $n = 5-8$ músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM. (B) Registre representatiu de la mateixa fibra muscular. Abans (esquerra) i després (dreta) d'afegir els bloquejadors dels receptors A_{2B} (MRS1704, 1 hora) i A_3 (MRS1334, 1 hora) on s'observa que aquests moduladors no modifiquen la magnitud de la depressió. Barra d'escala horitzontal: 50 ms i vertical: 10 mV.

Fins el moment, s'ha observat que el bloqueig de tots els receptors d'ADO augmenta la depressió però en canvi, si s'estimulen amb l'ADO s'obté un efecte protector de la depressió. Però, si s'inhibeixen o s'estimulen específicament cada receptor d'ADO per separat no hi ha modificació en la magnitud de la depressió. Aquests resultats es poden interpretar com

que dos o més receptors d'ADO necessiten treballar junts per tenir un efecte protector davant d'una situació d'intensa activitat sinàptica. Per tant, això pot significar que aquests receptors participen en la modulació de l'alliberació d'acetilcolina durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora de forma col·laborativa.

6.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Donat que s'ha observat que l'addició de l'ADO exògena té un efecte protector en la depressió, s'ha estudiat si l'efecte de l'ADO endògena té alguna implicació en la modulació de la depressió. Per realitzar aquest estudi, s'ha utilitzat l'enzim ADA que transforma l'ADO en inosina, inactivant-la. En aquestes condicions, l'ADA (2 U/ml) no induïx cap canvi en la modulació de la depressió (% de variació: 5.17, **figura R.19**). Possiblement, això indica que la quantitat d'ADO produïda en la fenèdura sinàptica durant aquestes freqüències d'estimulació, no és suficient per disminuir la magnitud de la depressió.

6.3 Efecte de la 2-cloroadenosina (CADO) durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

En els experiments anteriors, s'ha observat que l'addició de l'ADO exògena té un efecte protector en la depressió, però l'addició dels moduladors exògens específics no modifica la magnitud de la depressió, suggerint que és necessària la implicació i el treball conjunt de dos o més receptors d'ADO per tenir un efecte protector en la depressió. Mentre que, la producció de l'ADO endògena en aquestes condicions és insuficient per reduir la magnitud de la depressió. Per tant, ens vam proposar analitzar l'efecte de la CADO a dos concentracions diferents (10 μ M i 300 nM) sobre els receptors d'ADO influenciats per l'activitat sinàptica repetitiva i quins subtipus de receptors es troben implicats.

La **figura R.19** es mostra que l'efecte prolongat de la CADO (10 μ M) produeix una reducció no significativa en la modulació de la depressió (% de variació: 16.69) en comparació amb l'efecte de l'ADO exògena. Possiblement, en condicions d'altres concentracions de CADO, una vegada la CADO s'uneix al receptor es dona la formació del complex receptor-ligand. Aquest complex, farà que s'acceleri el *turnover* proteic amb un resultat de menys receptors operatius. El que farà que no s'activi tant la neurotransmissió fent que la situació sigui menys protectora que en el cas de l'addició de l'ADO exògena que té un efecte clarament protector. En canvi, la CADO (300 nM) no induïx modificació en el promig de l'amplada dels 15 últims EPPs respecte els 15 primers (% de variació: 6.64, **figura R.19**). Possiblement, aquestes concentracions de CADO no són suficients per activar aquesta via.

Resumint, la CADO a concentracions micromolars té un efecte protector però menor que l'efecte de l'ADO exògena, mentre que a concentracions nanomolars no s'ha observat cap efecte en la depressió. El següent pas, serà estudiar quins receptors d'ADO estan implicats en l'efecte protector de la CADO (10 μM) mitjançant experiments de dobles incubacions (veure el procediment detallat a l'apartat 10.8 a *Materials i Mètodes*).

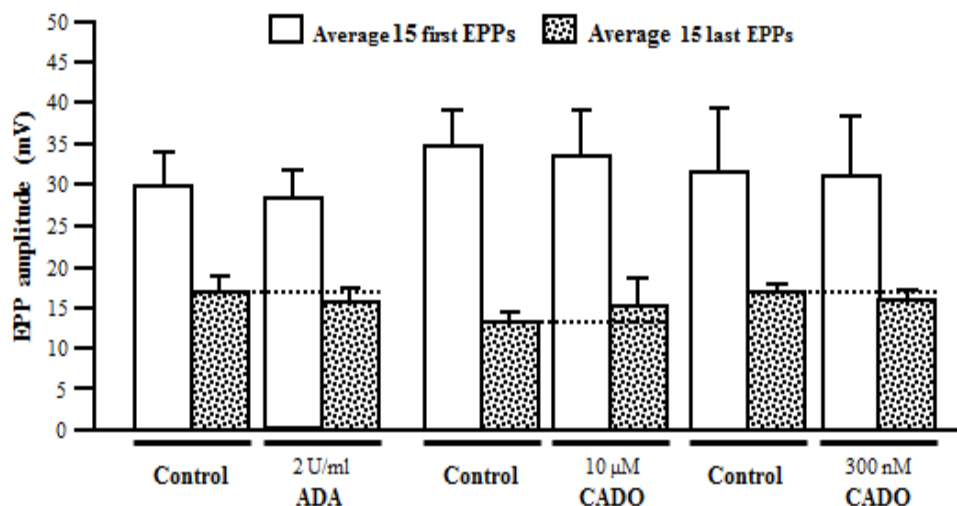


Figura R.19. Efecte de l'adenosina endògena i la CADO en la modulació de la depressió sinàptica a 40 Hz. S'han produït estímuls (trens a 40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte de l'enzim ADA i la CADO (10 μM i 300 nM) en la modulació de la depressió sinàptica (augment o disminució del promig de l'amplada dels 15 últims EPPs d'un tren). L'histograma mostra el promig de l'amplada dels 15 primers EPPs (*columnnes blanques*) i dels 15 últims de cada tren (*columnnes farcides*). El control, representa els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir l'ADA o la CADO, els valors s'han obtingut en aquests músculs després de l'addició d'aquestes substàncies. La gràfica mostra que l'ADA i la CADO 300 nM no tenen efecte en la depressió. No obstant, la CADO 10 μM provoca una disminució no significativa de la magnitud de la depressió d'un 17%, aproximadament. Per a cada columna $n = 5-8$ músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM.

6.3.1 Efecte de la CADO quan els receptors d'adenosina estan bloquejats durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Recordem en experiments d'activitat sinàptica realitzats prèviament, la inhibició de tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μM) produeix un augment de la depressió, mentre que la CADO (10 μM) té efecte protector però menor que l'efecte de l'ADO exògena. Per avaluar quin receptor es troba implicat en aquest efecte protector, s'ha estudiat l'efecte de la CADO (10 μM) en presència del 8-SPT (100 μM). En aquestes condicions no s'han observat canvis en la depressió (% de variació: 8.04, [figura R.20](#)). Possiblement, pot indicar que hi hagi una acció compensatòria entre els dos tipus de receptors d'ADO. Per

confirmar aquesta afirmació s'estudiarà per separat l'efecte de la CADO en presència dels inhibidors específics dels receptors d'ADO A_1 i A_{2A} .

6.3.2 Efecte de la CADO quan el receptor A_1 està bloquejats durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Per estudiar si hi ha un efecte compensatori entre aquest dos receptors primer s'ha estudiat l'efecte de la CADO (10 μ M) en presència del bloquejador del receptor A_1 , el DPCPX (100 nM). S'ha de tenir present que l'antagonista DPCPX a 40 Hz no produeix canvis en la depressió. En la **figura R.20** es veu que en aquestes condicions, la CADO (10 μ M) després del bloqueig del receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX experimenta un petit increment no significatiu de la depressió (% d'increment de la depressió: 19). Possiblement, a l'estimular irreversiblement tots els receptors purinèrgics en presència d'un inhibidor específic del receptor A_1 , és com si estimuléssim al receptor A_{2A} . El resultat que veiem es pot interpretar degut al bloqueig del receptor A_1 o bé, que el receptor que queda lliure (A_{2A}) no participa en la depressió en aquestes característiques experimentals. Amb la finalitat de confirmar aquestes afirmacions, el següent experiment serà estimular tots els receptors A_1 , tenint el receptor A_{2A} bloquejat.

6.3.3 Efecte de la CADO quan el receptor A_{2A} està bloquejats durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Per avaluar l'efecte del receptor A_{2A} s'ha estudiat l'efecte de la CADO (10 μ M) en presència de l'antagonista del receptor A_{2A} , l'SCH-58261 (50 nM). En aquestes condicions, el receptor A_{2A} està bloquejat per l'SCH-58261, i la CADO està estimulants al receptor A_1 tenint una acció fortament protectora de la depressió sinàptica (% de disminució: 51.39, **figura R.20**) similar a l'efecte de l'ADO exògena. Per tant, el bloqueig del receptor A_{2A} té una acció protectora de la depressió possiblement donada pel receptor A_1 que queda lliure.

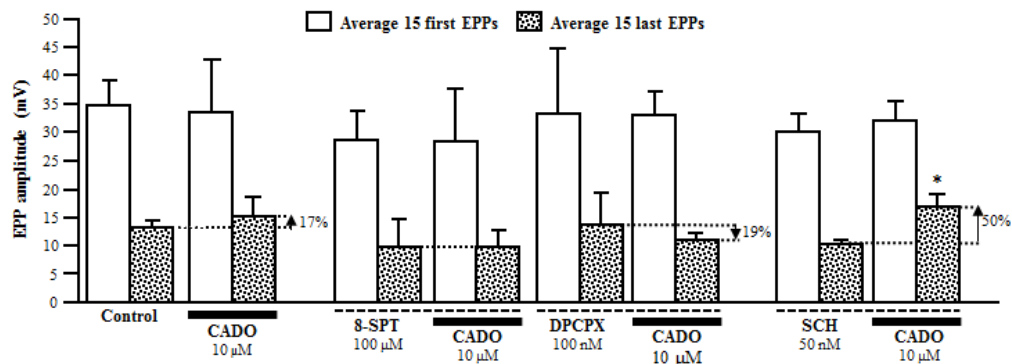


Figura R.20. Efecte de la CADO 10 µM quan els receptors d'adenosina estan bloquejats. S'han produït estímuls (trens a 40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte de la CADO (10 µM) en presència dels antagonistes purinèrgics en la modulació de la depressió sinàptica (augment o disminució del promig de l'amplada dels 15 últims EPPs d'un tren). L'histograma mostra l'amplada mitjana dels 15 primers EPPs (*columnes blanques*) i dels 15 últims de cada tren (*columnes farcides*). A l'esquerra, es mostra el control que representa els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir la CADO. A continuació, s'observa l'efecte de la CADO en presència dels antagonistes purinèrgics. L'ordre d'incubació dels moduladors es presenta en cada columna corresponent (a sota), la línia discontinua indica la preincubació de la substància purinèrgica i la línia negra més ampla indica la incubació posterior de la CADO. Únicament, després del bloqueig del receptor A_{2A} amb l'SCH-58261 s'ha trobat que la CADO té un efecte protector en la depressió, magnitud similar a l'efecte de l'ADO exògena en les mateixes condicions. Per a cada columna $n = 5-8$ músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P < 0.05$ respecte als valors controls (línia puntejada).

En definitiva, en aquest apartat es pot concloure que els receptors d'ADO estan implicats en el control de la depressió. El bloqueig inespecífic dels receptors d'ADO augmenta la depressió, mentre que l'addició de l'ADO exògena té un efecte clarament protector. Aquest efecte protector no s'observa modulant cada receptor separatament. Tampoc s'observa aquest efecte avaluant l'efecte del nivell de l'ADO endògena produïda en la fenedura sinàptica en aquestes condicions utilitzant l'enzim ADA. El que fa pensar que els receptors d'ADO participen de forma cooperativa en la modulació de l'alliberació d'acetilcolina durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora. I més, en aquestes condicions, l'ADO endògena és insuficient per disminuir la magnitud de la depressió. Per un altre banda, la CADO (10 µM) té un efecte protector en la depressió, però menor que l'observat per l'ADO exògena. Els receptors d'ADO units irreversiblement a la CADO poden ser segrestats per la via de les ubiquitinases i, com sol passar en aquesta via, una part d'aquest receptors tornen una altra vegada a la superfície fent que la situació sigui menys protectora que en el cas de l'ADO exògena que no s'uneix de forma irreversible. Aquest efecte protector de la CADO sembla ser a través del receptor A_1 perquè és augmentat quan el receptor A_{2A} està bloquejat i s'evita quan es bloquegen tots els receptors. Aquestes dades suggereixen que el receptor A_{2A} té una paper

modulador negatiu en A₁ en aquestes condicions experimentals de la CADO. Per un altre banda, s'ha vist que la CADO (300 nM) és una concentració insuficient per activar aquesta via.

6.4 Facilitació

En tots els experiments d'activitat sinàptica a 40 Hz s'ha estudiat els *paired pulses* o facilitació. Els *paired pulses* es consideren generalment com el resultat de l'augment d'alliberació evocada del segon potencial d'acció respecte el primer degut al Ca⁺² residual presinàptic (del Castillo i Katz, 1954; Katz i Miledi, 1968). L'estudi dels *paired pulses* ens permet identificar modificacions en la gestió intracel·lular del Ca⁺² com per exemple, canals, bombes o receptors de la rianodina. En aquest estudi no s'ha trobat diferències significatives en els *pair pulses* creiem que es degut a que NMJ és un sistema molt estable comparat amb el sistema nerviós central que hi ha més variabilitat (Accorsi-Mendoza i cols., 2013). En aquest treball s'ha avaluat els *paired pulses* com la ràtio de l'amplada del segon EPP respecte el primer EPP (veure figura R.21A-B).

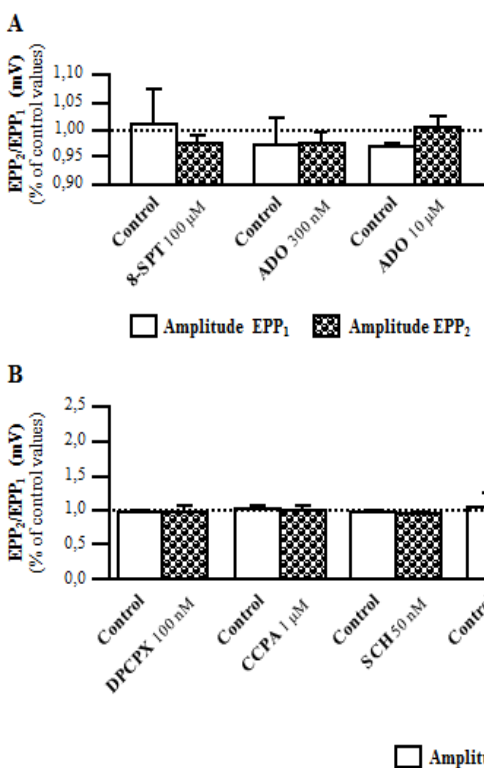


Figura R.21. Efecte general dels moduladors purinèrgics en els *pair pulses*. La facilitació s'ha representat com la ràtio de l'amplada del segon EPP de cada tren respecte al primer estimulant a 40 Hz (*estímul supra màxim*). Les columnes blanques representen el control i les columnes farcides són l'efecte de la substància purinèrgica després d'1 hora d'incubació en la mateixa fibra muscular. (A) Facilitació dels moduladors inespecífics en % de variació: 8-SPT (100 µM): 3.12; ADO (300 nM): 1.2; ADO (10 µM): 3.61. (B) Facilitació dels moduladors específics, de l'enzim ADA i de la CADO. Tant en A com en B, no s'observen variacions significatives en l'amplada de la ràtio EPP₂/EPP₁. Per a cada columna n = 5 músculs amb un registre de 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM.

7 PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA DURANT L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 100 Hz

Segons els experiments d'activitat sinàptica (trens a 40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) realitzats anteriorment, es pot afirmar que dos o més receptors d'ADO necessiten treballar de forma col·laborativa per tenir un efecte protector davant de la depressió. A més s'ha vist, que els nivells d'ADO endògena en la fenedura sinàptica produïda durant els trens a 40 Hz poden ser insuficients per reduir la depressió. L'efecte protector de la CADO (10 μ M) sembla ser a través del receptor A₁. Per tant, el següent objectiu plantejat ha sigut estudiar l'efecte dels moduladors inespecífics dels receptors d'ADO i de l'ADA, en control de la depressió durant l'estimulació elèctrica del múscul a 100 Hz (trens a 100 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*). El procediment que s'ha dut a terme és similar als experiments realitzats de trens a 40 Hz i que s'ha descrit a l'apartat de *Materials i Mètodes* mantenint en tot moment la funció sinàptica preservada.

Prèviament a realitzar l'estudi, s'ha fet un experiment control en el qual s'ha incubat el múscul amb la solució Ringer normal durant el registre control i l'experiment. En aquestes condicions no s'ha observat variació en el promig de l'amplada dels 15 últims EPPs respecte als primers 15 de cada tren (% de variació: 9.74). A aquestes altes freqüències d'activitat sinàptica, l'amplada inicial dels EPPs pot disminuir ràpidament un 70-80% de l'amplada inicial dels EPPs, encara que els trens poden ser reproduïbles durant almenys durant 2-3 hores. En aquest tipus d'experiments és freqüent observar falles (estímuls que no produeixen EPPs), mentre que en els experiments de 40 Hz són escasses. Els valors es mostren com % de variació \pm SEM. En tots els experiments s'ha utilitzat 5-8 músculs per cada substància estudiada.

7.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina durant l'activitat sinàptica a 100 Hz

En relació als experiments controls d'activitat sinàptica fets prèviament, s'ha observat que en els experiments controls d'activitat sinàptica realitzats a 40 Hz es produeix una reducció de la depressió del 50%. Mentre que en els experiments controls realitzats a 100 Hz, en les mateixes condicions experimentals, no s'ha vist modificació en la magnitud de la depressió. Això pot indicar que possiblement podria haver un mecanisme compensatori entre els receptors A₁ i A_{2A} a aquestes altes freqüències d'estimulació. Per aquest fet, i perquè s'ha vist que els nivells produïts d'ADO en la fenedura durant els trens poden ser insuficients per reduir la

magnitud de la depressió a 40 Hz, s'ha decidit estudiar la participació dels receptors d'ADO durant una situació d'intensa activitat sinàptica (trens d'estímul a 100 Hz durant 2 minuts).

Per dur a terme aquest estudi, s'ha realitzat experiments independents per avaluar l'efecte de l'ADO endògena amb el bloqueig de tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μ M), i l'efecte amb l'addició de l'ADO exògena (25 μ M). En aquest cas, a diferència dels experiments de depressió a 40 Hz, ni el 8-SPT ni l'ADO indueixen un canvi en la magnitud de la depressió (% de variació: 1.85 i 9.78, respectivament; **figura R.22**). Aquest resultat es pot interpretar com que possiblement en aquesta situació d'alta intensitat, el sistema pot arribar a una saturació. És a dir, en el cas dels experiments d'activitat a 40 Hz els receptors d'ADO tenen una capacitat moduladora, però quan arriba a una freqüència d'estimulació 100 Hz pot ser que es superi aquesta capacitat moduladora. Per confirmar aquesta afirmació s'ha estudiat la implicació de cada receptor d'ADO per separat.

7.2 Efecte del bloqueig del receptor A_1 i del receptor A_{2A} durant l'activitat sinàptica a 100 Hz

Amb els resultats obtinguts fins el moment (trens d'estímul a 100 Hz durant 2 minuts), s'ha volgut valorar en experiments independents, l'efecte de la inhibició selectiva dels receptors A_1 i A_{2A} en aquestes condicions. Es pot observar que el bloqueig selectiu del receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX (100 nM) no afecta a la depressió (% de variació: 15.43, **figura R.22**) però pel contrari, el bloqueig del receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM) té un efecte protector reduint considerablement la magnitud de la depressió (% de disminució: 77.59, **figura R.22**). Possiblement, pot indicar que en condicions d'alta activitat l'ADO endògena pot reduir la depressió a través del receptor A_1 .

7.3 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) durant l'activitat sinàptica a 100 Hz

Anteriorment, en els experiments d'activitat sinàptica a 40 Hz s'ha vist que el nivell de l'ADO endògena produïda en la fenèdura sinàptica durant els trens no és suficient per reduir la depressió. A més, s'ha vist que la modulació inespecífica dels receptors d'ADO en trens de 100 Hz no modifica la depressió. Per confirmar si el nivell d'ADO endògena produït en trens a altes freqüències (100 Hz) és suficient per activar als receptors d'ADO i tenir un efecte protector, s'han realitzat experiments amb l'enzim ADA que inactiva l'efecte de l'ADO hidrolitzant-la a inosina. En aquest cas, l'ADA augmenta considerablement la magnitud de la depressió (% de variació: 56.66, **figura R.22**). Aquest resultat sembla indicar que a altes

freqüències, l'ADO endògena produïda a en aquestes condicions sembla interaccionar amb els receptors d'ADO protegint de la depressió.

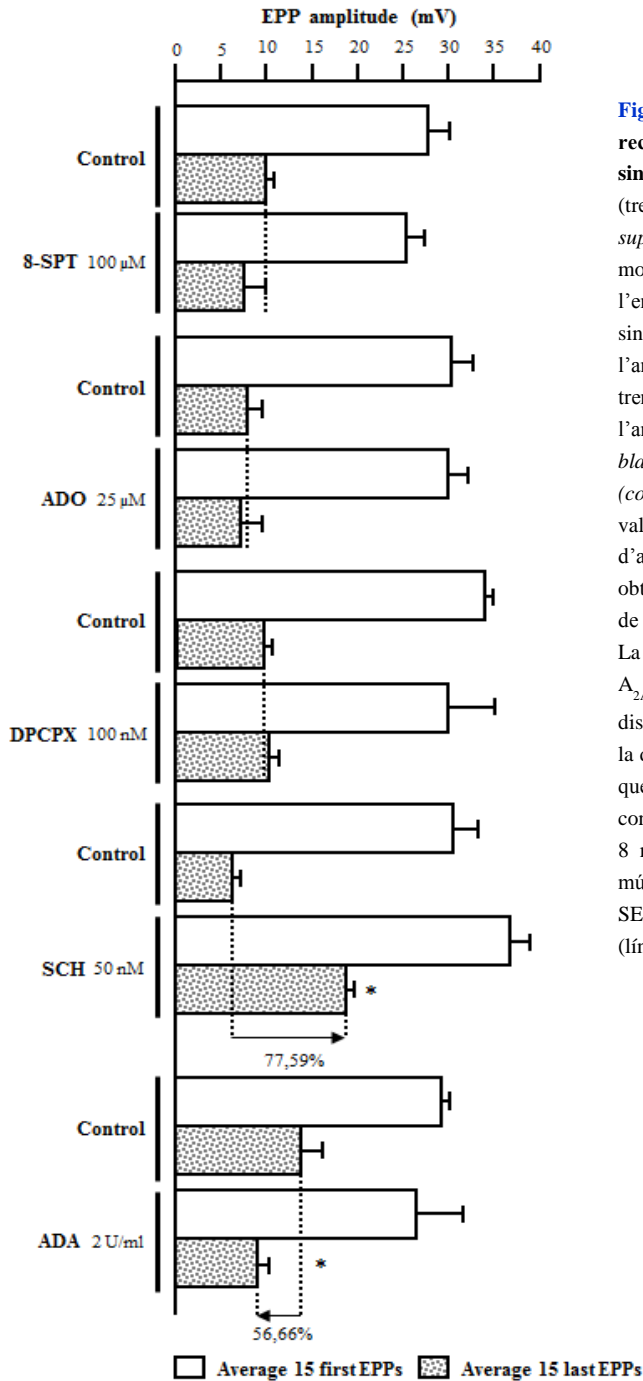


Figura R.22. Efecte dels moduladors dels receptors d'adenosina en la depressió sinàptica a 100 Hz. S'han produït estímuls (trens a 100 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte dels moduladors inespecífics i específics i de l'enzim ADA en la modulació de la depressió sinàptica (augment o disminució del l'amplada mitjana dels 15 últims EPPs d'un tren). L'histograma mostra el promig de l'amplada dels 15 primers EPPs (*columnes blanques*) i dels 15 últims de cada tren (*columnes farcides*). El control, representa els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir la substància purinèrgica i s'ha obtingut els valors en aquest músculs després de l'addició d'aquestes substàncies (1 hora). La gràfica mostra que el bloqueig del receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 disminueix considerablement la magnitud de la depressió tenint un efecte protector, mentre que l'ADA augmenta la depressió considerablement. Per a cada columna $n = 5-8$ músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P < 0.05$ respecte als valors controls (línia puntejada).

En resum, la modulació inespecífica dels receptors d'ADO no modifica la depressió. La producció de l'ADO endògena en la fenedura sinàptica en aquestes condicions és suficient per tenir un efecte protector activant al receptor A₁, ja que el bloqueig del receptor A_{2A} redueix considerablement la depressió.

8. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA

Els treballs publicats fins el moment en el grup, es mostra que existeixen diferents molècules de senyalització com els mAChRs, les serina/treonina quinases (PKA i PKC) i els VDCCs que s'expressen, es localitzen en la sinapsi neuromuscular i es troben implicades en la modulació de la neurotransmissió. Així mateix, es va estudiar la relació funcional entre aquestes vies de senyalització en l'acoblament de la neurotransmissió (veure amb més detall a l'apartat de la *Introducció secció 3: Molècules implicades en la transmissió neuromuscular*). A més, com s'ha comentat anteriorment en l'apartat de la *Introducció*, els receptors d'ADO són pleioentròpics i la seva activació pot influir en l'acció d'altres neurotransmissors i neuromoduladors indirectament, comportant-se com un modulador de moduladors ja que el funcionament de molts sistemes neuromoduladors presinàptics estan sota el control concís dels receptors d'ADO (Queiroz i cols., 2003; Cunha, 2005). Per tant, en aquesta tesi s'ha proposat estudiar amb detall la relació funcional dels receptors d'ADO amb aquestes molècules implicades en el control de la neurotransmissió (mAChRs, PKA, PKC i VDCCs) mitjançant experiments de dobles incubacions. En aquest cas, també s'ha registrat simultàniament i intracel·lularment els EPPs i el mEPPs per poder estimar el contingut quàntic pel mètode directe i s'ha utilitzat un mínim 5-8 músculs per substància estudiada mantenint en tot moment la funció sinàptica preservada. S'ha seguit el següent protocol: primer s'ha preincubat la preparació durant 1 hora amb els moduladors purinèrgics i a continuació, s'ha fet el registre control de 15 fibres musculars. Posteriorment, s'ha incubat (durant 1 hora addicional) amb la segona substància moduladora d'aquestes molècules (mAChRs, PKA, PKC i VDCCs) en presència de la primera substància i s'ha fet el registre experiment. En alguns casos que s'ha cregut oportú, s'ha realitzat l'experiment recíproc. Finalment, s'ha estudiat la resposta de l'últim modulador sobre la neurotransmissió (veure el procediment detallat l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

8.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada

Un dels objectius d'aquest treball ha sigut determinar si hi ha alguna possible relació funcional entre els receptors d'ADO amb els mAChRs. En estudis previs en el grup, es va veure que els mAChRs modulen la neurotransmissió evocada. En la NMJ adulta, el receptor M1 augmenta la neurotransmissió, mentre que el M2 la inhibeix. Els dos mecanismes M1 i M2 operen en paral·lel encara que en condicions normals, la funció muscarínica inhibeix l'alliberació donat que un bloqueig no selectiu dels mAChRs amb l'atropina (AT) potencia l'alliberació, el que indica la predominança del receptor M2 (**Santafé i cols., 2003, 2006; Garcia i cols., 2005; Tomàs i cols., 2014**). El que suggereix que la inhibició tònica de l'alliberació d'acetilcolina en condicions basals quan M1-M2 són operatius a través de l'acetilcolina endògena, tenen una funció conservativa limitant l'alliberació evocada de l'acetilcolina. Per un altre banda, els receptors M3 i M4 no són funcionals en la NMJ adulta, tot i que s'han trobat presents en la NMJ en estudis de localització i d'expressió (**Santafé i cols., 2003, 2004; Garcia i cols., 2005; Tomàs i cols., 2014**). No obstant, el receptor M4 és operatiu en certes NMJ neonatals participant en el procés d'eliminació sinàptica (**Santafé i cols., 2004**). En l'apartat 3.1 de la *Introducció* es mostra més informació sobre els mAChRs.

8.1.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada a 1 Hz

8.1.1.1 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics

En experiments previs (apartat 4.1.1 de *Resultats*), s'ha observat que la incubació no específica dels receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μ M) no modifica el contingut quàntic (% de variació: 2.00 ± 7.22). Mentre que, si bloquegem inespecíficament els mAChRs amb l'AT (2 μ M) causa una potenciació de l'alliberació evocada (% d'increment: 89.9 ± 4.8 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2003, 2006**).

Per estudiar la possible relació entre aquests dos tipus de receptors (P1Rs i mAChRs), s'ha estudiat l'efecte de la l'AT (2 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M), com la situació inversa. En les dues condicions no s'ha observat canvi en l'alliberació evocada (% de variació: 2.11 ± 1.55 i 13.86 ± 3.06 , respectivament, **figura R.23, columnes 5 i 8**). Aquests resultats suggereixen que possiblement, existeix una relació en la modulació de l'alliberació entre els

receptors d'ADO i mAChRs. És a dir, que els mAChRs poden dependre dels receptors d'ADO, per aquesta raó l'AT no pot fer la seva funció de potenciació. I recíprocament, els receptors d'ADO poden dependre dels mAChRs, perquè el seu bloqueig no deixa als receptors d'ADO acoblar-se a la neurotransmissió evocada.

A partir dels resultats obtinguts, s'ha proposat estudiar la situació contrària, la participació dels mAChRs quan estan bloquejats inespecíficament amb l'AT i els receptors d'ADO es troben estimulats inespecíficament amb l'ADO (25 μM). S'ha de tenir present que l'ADO exògena en les nostres condicions de treball (preservant la funció sinàptica) no modifica el contingut quàntic (% de variació ADO 25 μM : 15.79 ± 2.20 ; veure la **figura R.10** de l'apartat 4.1.1 de *Resultats*). En aquest cas, l'AT (2 μM) en presència d'ADO (25 μM), com en la situació inversa, no s'observa un canvi en el contingut quàntic (% de variació: 1.80 ± 4.38 i 11.44 ± 5.14 , respectivament, **figura R.23**, *columnnes 6 i 9, respectivament*). Indicant, que els mAChRs es desacoblen de la neurotransmissió evocada si prèviament s'activen els receptors d'ADO, mentre que els receptors d'ADO no es poden acoblar a la neurotransmissió evocada si es bloquegen prèviament els mAChRs.

En resum, aquests resultats preliminars evidencien que hi ha una relació funcional entre els receptors d'ADO i els mAChRs, perquè l'AT en presència dels moduladors purinèrgics inespecífics, no pot fer el seu efecte de potenciació i a la inversa, el bloqueig dels mAChRs no permet l'acoblament dels receptors d'ADO en la neurotransmissió evocada. Per tant, per poder confirmar aquesta afirmació a continuació s'estudiarà l'efecte prolongat de la CADO amb el bloqueig dels mAChRs amb l'AT.

8.1.1.2 Efecte de la CADO quan es bloquegen tots els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada

En experiments realitzats prèviament, la CADO a concentracions micromolars disminueix l'alliberació evocada (veure apartat 4.3 de *Resultats*), mentre que l'AT (2 μM) té un efecte potenciador. Si primer s'incuba la CADO (10 μM) i posteriorment es bloquegen els mAChRs amb l'AT (2 μM), com en la situació inversa, no s'observen canvis en el contingut quàntic (% de variació: 4.62 ± 0.70 i 8.45 ± 8.23 , respectivament, **figura R.23**, *columnnes 7 i 10*). L'AT no pot potenciar l'alliberació ni la CADO pot inhibir-la, es dona una situació compensatòria. Amb aquests resultats obtinguts es confirma que hi ha una possible relació entre els receptors d'ADO i els mAChRs. El següent pas serà estudiar quins subtipus de receptors estan implicats en aquesta situació compensatòria.

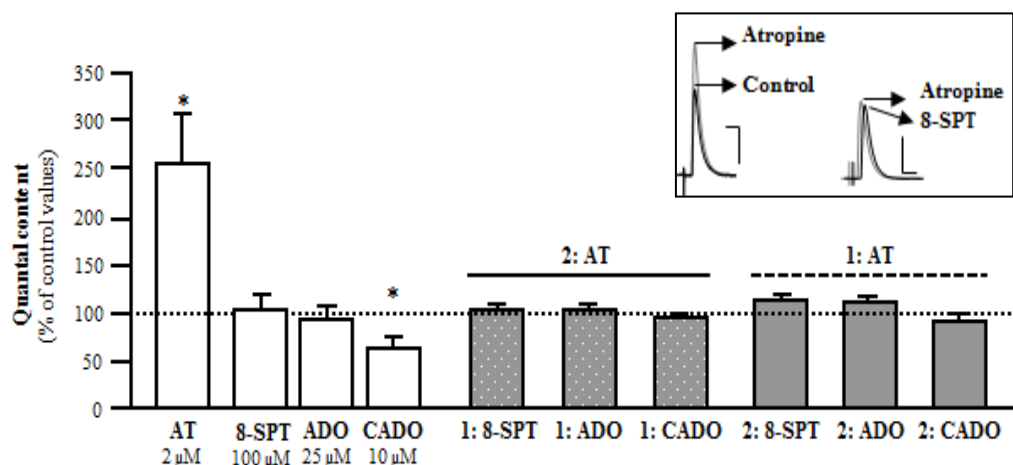


Figura R.23. Efecte de la modulació inespecífica dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig inespecífic dels receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent de les substàncies en l'alliberació evocada. A continuació, es mostra l'acció dels agents dels receptors d'ADO i del bloquejador inespecífic dels mAChRs l'atropina (AT) (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). L'AT no pot canviar l'alliberació evocada quan prèviament estan inhibits els receptors d'ADO (8-SPT) o estimulats (ADO). En experiments recíprocs, el bloqueig previ dels mAChRs amb l'AT no permeten als receptors d'ADO influenciar en l'alliberació evocada (falta d'acció del 8-SPT i de l'ADO després de la preincubació de l'AT) per tant el desacoblament dels receptors d'ADO es manté. Per un altre banda, com la CADO (10 μM) redueix l'alliberació evocada, s'ha avaluat com la preincubació de l'AT afecta a l'efecte de la CADO i recíprocament. Ni la CADO ni l'AT afecten al contingut quàntic després de la incubació de l'altre component. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, * $P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada). Barra d'escala horitzontal: 5 ms i vertical: 10 ms. Al box de dalt, es mostra un exemple de registres de l'acció de l'AT en l'alliberació evocada (esquerra) i la falta d'efecte de l'AT en presència del 8-SPT (dreta). Barra d'escala horitzontal: 5 ms i vertical 10 ms.

8.1.1.3 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M1

En articles publicats en el grup, es va observar que el bloqueig específic del receptor M1 amb la pirenzepina (PIR, 10 μM) redueix la neurotransmissió evocada (% de disminució: 46.3 ± 17.7 , $P < 0.05$, n = 5, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2003**). Per un altre banda, experimentalment s'ha vist que la presència dels moduladors purinèrgics inespecífics i específics no induïxen canvis en el contingut quàntic (veure apartat 4.1). Per estudiar la relació dels receptors d'ADO amb el receptor M1 s'ha fet diferents experiments: tant si prèviament es bloquegen tots els receptors d'ADO amb el 8-SPT (100 μM), com si s'estimulen inespecíficament amb l'ADO (25 μM) exògena, com si es bloqueja específicament el receptor A₁ amb l'antagonista DPCPX (100 nM) o bé, es bloqueja el receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM) i després s'incuba amb la PIR (10 μM) no s'observa cap modificació en el

contingut quàntic (% de variació: 14.36 ± 5.60 , 5.23 ± 6.60 , 15.92 ± 3.08 i 1.14 ± 7.15 , respectivament, **figura R.24A**). Podem deduir, que els receptors d'ADO estan acoblats al receptor M1, perquè la PIR no pot modificar l'alliberació evocada, si prèviament s'ha bloquejat o estimulat els receptors d'ADO. Per tant, el següent estudi proposat ha sigut estudiar la relació dels receptors d'ADO amb el bloqueig específic del receptor M2.

8.1.1.4 Efecte en la neurotransmissió evocada quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M2

En experiments realitzats previs en el grup, es va observar que el bloqueig específic del receptor M2 amb la metoctramina (MET, 1 μM) produeix un augment de l'alliberació evocada (% d'increment: 67.6 ± 15.14 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2003**). Com en el cas anterior, s'han fet diferents experiments per estudiar la relació dels receptors d'ADO amb el mAChR tipus M2. Experimentalment no s'ha observat cap modificació en l'alliberació evocada quan la MET (1 μM) es troba en presència del 8-SPT (100 μM), de l'ADO (25 μM), del DPCPX (100 nM) o bé de l'SCH-58261 (50 nM) (% de variació: 4.06 ± 3.94 , 1.42 ± 0.12 , 14.63 ± 0.46 i 9.60 ± 6.65 , respectivament; **figura R.24B**). Es pot concloure, que els receptors d'ADO estan relacionats amb el receptor M2 donat que la MET tampoc pot modificar l'alliberació evocada.

En resum, aquests resultats evidencien que hi ha una interdependència dels receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) i els mAChRs (M1 i M2) en la modulació de l'alliberació evocada. Aquest fet es degut a que en presència dels moduladors purinèrgics inespecífics (inclús amb l'efecte prolongat de la CADO) i específics, ni l'AT ni els bloquejadors selectius dels receptors M1 i M2 poden modificar l'alliberació evocada. Així mateix, recíprocament, el bloqueig previ de tots els mAChRs i la posterior incubació dels moduladors purinèrgics inespecífics no modifica el contingut quàntic. Per tant, es pot concloure que pel funcionament normal dels mAChRs, es necessita un bon equilibri del conjunt dels receptors d'ADO i que la modulació dels mAChRs no permet l'acoblament dels receptors d'ADO en l'alliberació evocada.

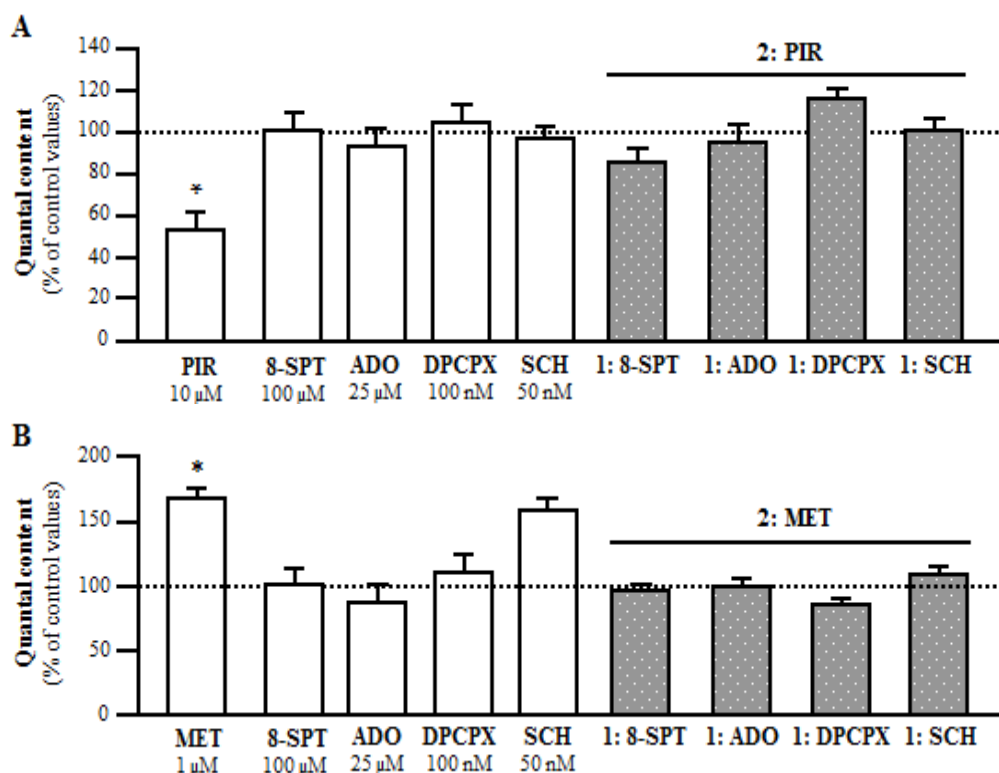


Figura R.24. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig dels receptors muscarínics tipus M1 i M2 en la neurotransmissió evocada. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es presenta l'efecte independent de les substàncies en l'alliberació evocada. A continuació, (A) i (B) es mostra l'acció de l'antagonista del receptor M1 la pirenzepina (PIR) o bé l'antagonista del receptor M2 la metoctramina (MET) en presència dels moduladors purinèrgics, respectivament (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació del modulador purinèrgic; 2: incubació de la PIR o la MET). El gràfic evidencia que tant la PIR com la MET no poden modificar l'alliberació evocada després de la preincubació amb el 8-SPT, l'ADO, el DPCPX o l'SCH-58261, indicant una interdependència entre els receptors d'ADO i els mAChRs. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, * $P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

8.1.2 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz

En estudis en el nostre laboratori, s'ha observat que el bloqueig dels receptors M1-M2 amb l'AT augmenta la depressió sinàptica, mentre que l'estimulació inespecífica amb l'oxotremorina-M (OXO-M) no canvia la magnitud de la depressió sinàptica (trens a 40 Hz durant 2 minuts). Aquests resultats indiquen que els mAChRs estan implicats tònicament en protegir la depressió sinàptica (Tomàs i cols., 2014). Per tant, el mecanisme purinèrgic (com

s'ha vist en l'apartat 6 de *Resultats*) i el muscarínic semblen compartir el control funcional de la depressió sinàptica tenint una funció protectora (donat que el bloqueig dels receptors d'ADO amb el 8-SPT i dels muscarínics amb l'AT augmenten la depressió, respectivament). Per aprofundir en el coneixement dels respectius mecanismes i avaluar si hi ha alguna via funcional en comú, s'ha volgut investigar si hi ha una possible interacció oclusiva o additiva entre autoreceptors metabotrópics d'ADO i els mAChRs (en concret els tipus M1 i M2) en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz mitjançant experiments de dobles incubacions (mirar procediment en l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

8.1.2.1 Efecte del bloqueig dels receptors d'adenosina i dels receptors muscarínics durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

En estudis realitzats prèviament es va veure que l'AT (2 μM) indueix un increment de la depressió d'un 34.9% (Tomàs i cols., 2014), mentre que l'increment causat pel 8-SPT (100 μM) és del 48.9% (veure la [figura R.17](#) de l'apartat 6.1.1 de *Resultats*). Per avaluar la possible relació entre els mAChRs i els receptors d'ADO, s'ha estudiat l'efecte del 8-SPT (100 μM) en presència de l'AT (2 μM) i s'ha evidenciat un augment en la depressió (% d'increment: 23.69, [figura R.25](#)). Possiblement, aquest resultat pot indicar que el mecanisme purinèrgic pot ser que sigui més fort que el muscarínic en la depressió sinàptica. Aquest fet queda recolzat pel fet que a l'afegir dues substàncies inhibidores com són l'AT i el 8-SPT, la segona incubació amb el 8-SPT que és més potent, fa que hi hagi un augment addicional de la depressió. De la mateixa manera s'ha realitzat l'experiment a la inversa, i l'efecte de l'AT (2 μM) en presència del 8-SPT (100 μM) no causa una modificació en la depressió (% de variació: 15.22, [figura R.25](#)). Pot ser que l'addició del 8-SPT fa que la situació es torni fortament inhibidora, i si posteriorment s'afegeix una altre agent inhibitori menys potent, com és l'AT, ja no podrà deprimir més el sistema. És a dir, si es bloquegen tots el mAChRs i posteriorment els receptors d'ADO, el 8-SPT pot augmentar la depressió. En canvi, en la situació inversa, l'AT no pot deprimir més el sistema degut a la forta acció inhibidora prèvia del 8-SPT.

8.1.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i del bloqueig dels receptors muscarínics durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Seguint amb el mateix estudi, s'ha avaluat l'efecte del bloqueig inespecífic dels mAChRs amb l'AT (2 μM) i la posterior incubació de l'ADO exògena (25 μM), i viceversa. En aquestes condicions no s'ha observat diferències en la magnitud de la depressió entre el

promig dels 15 últims EPPs respecte als 15 primers EPPs (% de variació: 4.27 i 14.13, respectivament, figura R.25). Tal i com anteriorment s'ha vist en els experiments d'activitat sinàptica (trens 40 Hz durant 2 minuts), l'ADO exògena conjuntament amb l'endògena té un efecte clarament protector davant de la depressió (veure l'apartat 6.1.1 de *Resultats*). Aquest efecte tan protector de l'ADO pot impossibilitar l'acció inhibidòria de l'AT en les dues condicions, fent que no es modifiqui la magnitud de la depressió.

En resum, aquests resultats indiquen que el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió i poden compartir una via en comú. A més a més, en aquestes condicions experimentals, el control purinèrgic sembla ser més fort que el control muscarínic, donat que la depressió pot ser addicionalment augmentada amb el 8-SPT després d'un augment addicional en la depressió induït pel bloqueig muscarínic amb l'AT. A més, quan prèviament els receptors d'ADO són bloquejats, l'AT no pot augmentar la depressió indicant una possible transactivació entre els receptors d'ADO i els mAChRs. De la mateixa manera, l'ADO després de la preincubació amb l'AT, com viceversa no modifica la depressió. Suggestiu, en els dos casos, que l'ADO endògena (conjuntament amb l'ADO exògena) té un efecte protector en la depressió implicant l'acció inhibidòria de l'AT.

Com a conclusió d'aquest apartat, es pot destacar que hi ha una interdependència entre els receptors d'ADO i els mAChRs en l'alliberació evocada en condicions basals i amb l'estimulació prolongada de la CADO. A més, el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió on sembla ser que comparteixen un mecanisme en comú, encara que el control purinèrgic sembla ser més fort que el control muscarínic.

8.2 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa A (PKA) en la neurotransmissió evocada

Els receptors metabotròpics de membrana com és el cas dels receptors d'ADO estan acoblats a vies intracel·lulars, que convergeixen en un repertori limitat de quinases efectores que fosforilen proteïnes diana i materialitzen canvis estructurals i funcionals. La família de les serina/treonina quinases, en particular la PKA i PKC, són les més ubiqües i es troben implicades en la excitació de transmissor (**West i cols., 1991; Numann i cols., 1994; Tanaka i Nishizuka, 1994; Byrne i kandel, 1996; Catterall, 1999a; Santafé i cols., 2005, 2006, 2007**). En aquest apartat s'estudiarà la relació funcional dels receptors d'ADO amb la PKA en la modulació de l'alliberació evocada mitjançant experiments de dobles incubacions (mirar procediment en l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

Capítol IV. Resultats

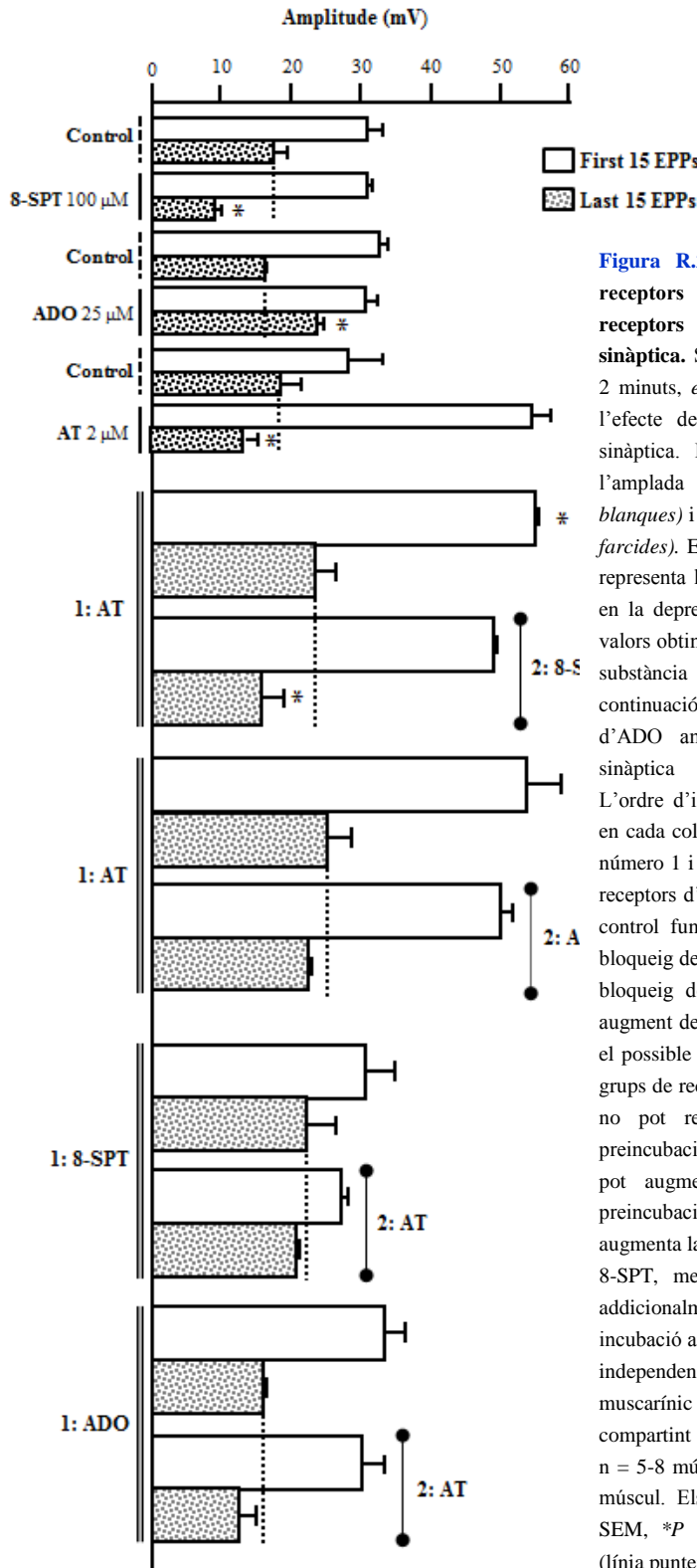


Figura R.25. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina i del bloqueig dels receptors muscarínics en la depressió sinàptica. S'han produït estímuls (40 Hz durant 2 minuts, *estímul supra màxim*) i s'ha analitzat l'efecte de diverses drogues en la depressió sinàptica. L'histograma mostra el promig de l'amplada dels 15 primers EPPs (*columnnes blanques*) i dels 15 últims de cada tren (*columnnes farcides*). En les primeres barres de la gràfica es representa l'efecte individual de cada substància en la depressió sinàptica. El control, indica els valors obtinguts en cada múscul abans d'afegir la substància muscarínica o purinèrgica. A continuació, es mostra la interacció dels receptors d'ADO amb els mAChRs en la depressió sinàptica mitjançant incubacions seriadades. L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). Els receptors d'ADO i els mAChRs comparteixen el control funcional en la depressió sinàptica (el bloqueig dels receptors d'ADO amb el 8-SPT i el bloqueig dels mAChRs amb l'AT induïx un augment de la depressió a 40 Hz). S'ha analitzat el possible efecte additiu o oclusiu entre els dos grups de receptors. La gràfica mostra que l'ADO no pot reduir la depressió després de la preincubació amb l'AT i recíprocament, l'AT no pot augmentar la depressió després de la preincubació amb l'ADO. No obstant, l'AT no augmenta la depressió després de la incubació del 8-SPT, mentre que el 8-SPT pot augmentar addicionalment la depressió després de la incubació amb l'AT efecte similar a la seva acció independent. Per tant, el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió compartint una via en comú. Per a cada columna $n = 5-8$ músculs amb un registre 8-10 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P < 0.05$ respecte als valors controls (línia puntejada).

8.2.1 Efecte de la inhibició inespecífica dels receptors d'adenosina i la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada

En experiments realitzats prèviament en el nostre laboratori, en condicions basals es va analitzar l'efecte de la inhibició de l'activitat de la PKA amb l'antagonista selectiu H-89 (de l'anglès *N*-[2-((*p*-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl, Calbiochem, 5 μ M), causa una disminució de l'alliberació evocada (% de disminució: 50.65 ± 2.11 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul), mentre que l'activació de la PKA amb l'activador Sp-8-BrcAMP (de l'anglès *Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphorothioate, 8-Bromo-, Rp-Isomer, Sodium Salt*, 10 μ M) causa una potenciació de l'alliberació de l'acetilcolina (% increment: 84.32 ± 10.16 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; Santafé i cols., 2006, 2009) (veure més informació sobre la PKA a l'apartat 3.2.1 de la Introducció).

Anteriorment, s'ha demostrat que en les nostres condicions el bloqueig inespecífic dels receptors d'ADO amb el 8-SPT (100 μ M) no causa modificació en l'alliberació evocada (veure l'apartat 4.1.1 de Resultats). A la figura R.26 es mostra que el bloqueig de l'activitat de la PKA amb l'H-89 (5 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M) indueix una disminució de l'alliberació evocada d'acetilcolina (% de disminució: 39.47 ± 2.79 , column 5); és a dir, l'H-89 treballa normalment inhibint l'alliberació. En canvi, si activem la PKA amb l'Sp-8-BrcAMP (10 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M) no s'observa modificació en el contingut quàntic (% de variació: 2.59 ± 7.15 , figura R.26, column 6). Per tant, si es bloqueja inespecíficament els receptors d'ADO i posteriorment es bloqueja la proteïna PKA causa menys inhibició. Això podria indicar que al bloquejar els receptors d'ADO aquests participen en una millora de la neurotransmissió. Mentre que, la inhibició prèvia dels receptors d'ADO a l'estimulació de la PKA no causa cap modificació en l'alliberació evocada. Amb aquests resultats es pot deduir que els receptors d'ADO intervenen en la modulació de la proteïna PKA. Així doncs, el següent pas serà estudiar l'efecte de la PKA amb l'estimulació inespecífica dels receptors d'ADO.

8.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada

En l'apartat anterior, s'ha vist que el bloquejador de la proteïna PKA, l'H-89 és eficaç en presència de l'antagonista 8-SPT (100 μ M). Seguint la mateixa línia d'estudi amb la intenció d'observar si l'activació dels receptors d'ADO participen en aquesta inhibició de

Capítol IV. Resultats

l'alliberació d'acetilcolina, s'ha analitzat l'efecte del bloqueig de l'activitat de la PKA amb l'H-89 (5 μ M), si s'estimula prèviament els receptors d'ADO amb l'ADO exògena (25 μ M). En la **figura R.26** es mostra que en aquestes condicions, s'observa una esperable disminució en l'alliberació de la neurotransmissió (% de disminució: 29.84 ± 2.59 , *columnna 7*). És a dir, que l'H-89 també és eficaç si es sobreestimulen els receptors d'ADO amb l'ADO exògena. No obstant, si s'estimula l'activitat de la PKA amb l'Sp-8-BrcAMP (10 μ M) en presència de l'ADO (25 μ M) no es produeix variació en el contingut quàntic (% de variació: 0.72 ± 1.01 , *columnna 8*).

A partir dels resultats exposats en aquest apartat, es pot concloure que hi ha una relació funcional entre els receptors d'ADO i la PKA. L'acoblament tònic de la PKA per promoure l'alliberació d'acetilcolina (el qual pot ser inhibit amb l'H-89) es manté després de la modulació dels receptors d'ADO (amb el 8-SPT i l'ADO) en condicions basals, tot i que la inhibició prèvia dels receptors d'ADO i la segona incubació amb l'H-89 ocasiona menys inhibició millorant la neurotransmissió. Possiblement, l'acoblament de la PKA en l'alliberació evocada necessita la participació dels receptors d'ADO. No obstant, en ambdues condicions (la prèvia inhibició o estimulació purinèrgica), l'Sp-8-BrcAMP no té la capacitat d'estimular addicionalment la neurotransmissió.

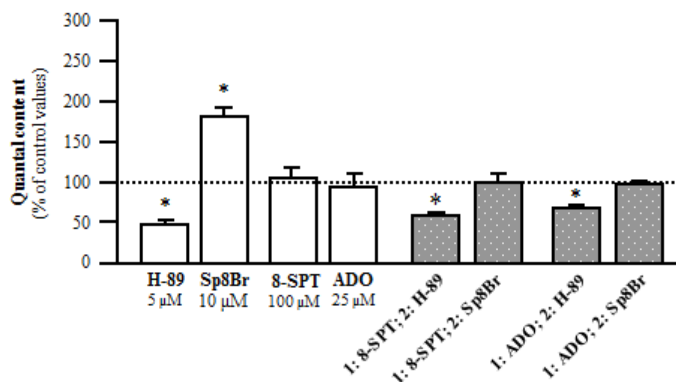


Figura R.26. Relació dels receptors d'adenosina amb la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada. A les primeres barres (a l'esquerra; *columnnes blanques*) de l'histograma es mostra l'efecte independent de les substàncies en condicions basals. A continuació es mostra l'efecte de la modulació de la PKA en presència dels moduladors purinèrgics inespecífics (*columnnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent (a sota), assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). L'alliberació evocada d'acetilcolina pot ser inhibida per l'H-89 i pot ser augmentada per l'Sp-8-BrcAMP. La gràfica mostra que després de la inhibició o de l'estimulació dels receptors d'adenosina (amb el 8-SPT o l'ADO), la PKA pot ser inhibida, però no pot ser addicionalment estimulada per l'Sp-8-BrcAMP. Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

8.3 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa C (PKC) en la neurotransmissió evocada

En els últims anys en el nostre laboratori es va veure que la PKC es troba implicada en la neurotransmissió. És per això, que s'ha proposat estudiar en aquest treball si hi ha una relació directe entre els receptors d'ADO i la proteïna PKC en l'acoblament de la neurotransmissió evocada. Per aquest estudi s'ha realitzat diferents experiments mitjançant dobles incubacions, modulant prèviament els receptors d'ADO (amb agents purinèrgics inespecífics i específics) i posteriorment s'ha modulats l'activitat de la PKC. En l'apartat 3.2.2 de la *Introducció* es mostra més informació sobre l'activitat de la PKC.

8.3.1 Efecte dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada

8.3.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada

En experiments previs en el grup es va observar que l'activació de la PKC amb el forbol éster, PMA (de l'anglès *phorbol 12-myristate 13-acetate*) potencia l'alliberació evocada d'acetilcolina (% d'increment: 97.4 ± 10.2 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul) acoblant-se a la neurotransmissió en condicions basals (1 Hz, evitant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB). Aquest efecte pot ser abolit amb la preincubació del paninhibidor calfosteïna (CaC) que actua en el mateix domini que el PMA (**Santafé i cols., 2005, 2006, 2009, 2014**). No obstant, en els resultats anteriorment exposats es mostra que en condicions basals la incubació del 8-SPT (100 μ M) com la de l'ADO exògena no modifica l'alliberació evocada (veure apartat 4.1.1 dels *Resultats*).

Per avaluar la relació funcional entre els receptors d'ADO i l'activitat de la PKC en l'alliberació evocada, primer s'ha estudiat en experiments per separat l'acció global de la modulació dels receptors purinèrgics amb l'estimulació de la PKC amb el PMA (20 nM). La inhibició o l'estimulació prèvia dels receptors d'ADO amb el 8-SPT (100 μ M) o l'ADO (25 μ M) respectivament, evita completament l'efecte potenciador del PMA (20 nM) en l'alliberació evocada (la PKC no pot ser estimulada pel PMA) (% de variació: 13.72 ± 4.62 i 14.91 ± 3.08 , respectivament; **figura R.27A, columnes 4 i 5**).

Aquests resultats suggereixen que hi ha una associació clara entre la PKC i els receptors d'ADO, perquè el previ bloqueig o l'estimulació inespecífica dels receptors d'ADO, fa que el PMA no pugui activar a la PKC per potenciar l'alliberació. Per tant, el següent

objectiu serà estudiar els receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) per separat per conèixer la seva implicació i si ho estan de la mateixa manera.

8.3.1.2 Modulació del receptor A_1 i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada

En l'apartat anterior, s'ha evidenciat una associació clara entre els receptors d'ADO i la PKC donat que, el PMA no pot activar a la PKC en presència dels moduladors purinèrgics no selectius. Per tant, amb la intenció d'estudiar si el receptor A_1 està implicat en el desacoblament de la PKC en la neurotransmissió evocada s'ha bloquejat amb l'antagonista DPCPX (100 nM) o bé s'ha estimulat amb l'agonista CCPA (1 μ M) en experiments independents, i posteriorment s'ha activat la PKC amb el PMA (20 nM). En els dos casos no s'ha observat modificació en el contingut quàntic (% de variació: 13.45 ± 3.10 i 22.90 ± 6.55 , respectivament; **figura R.27B**, *columnnes 6 i 7*). Aquests resultats indiquen que si s'activa la PKC amb l'activador PMA en presència d'un inhibidor o estimulador específic del A_1 , la PKC no pot potenciar la neurotransmissió evocada.

8.3.1.3 Modulació del receptor A_{2A} i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada

En els experiments anteriors, s'ha evidenciat la implicació del receptor A_1 en l'activació de la PKC per tant, ara serà interessant conèixer la implicació del receptor A_{2A} en la mateixa situació, activant la PKC. De la mateixa manera que en el cas anterior, s'ha bloquejat prèviament el receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM) o bé s'ha estimulat amb l'agonista CGS-21680 (1 μ M) en experiments per separat, i posteriorment s'ha activat la PKC amb el PMA (20 nM). En els dos casos no s'ha observat una variació en el contingut quàntic (% de variació: 6.78 ± 2.08 i 3.13 ± 4.30 , respectivament; **figura R.27B**, *columnnes 8 i 9*). Indicant que si s'inhibeix o s'estimula el receptor A_{2A} , la PKC no pot efectuar el seu efecte potenciant l'alliberació evocada d'acetilcolina.

Resumint, pot haver-hi una sinèrgia entre aquest dos receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) fent que la activació de la PKC no pugui fer la seva funció de potenciació. Això implica que la prèvia inhibició o estimulació o el desequilibri funcional normal dels receptors d'ADO evita l'acció potenciadora del PMA desacoblant a la PKC de l'alliberació evocada.

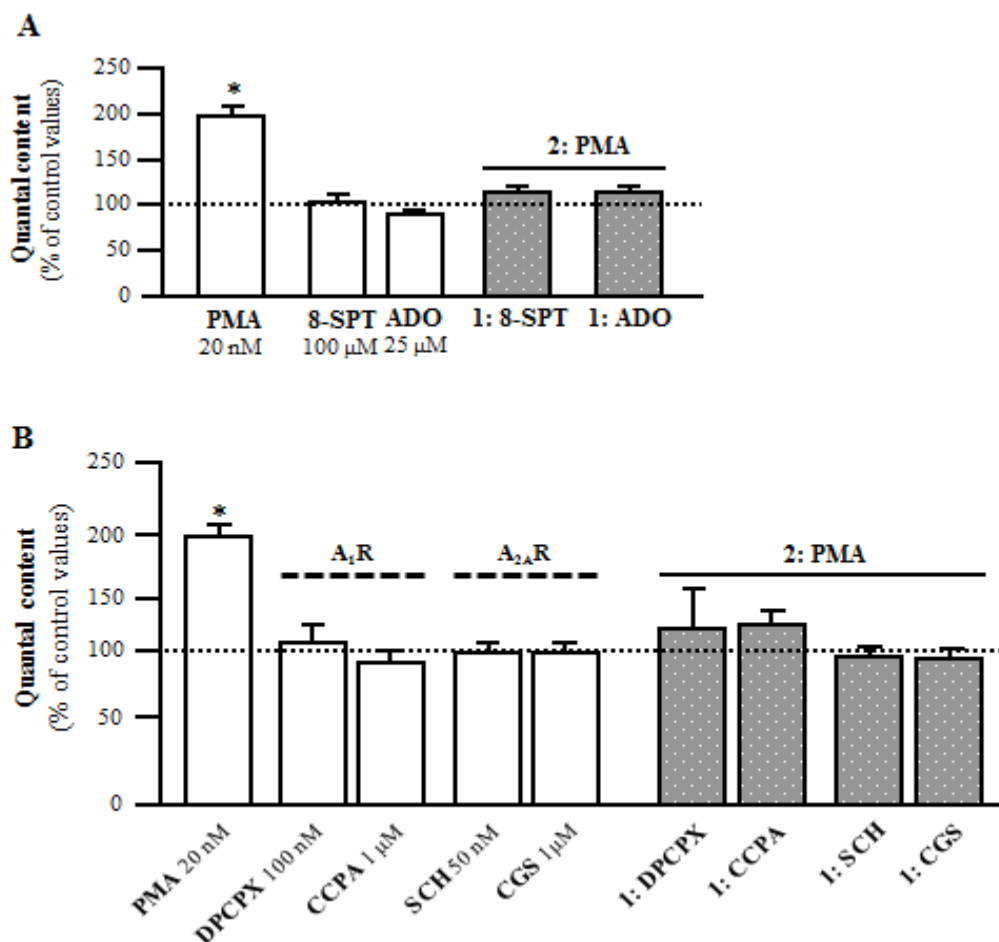


Figura R.27. Modulació dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió evocada. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnnes blanques*) es mostra l'efecte independent de les substàncies en condicions basals. A continuació, es mostra l'efecte de la modulació de la PKC en presència dels moduladors purinèrgics (*columnnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). **(A)** Estimulació de la PKC en presència dels moduladors inespecífics. L'activació de la PKC amb el PMA augmenta el contingut quàntic aproximadament 100%. No obstant, el bloqueig (8-SPT) o l'estimulació (ADO) inespecífica dels receptors d'ADO evita completament l'efecte del PMA en l'alliberació evocada (la PKC no pot ser estimulada amb el PMA). **(B)** Estimulació de la PKC en presència dels moduladors específics. La gràfica mostra que el PMA no pot potenciar l'alliberació evocada si prèviament s'ha incubat amb els moduladors dels receptors A_1 i A_{2A} (amb el DPCPX, el CCPA, l'SCH-58261 o el CGS-21680, respectivament). Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

8.3.2 Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió evocada

Amb referència als resultats anteriors, la prèvia modulació i desequilibri dels receptors d'ADO evita l'efecte potenciador del PMA desacoblant a la PKC de la neurotransmissió evocada. Per tal d'aprofundir en l'estudi de la relació funcional dels receptors d'ADO amb la PKC s'ha realitzat experiments on s'ha modulats prèviament els receptors d'ADO, i posteriorment s'ha bloquejat l'activitat de la PKC amb la CaC. En estudis preliminars en el nostre laboratori, es va observar que en condicions basals i mantenint la funció preservada, la PKC es troba desacoblada de l'alliberació evocada, perquè la inhibició d'aquesta proteïna amb la CaC (10 μ M) no afecta a l'alliberació evocada (% de variació: 6.42 ± 2.08 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2005**). No obstant, es va veure que l'increment de Ca^{+2} en la solució fisiològica (a 5 mM) o bé quan les fibres nervioses que innerven les NMJs són estimulades contínuament a baixes freqüències (1 Hz), la PKC s'acobla a la neurotransmissió podent ser inhibida per la CaC (**Santafé i cols., 2005, 2009; Besalduch i cols., 2010**). Es pot pensar que la PKC és dependent de la entrada de Ca^{+2} a través dels canals P/Q, sent una condició necessària per produir la secreció evocada d'acetilcolina, així com es pot suggerir una implicació de la PKC en el manteniment de l'activitat sinàptica continua (**Santafé i cols., 2005, 2009; Besalduch i cols., 2010; Lanuza i cols., 2014**). En l'apartat 3.2 de la *Introducció* es mostra més informació sobre l'acoblament de la PKC en la neurotransmissió evocada i la interacció d'aquesta proteïna en altres vies de senyalització. A continuació, s'avaluarà l'efecte de la modulació inespecífica dels receptors d'ADO i la inhibició de la PKC en aquestes dues condicions en les quals aquesta proteïna es troba acoblada a la neurotransmissió evocada i pot ser inhibida per la CaC (a 1 Hz i amb alt Ca^{+2} extern).

8.3.2.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'un estímul continu (1 Hz) en la neurotransmissió evocada

En articles previs publicats en el grup, es va demostrar que quan el nervi s'estimula a baixa freqüència (1 Hz) durant 1 hora i posteriorment es bloquegen totes les isoformes de la família de la PKC amb la CaC (10 μ M) es redueix l'alliberació evocada un 40% ($P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul). Així mateix, en un experiment control realitzat prèviament en el laboratori es va mostrar que l'estimulació continua del nervi a 1 Hz no canvia l'amplada dels EPPs (**Besalduch i cols., 2010; Lanuza i cols., 2014**). Així mateix, com s'ha vist en l'apartat 4.1.1 dels *Resultats* la modulació inespecífica dels receptors d'ADO no modifica el contingut quàntic.

En el present estudi, realitzant experiments independents s'ha observat que si es bloqueja la PKC amb la CaC (10 μ M) amb estimulació elèctrica continua a 1 Hz en presència del 8-SPT (100 μ M) o bé de l'ADO (25 μ M) no s'observen canvis en el contingut quàntic (% de variació: 0.71 ± 10.94 i 9.05 ± 7.68 respectivament; **figura R.28**, columnes 4 i 5). En resum, la prèvia modulació inespecífica dels receptors d'ADO i la segona incubació amb la CaC (10 μ M) amb l'estimulació elèctrica constant d'1 Hz evita completament l'efecte inhibitori de la CaC, desacoblant a la PKC de la neurotransmissió evocada.

8.3.2.2 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'altres concentracions de calci extern en la neurotransmissió evocada

En l'apartat anterior, s'ha vist que la CaC amb un estímul elèctric constant en presència dels moduladors purinèrgics inespecífics no pot inhibir l'alliberació evocada. Per confirmar aquests resultats s'han repetit els mateixos experiments però en presència d'altres concentracions de Ca^{+2} extern. En estudis anteriors realitzats al nostre laboratori, es va veure que la CaC (10 μ M) en presència d'altres concentracions externes de Ca^{+2} (5 mM) produeix una disminució de l'alliberació evocada (% de reducció: 35.07 ± 1.70 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2005**). En aquest cas, el pretractament amb el bloquejador inespecífic 8-SPT (100 μ M) o bé l'estimulació inespecífica amb l'ADO (25 μ M), i la segona incubació amb la CaC (10 μ M) a altres concentracions de Ca^{+2} (5 mM), en ambdues situacions, no s'indueix canvis en el contingut quàntic (% de variació: 3.47 ± 3.94 i 0.05 ± 2.14 respectivament; **figura R.28**, columnes 7 i 8). Aquests resultats coincideixen amb els resultats de l'apartat anterior.

Els resultats obtinguts en aquest apartat mostren que quan els receptors d'ADO són plenament inhibits en presència del 8-SPT, estimulats amb l'ADO o bé hi ha desequilibri en el funcionament normal dels receptors A_1 o A_{2A} (amb l'addició exògena dels moduladors purinèrgics selectius), l'efecte potenciador del PMA i l'inhibidor de la CaC (sota un estímul elèctric continu del nervi frènic a 1 Hz o bé incrementant la solució fisiològica amb altres concentracions de Ca^{+2}) es evita, desacoblant la PKC de la neurotransmissió evocada. Com a resultat d'aquestes observacions, es pot concloure que possiblement els receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) modulen l'activitat de la proteïna de la PKC i que probablement l'acoblament de la PKC a la neurotransmissió necessita un equilibri normal dels receptors d'ADO. Per tant, sembla clara la dependència de la PKC i els receptors d'ADO en la neurotransmissió evocada.

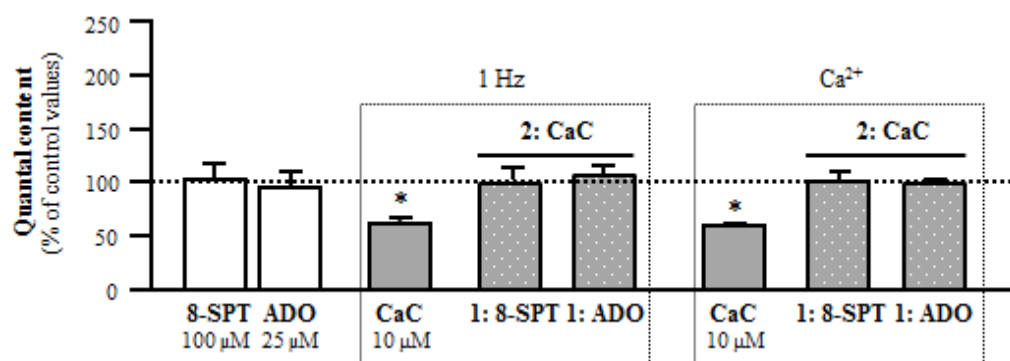


Figura R.28. Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió evocada. Les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent dels moduladors purinèrgics inespecífics. En estudis previs en el laboratori es va analitzar l'efecte del paninhibidor de la PKC, la CaC, i en condicions basals no pot inhibir l'alliberació evocada (Santafé i cols., 2006). No obstant, amb l'estimulació elèctrica continua (a 1 Hz) o la presència de Ca²⁺ extracel·lular (5 mM) s'ha observat que la PKC s'acobla a l'alliberació evocada i pot ser inhibida per la CaC (*columnes grises llises*). A continuació, es representa l'efecte de la CaC en presència dels moduladors purinèrgics. L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La gràfica mostra que el previ bloqueig (8-SPT) o l'estimulació (ADO) dels receptors d'ADO amb un tren d'estimulació continu a 1 Hz (*box 1*) o bé en condicions d'altres concentracions de Ca²⁺ (*box 2*) s'evita completament l'efecte inhibitori de la CaC en l'alliberació evocada. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, *P > 0.05, respecte als valors inicials (línia puntejada).

8.4 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió evocada

La transmissió neuromuscular depèn fortament de l'influx del Ca²⁺ a través dels canals de calci dependents de voltatge (VDCCs, Katz i Miledi, 1970), especialment del canal P/Q (Uchitel i cols., 1992; Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Hong i Chang, 1995). En articles publicats en el grup, es va trobar una relació funcional entre els mAChRs, la PKA i la PKC amb l'entrada de Ca²⁺ a través dels VDCCs del tipus P/Q (Santafé i cols., 2003, 2006; veure amb més detall l'apartat 3 de la *Introducció*). Degut a aquest antecedents, en el present estudi s'ha proposat estudiar la possible relació funcional entre els VDCCs del tipus P/Q i els receptors d'ADO.

8.4.1 Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels VDCCs tipus P/Q en la neurotransmissió evocada

Amb la intenció d'estudiar la relació funcional dels receptors d'ADO i els VDCCs, en estudis previs en el grup es va observar que el bloqueig dels canals P/Q amb l' ω -Agatoxina IVA (ω -Aga IVA, 100 nM), redueix significativament el contingut quàntic (% de disminució: 75 ± 15.4 , $P < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul) degut a una disminució de l'entrada de Ca^{+2} (Santafé i cols., 2003). Així mateix, en experiments anteriors s'ha demostrat que l'estimulació inespecífica de tots els receptors d'ADO no proporciona una modificació en l'alliberació evocada d'acetilcolina (veure l'apartat 4.1.1 dels *Resultats*).

S'ha decidit estudiar l'efecte del bloqueig dels canals P/Q amb l'antagonista ω -Aga IVA (100 nM) en presència de l'estimulador inespecífic ADO (25 μ M). En aquestes condicions, l' ω -Aga IVA disminueix l'alliberació evocada d'acetilcolina (% de disminució 75.51 ± 16.4 , **figura R.29**, *columna 3*) tenint un efecte similar al que fa la pròpia ω -Aga IVA en condicions basals. A continuació, s'ha realitzat l'experiment a la inversa i s'observa que l'ADO (25 μ M), tenint prèviament els canals P/Q bloquejats amb l' ω -Aga IVA, indueix una potenciació de la neurotransmissió (% d'increment: 103.50 ± 11.2 , **figura R.29**, *columna 4*). En resum, possiblement existeix una dependència entre els receptors d'ADO amb els VDCCs de tipus P/Q, ja que disminuint l'entrada de Ca^{+2} amb el bloqueig dels canals P/Q, l'ADO pot augmentar l'alliberació evocada.

8.4.2 Efecte de l'adenosina exògena en presència d'altres concentracions de magnesi en la neurotransmissió evocada

En l'apartat anterior descrit, s'ha evidenciat que el bloqueig dels canals P/Q amb l' ω -Aga IVA podien beneficiar als receptors d'ADO de tal forma que l'ADO exògena podia potenciar la neurotransmissió evocada. Podria ser, que al no entrar Ca^{+2} pel canals P/Q això provoqués aquesta situació. Per evidenciar aquest fet, s'han fet experiments utilitzant altres concentracions Mg^{+2} exogen. En estudis previs en el laboratori es va veure que incrementant la concentració de Mg^{+2} en la solució fisiològica (a 5 mM), és a dir, en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} , es va observar una reducció l'alliberació d'acetilcolina (Santafé i cols., 2007), donat que el Mg^{+2} en el terminal nerviós bloqueja l'alliberació evocada d'acetilcolina, per un bloqueig del lloc d'entrada del Ca^{+2} de manera competitiva (Jenkinson, 1957; Kharasch i cols., 1981). Experimentalment, en les nostres condicions s'ha realitzat dues tandes d'experiments paral·lels on s'ha incubat la preparació amb l'ADO (25 μ M) en presència d'un medi de Mg^{+2} a

Capítol IV. Resultats

dues concentracions diferents (0.5 i 1 mM). En aquestes dues condicions, no s'observen canvis en el contingut quàntic (% de variació Mg^{+2} (0.5 mM): 2.66 ± 11.94 ; Mg^{+2} (1 mM): 2.31 ± 10.95 , **figura R.29**, *columnnes 5 i 6*, respectivament). Per tant, en una situació de baixa entrada de Ca^{+2} l'ADO exògena conjuntament amb l'endògena és suficient per evitar aquesta inhibició provocada pel Mg^{+2} .

En resum, es pot concloure que hi ha una relació dels receptors d'ADO amb els VDCCs tipus P/Q, donat que si es bloqueja prèviament la entrada de Ca^{+2} a través dels canals P/Q amb l' ω -Aga IVA, l'ADO exògena potencia l'alliberació evocada fet que no s'observa en la situació inversa. A més, en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} (altes concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica), l'ADO exògena conjuntament amb endògena evita l'efecte inhibitori provocat pel Mg^{+2} .

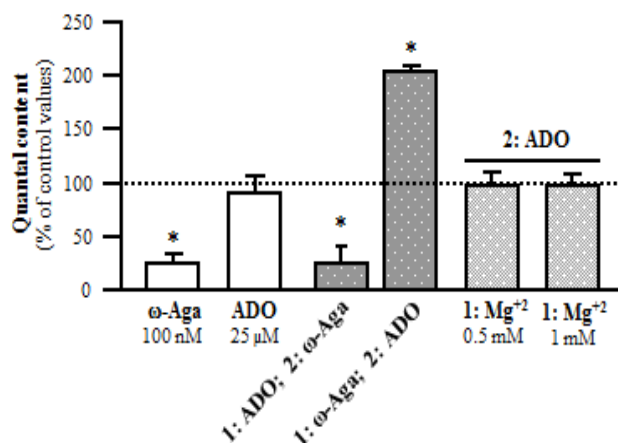


Figura R.29. Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) i en condicions de baixa entrada de calci en la neurotransmissió evocada. Les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnnes blanques*) es mostra l'efecte independent en condicions basals de l'inhibidor del canal P/Q l' ω -Agatoxina IVA (ω -Aga IVA) i de l'ADO. A continuació, es mostra l'efecte de l'ADO amb la inhibició dels canals P/Q (*columnnes grises*) i l'efecte de l'ADO en presència del Mg^{+2} (0.5 i 1 mM; condicions de baix Ca^{+2} ; *columnnes grises flux*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). En estudis previs es va observar que la inhibició del canal P/Q amb l' ω -Aga IVA causa una disminució significativa del contingut quàntic del 75% aproximadament. El gràfic mostra que el pretractament amb l'ADO i la posterior incubació amb l' ω -Aga IVA disminueix l'alliberació evocada. Però pel contrari, el bloqueig previ dels canals P/Q i la segona incubació amb l'ADO induïu una potenciació de l'alliberació evocada. Per un altre banda, l'increment de Mg^{+2} en la solució fisiològica (baixa entrada de Ca^{+2}) en condicions basals produeix una disminució de l'alliberació evocada (*resultats no il·lustrats*). No obstant, l'ADO exògena en presència de Mg^{+2} evita aquesta disminució de l'alliberació produint una no variació del contingut quàntic. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

9. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA

Una vegada estudiat l'efecte dels receptors d'ADO en diferents vies de senyalització en la neurotransmissió evocada a continuació, s'ha estudiat la relació funcional dels receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània en aquestes vies de senyalització. Recordem, que per poder estimar el contingut quàntic pel mètode directe, s'han registrat simultàniament i intracel·lularment els EPPs i els espontanis (mEPPs). Pel registre dels mEPPs s'introdueix l'elèctrode de registre en la fibra muscular i es registre durant un minut o bé fins l'adquisició de 100 episodis/esdeveniments a partir del primer mEPP que surt de forma espontània dins dels deu primers segons per a cada fibra avaluada i on no es necessita bloquejar la contracció muscular, ni l'activació del potencial d'acció. S'ha descartat l'efecte postsinàptic donat que en cap dels experiments realitzats no s'ha observat modificació en l'amplada dels mEPPs al afegir la substància o compost químic (veure variació d'amplades dels mEPPs de les substàncies purinèrgiques en les **figures R.14-15** de l'apartat 5 de *Resultats*). Com en el cas anterior, aquest tipus d'experiments requereixen dobles incubacions, per estudiar com l'alliberació espontània es modulada pels canvis en l'activitat dels receptors d'ADO i d'aquestes molècules (veure procediment detallat a l'apartat 10.8 de *Materials i Mètodes*).

9.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en l'alliberació espontània

En el present estudi, s'ha estudiat la participació dels receptors d'ADO amb els mAChRs en la neurotransmissió espontània. En els estudis anteriors realitzats, s'ha evidenciat que els receptors d'ADO es troben implicats en l'alliberació espontània, donat que el bloqueig dels receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT i l'estimulació amb l'ADO augmenta i disminueix la freqüència dels mEPPs, respectivament. No obstant, sembla ser que el receptor A₁ únicament té el paper conservador de la funció sinàptica limitant l'alliberació espontània, ja que el bloqueig d'aquest receptor amb l'antagonista DPCPX augmenta la freqüència dels mEPPs, mentre que la resta de moduladors purinèrgics no afecten a l'alliberació espontània (veure apartat 5.1.1 de *Resultats*). En estudis previs realitzats en el nostre laboratori, es va observar que la modulació no selectiva dels mAChRs (amb l'AT o l'OXO-M) o el desequilibri en la funció normal dels receptors M1 o M2 disminueix la freqüència dels mEPPs, tenint un paper conservador en la neurotransmissió espontània (**Tomàs i cols., 2014**).

9.1.1 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics

Per avaluar la relació funcional entre els receptors d'ADO i els mAChRs, s'ha realitzat diferents experiments preincubant amb els moduladors purinèrgics i a continuació, s'ha fet una segona incubació bloquejant inespecíficament els mAChRs amb l'AT. En estudis previs en el nostre grup, es va observar que l'AT (2 μ M) disminueix la freqüència dels mEPPs (% de disminució: 71.51 ± 1.25 , $P < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; **Tomàs i cols., 2014**). Primer, en el present estudi s'ha analitzat l'efecte de l'AT (2 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M) i a continuació, s'ha realitzat el mateix experiment però en la situació inversa. En aquestes dues condicions no s'observen canvis en l'alliberació espontània (% de variació: 3.90 ± 10.90 i 35.55 ± 18.96 , respectivament; **figura R.30, columnes 5 i 8**). Així mateix, s'ha estudiat la situació contrària, pretractant la preparació amb l'ADO (25 μ M) i realitzant una segona incubació amb l'AT. En aquest cas, també s'ha avaluat la situació a la inversa. I en les dues condicions no s'han observat canvis en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 14.56 ± 4.15 i 26.64 ± 5.87 , respectivament; **figura R.30, columnes 6 i 9**). Aquests resultats preliminars mostren que possiblement hi ha una relació funcional entre els receptors d'ADO i els mAChRs, perquè el bloqueig (8-SPT) o l'estimulació (ADO) prèvia dels receptors d'ADO evita l'efecte inhibitori de l'AT en l'alliberació espontània. Així mateix, la presència de l'AT evita l'efecte excitatori del 8-SPT i l'acció inhibitoria de l'ADO a concentracions micromolars. Per confirmar aquesta relació es faran experiments amb la CADO.

9.1.2 Efecte de la CADO quan es bloquegen tots els receptors muscarínics en la neurotransmissió espontània

Donat que en els experiments anteriors, s'ha vist que l'AT en presència de l'ADO, com en la situació inversa, no produeix efecte en l'alliberació espontània. A més, en estudis previs exposats s'ha observat que la CADO en presència de l'AT com a la situació inversa, no afecta a l'alliberació evocada confirmant una relació entre els receptors d'ADO i els mAChRs en la neurotransmissió evocada (veure apartat 8.1.1.2 de *Resultats*). Tot i que, s'ha observat que la CADO (10 μ M) no modifica l'alliberació espontània (veure apartat 5.3 de *Resultats*), a l'estimar el contingut quàntic i registrar de forma simultània els EPPs i els mEPPs s'ha avaluat si l'anàleg de l'ADO, la CADO (10 μ M), que s'uneix de forma irreversible al receptor d'ADO, pot tenir algun efecte en l'alliberació espontània. Per realitzar aquest anàlisi, primer s'ha avaluat l'efecte de l'AT (2 μ M) en presència de la CADO (10 μ M). Posteriorment, s'ha

realitzat l'experiment a la inversa per avaluar si l'efecte és recíproc com en els experiments anteriors, i en els dos casos la freqüència dels mEPPs no es veu afectada (% de variació: 9.55 ± 8.27 i 4.41 ± 6.36 , respectivament; **figura R.30**, *columnes 7 i 10*). Aquests resultats es poden interpretar com que possiblement hi ha una dependència entre els receptors d'ADO i els mAChRs però en aquest cas de forma unidireccional, perquè la preincubació de la CADO evita l'efecte inhibitori de l'AT. En canvi a la inversa, l'efecte de l'AT no afecta l'acció de la CADO ($10 \mu\text{M}$) al no modificar la freqüència dels mEPPs, ja que en aquesta situació s'observa un comportament similar en l'alliberació espontània a l'efecte independent que té aquesta substància (veure apartat 5.3 de *Resultats*).

9.1.3 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M1

Continuant aprofundint en els resultats obtinguts anteriorment, s'ha estudiat la implicació de cada subtipus de receptor d'ADO (A_1 i A_{2A}) i mAChRs (M1 i M2) per separat. Per dur a terme aquest estudi s'ha realitzat una sèrie d'experiments. Primer s'ha modulats els receptors d'ADO de forma inespecífica o selectiva i després s'ha fet una segona incubació amb l'inhibidor del receptor tipus M1 amb la PIR. En estudis preliminars realitzats al nostre laboratori, es va veure que la PIR ($10 \mu\text{M}$) disminueix la freqüència dels mEPPs (% de disminució: 36.52 ± 0.56 , $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Tomàs i cols., 2014**). Els experiments que s'han realitzat en el present estudi mostren que la PIR ($10 \mu\text{M}$) en presència de l'antagonista 8-SPT ($100 \mu\text{M}$) o bé de l'ADO ($25 \mu\text{M}$) no indueix canvis en la freqüència del mEPPs (% de variació: 6.91 ± 14.90 i 7.46 ± 4.15 , respectivament; **figura R.31A**, *columnes 6 i 7*). Per consegüent, si es bloqueja específicament el receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX (100 nM) o el receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 (50 nM), la PIR ($10 \mu\text{M}$) no pot modificar l'alliberació espontània (% de variació 5.15 ± 3.55 i 11.49 ± 4.70 , respectivament; **figura R.31A**, *columnes 8 i 9*). Possiblement, aquests resultats indiquen que hi ha una possible relació entre els receptors M1 i els receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània, perquè la modulació prèvia dels receptors d'ADO evita l'efecte inhibitori de la PIR.

Capítol IV. Resultats

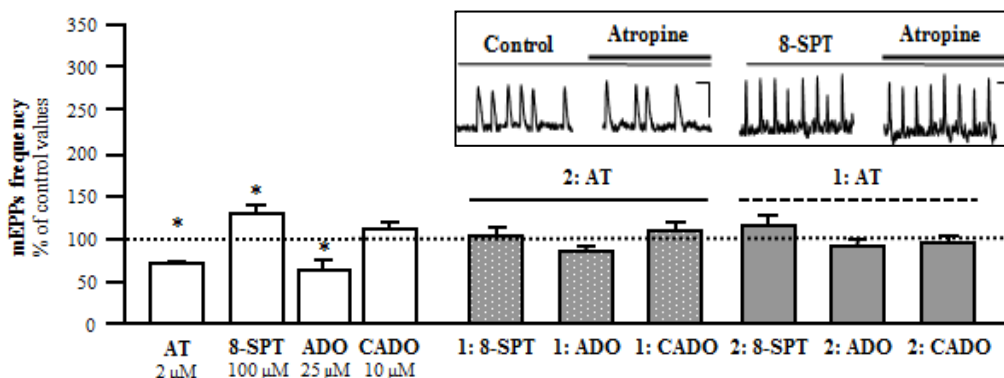


Figura R.30. Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina juntament amb la inhibició dels receptors muscarínics. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent de les substàncies muscaríniques i purinèrgiques en l'alliberació espontània. A continuació, es mostra l'efecte de la modulació inespecífica dels receptors d'ADO juntament amb el bloqueig inespecífic dels mAChRs amb l'atropina (AT) (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La gràfica indica que l'AT no pot canviar l'alliberació espontània d'acetilcolina quan prèviament els receptors d'ADO són inhibits (8-SPT) o estimulats (ADO). En experiments recíprocs, la preincubació de l'AT evita l'acció de potenciació efectuada pel 8-SPT o la disminució de l'alliberació induïda per l'ADO. Ni l'AT ni la CADO tenen efecte en la freqüència dels mEPPs després de la preincubació de l'altre component. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana ± SEM, * $P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada). A la *box* de dalt, es presenta uns exemples de registres de mEPPs de l'acció de l'AT en l'alliberació espontània (esquerra) i la falta d'efecte de l'AT en presència del 8-SPT. Barra d'escala horitzontal: 25 ms (esquerra) i 50 ms (dreta), respectivament, i vertical: 1 mV per ambdós casos.

9.1.4 Efecte en la neurotransmissió espontània quan es modulen els receptors d'adenosina i es bloquegen únicament els receptors muscarínics tipus M2

Una vegada, coneguda la possible relació entre els receptors d'ADO i els receptors tipus M1, s'han realitzat un altre sèrie d'experiments en paral·lel similars als anteriors per avaluar la relació dels receptors d'ADO amb el receptor M2. En experiments previs en el nostre laboratori es va observar que l'inhibidor del subtipus M2, la MET (1 µM) disminueix l'alliberació espontània (% de disminució: 42.9 ± 13.31 , $P < 0.05$, n = 5, mínim 15 fibres per múscul; Tomàs i cols., 2014). Per analitzar aquesta relació, com en l'apartat anterior s'ha preincubat la preparació amb el 8-SPT (100 µM) o bé amb l'ADO (25 µM) i posteriorment, s'ha fet una segona incubació amb la MET (1 µM). En cap dels dos casos no s'ha observat una modificació en la freqüència dels mEPPs (% de variació 14.32 ± 20.32 i 13.69 ± 0.90 , respectivament; figura R.31B, columnes 6 i 7). Seguidament, s'ha estudiat en experiments independents l'efecte de la MET (1 µM) en presència dels bloquejadors selectius dels receptors A₁ i A_{2A} per avaluar la seva possible implicació. Experimentalment, la MET (1 µM) tampoc

indueix canvis en la freqüència dels mEPPs en presència dels antagonistes DPCPX (100 nM) o SCH-58161 (50 nM) (% de variació: 8.71 ± 3.55 i 29.54 ± 15.54 , respectivament; **figura R.31B**, *columnes 8 i 9*). Com en el cas del receptor M1, la modulació prèvia dels receptors d'ADO evita l'efecte inhibitori de la MET, suggerint que hi ha una possible relació entre els receptors d'ADO i el receptor tipus M2.

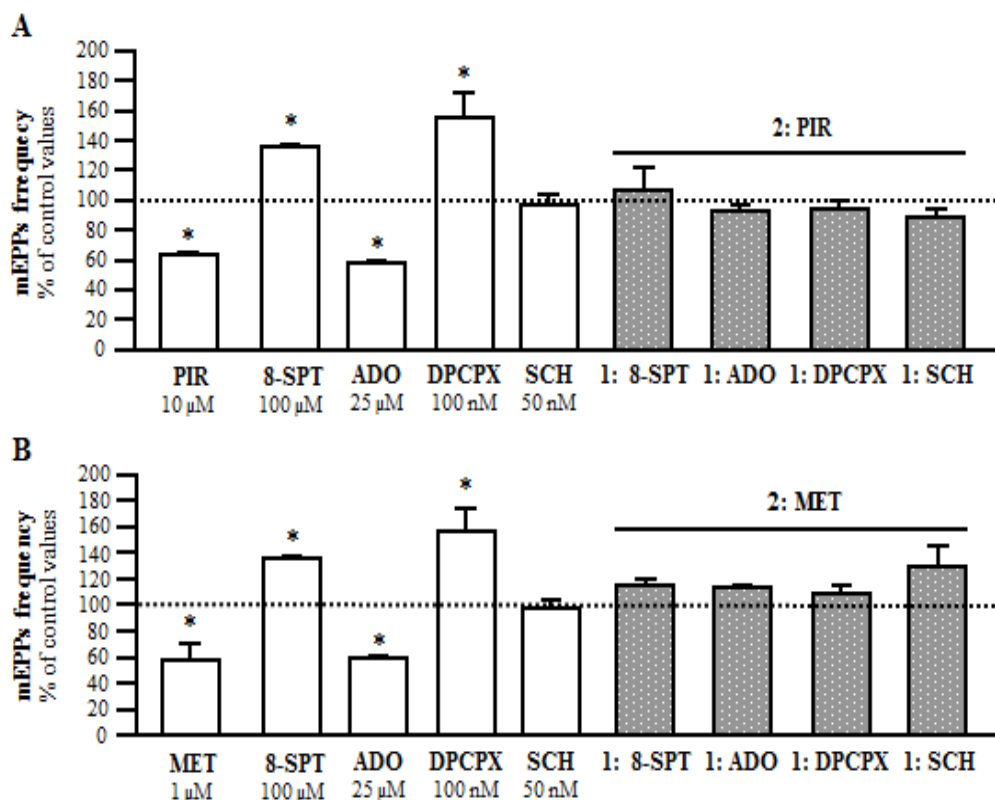


Figura R.31. Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina juntament amb el bloqueig dels receptors muscarínics tipus M1 i M2 en la neurotransmissió espontània. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent de la pirenzepina (PIR, inhibidor del receptor M1), la metocramina (MET, inhibidor del receptor M2) i dels moduladors purinèrgics en l'alliberació espontània. A continuació, es mostra l'efecte de la PIR (**A**) i de la MET (**B**) en presència dels moduladors dels receptors d'ADO (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La gràfica indica que la PIR i la MET no poden modificar la freqüència dels mEPPs en presència dels moduladors inespecífics (8-SPT i ADO) i dels inhibidors específics dels receptors A_1 i A_{2A} (DPCPX i SCH-58261, respectivament). Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

Els resultats exposats en aquest apartat mostren que si els receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) es troben acoblats a la neurotransmissió espontània necessiten el funcionament normal dels mAChRs ($M1$ i $M2$) i viceversa. Donat que el pretractament amb l'AT evita l'efecte excitatori i inhibitori dels moduladors purinèrgics (8-SPT i ADO, respectivament). Així mateix, la presència dels moduladors purinèrgics inespecífics i dels bloquejadors selectius dels receptors A_1 i A_{2A} eviten l'efecte inhibitori de l'AT, PIR i MET. Per tant, es confirma que hi ha una absoluta interdependència dels receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) i els mAChRs ($M1$ i $M2$) per modular la neurotransmissió espontània en condicions basals. Per un altre banda, l'estimulació prolongada dels receptors d'ADO (CADO) fa que aquesta relació sigui unidireccional, donat que la CADO en presència de l'AT no es produeix modificacions en la freqüència dels mEPPs, on la CADO té el mateix comportament en l'alliberació espontània que en situacions basals.

9.2 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa A (PKA) en la neurotransmissió espontània

En l'apartat 8.2 de *Resultats* s'ha evidenciat una relació funcional entre els receptors d'ADO i l'activitat de la PKA en la neurotransmissió evocada. Per tant, en aquest apartat de la tesi s'ha decidit analitzar aquesta relació en la neurotransmissió espontània modulant l'activitat de la PKA en presència dels moduladors purinèrgics. En estudis previs publicats en el nostre grup, es va veure la inactivació de la proteïna PKA amb l'H-89 (5 μ M) no modifica la freqüència dels mEPPs, mentre que la seva activació amb l'Sp-8-BrcAMP (10 μ M) augmenta l'alliberació espontània (% de variació: 17.97 ± 6.26 i $150-200 \pm 3.36$, respectivament, $P < 0.05$, $n = 5$, mínim 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2006**). En experiments anteriors, s'ha evidenciat la participació dels receptors d'ADO en l'alliberació espontània, ja que la modulació d'aquest receptors (8-SPT i ADO) augmenta i disminueix la freqüència del mEPPs (veure l'apartat 5.1.1 de *Resultats*).

9.2.1 Efecte de la inhibició inespecífica dels receptors d'adenosina i la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània

Amb el propòsit d'aprofundir en l'estudi de la relació funcional dels receptors d'ADO amb l'activitat de la PKA, s'han bloquejat prèviament tots els receptors d'ADO amb el 8-SPT (100 μ M) i després s'ha inhibit la PKA amb l'H-89 (5 μ M) i no s'ha observat modificació en l'alliberació espontània (% de variació: 26.90 ± 17.82 , **figura R.32, columna 5**). En canvi, si s'estimula la PKA amb l'activador Sp-8-BrcAMP (10 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M)

s'observa una potenciació de l'alliberació (% d'increment: 152.74 ± 34.28 , **figura R.32**, *columna 6*). Per tant, l'H-89 i l'Sp-8-BrcAMP té un efecte similar en la neurotransmissió espontània en presència o en absència del 8-SPT. El següent pas, serà estudiar l'efecte de l'ADO exògena en la modulació de l'activitat de la PKA.

9.2.2 Efecte de l'adenosina exògena i la modulació l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània

Seguint la mateixa línia d'estudi s'ha avaluat la situació contrària, l'efecte de la modulació de l'activitat PKA en presència de l'ADO. En aquest cas, si es bloqueja la PKA amb l'H-89 (5 μ M) en presència de l'ADO (25 μ M) no s'observa canvis significatius en la freqüència dels mEPPs (% de variació 23.48 ± 6.56 , **figura R.32**, *columna 7*). Pel contrari, si s'estimula la PKA amb l'activador Sp-8-BrcAMP (10 μ M) s'observa una potenciació de l'alliberació d'acetilcolina (% d'increment: 73.96 ± 22.17 , **figura R.32**, *columna 8*). Com en el cas anterior, l'efecte dels moduladors de l'activitat de la PKA no es veuen afectats en presència de l'ADO.

En aquest apartat es podria concloure que, els receptors d'ADO no tenen relació amb la PKA en l'alliberació espontània. Perquè l'estat dels receptors d'ADO no afecta a l'acoblament de la PKA en la neurotransmissió espontània.

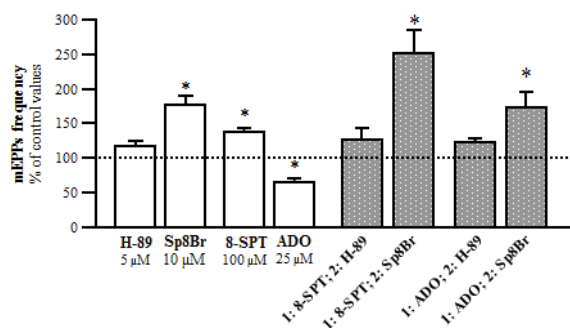


Figura R.32. Relació dels receptors d'adenosina amb la modulació de l'activitat de la PKA en la neurotransmissió espontània. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent dels moduladors de l'activitat de la PKA i dels purinèrgics en l'alliberació espontània. A continuació, es mostra l'efecte de la modulació de l'activitat de la PKA en presència dels moduladors dels receptors d'ADO (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent (a sota), assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). La gràfica indica que l'acció de l'H-89 (que no induïx una variació en la freqüència dels mEPPs) i de l'Sp-8-Br-cAMP (dóna un augment d'alliberació espontània del 150-200%, aproximadament) s'observa el mateix comportament quan són aplicades de forma independent que amb la incubació prèvia dels moduladors purinèrgics. Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

9.3 Relació entre els receptors d'adenosina i la proteïna quinasa C (PKC) en la neurotransmissió espontània

9.3.1 Efecte dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània

Un altre dels propòsits d'aquest treball, ha sigut estudiar la relació funcional dels receptors d'ADO i la PKC en la neurotransmissió espontània. En la primera tanda d'experiments realitzats per aquest estudi, s'ha avaluat l'efecte de la modulació purinèrgica amb l'estimulació de la PKC. Es coneix mitjançant experiments realitzats anteriorment en el laboratori, que l'activació de la PKC amb el PMA causa un augment en la freqüència dels mEPPs (% d'increment 200 ± 15.00 , $P < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2005**). Com s'ha vist prèviament en els experiments de l'apartat 5.1 de *Resultats*, el 8-SPT i l'ADO causen un augment i una disminució de l'alliberació, respectivament. Sembla ser que el causant de la potenciació donada pel 8-SPT sigui el receptor A_1 perquè la incubació amb l'antagonista DPCPX (100 nM) també causa un augment de la freqüència, mentre que la resta moduladors selectius no tenen efecte en l'alliberació espontània.

9.3.1.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània

Amb la intenció d'estudiar l'efecte dels receptors d'ADO amb l'estimulació de l'activitat de la PKC, s'han bloquejat tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μ M), i a continuació, s'ha activat la PKC amb el PMA (20 nM). En aquestes condicions s'ha observat un augment en l'alliberació espontània (% d'increment: 91.42 ± 9.68 , **figura R.33A, columna 4**), una potenciació inferior que la que causa el PMA però superior a la que causa el 8-SPT. Possiblement, aquest resultat pot suggerir, que el receptor A_1 modula la unitat moduladora de la proteïna PKC augmentant aquesta alliberació espontània. En un altre experiment paral·lel, s'ha avaluat l'efecte del PMA (20 nM) en presència de l'ADO (25 μ M). En aquest cas, s'observa que el PMA causa una potenciació de l'alliberació espontània (% d'increment: 110.46 ± 18.54 , **figura R.33A, columna 5**), però una menor potenciació que l'observada pel PMA sol. Possiblement, l'ADO exògena activa al receptor A_1 , obtenint una situació inhibidòria que modularà l'activitat de PKC augmentant l'alliberació de l'acetilcolina. Resumint, aquests resultats preliminars mostren que la presència dels moduladors purinèrgics inespecífics fa que el PMA augmenti l'alliberació espontània però de manera inferior que

l'acció independent del PMA, suggerint una possible implicació del receptor A_1 en la modulació de l'activitat de la PKC. Per confirmar aquesta afirmació s'ha estudiat la implicació dels receptors A_1 i A_{2A} en l'efecte de l'estimulació de la PKC.

9.3.1.2 Modulació del receptor A_1 i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània

En aquest apartat s'ha activat la proteïna PKC amb el PMA (20 nM) en presència de l'antagonista del receptor A_1 , DPCPX (100 nM), i s'ha observat una potenciació de l'alliberació espontània (% d'increment: 78.12 ± 22.15 , **figura R.33B**, *columna 6*) però menys que l'efecte causat pel PMA sol. Per un altre banda, en un altre experiment per separat s'ha estimulat la PKC en presència de l'agonista del receptor A_1 , CCPA (1 μ M), i s'observa que el PMA produeix un augment de la freqüència (% d'increment: 350.52 ± 8.22 , **figura R.33B**, *columna 7*) superior a l'acció independent del PMA. Aquests resultats suggereixen que possiblement pot haver una relació entre els receptor A_1 i la PKC, perquè el PMA no té un efecte tan potenciador quan el receptor A_1 es troba prèviament bloquejat però en canvi, el seu efecte potenciador es veu augmentat quan prèviament s'estimula el receptor A_1 . Per confirmar aquesta afirmació en el següent apartat s'estudiarà la implicació del receptor A_{2A} en l'estimulació de la PKC.

9.3.1.3 Modulació del receptor A_{2A} i l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània

Una vegada que s'ha vist que possiblement hi ha una relació entre el receptor A_1 i la PKC, s'ha analitzat l'efecte del PMA (20 nM) en presència de l'antagonista SCH-58261 (50 nM) i en aquest cas el PMA no afecta a la freqüència del mEPPs (% de variació: 18.79 ± 3.40 , **figura R.33B**, *columna 8*). Pel contrari, el PMA (20 nM) en presència de l'agonista CGS-21680 (1 μ M) causa una potenciació en l'alliberació espontània (% d'increment: 109.44 ± 14.72 , **figura R.33B**, *columna 9*) però menor que l'efecte potenciador del PMA sol. És a dir, el PMA no pot potenciar l'alliberació quan es troba al receptor A_{2A} prèviament bloquejat i no té un efecte tan potenciador quan s'estimula el receptor A_{2A} .

Resumint aquest apartat, pot haver una relació entre els receptors d'ADO i l'activació de la PKC, perquè la presència dels moduladors inespecífics, del bloquejador del receptor A_1 o bé l'estimulador del receptor A_{2A} fan que el PMA no tingui un efecte tan potenciador. En

Capítol IV. Resultats

canvi, el PMA té un efecte fortament potenciador en presència de l'agonista del receptor A_1 , però no es produeix la potenciació amb la preincubació de l'antagonista del receptor A_{2A} .

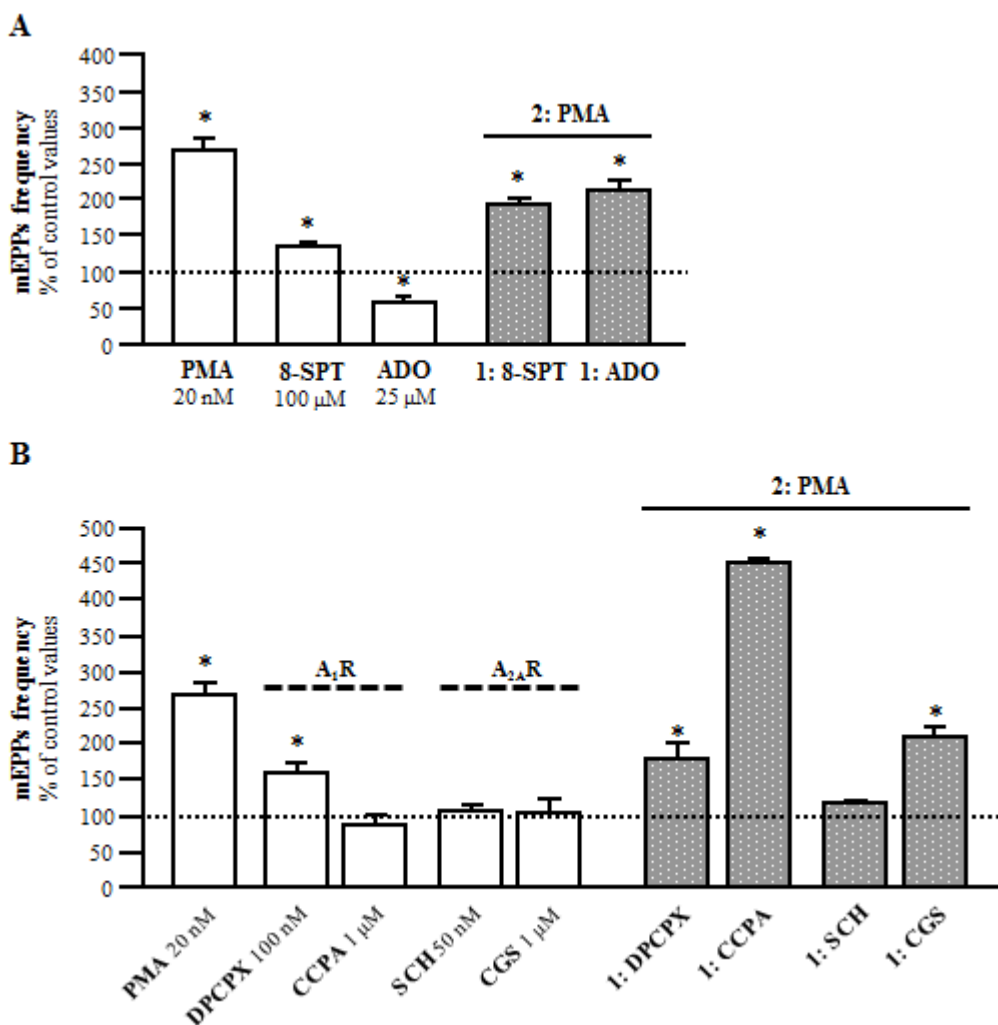


Figura R.33. Modulació dels receptors d'adenosina amb l'estimulació de la PKC en la neurotransmissió espontània. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent del PMA i dels moduladors purinèrgics dels receptors A_1 i A_{2A} en l'alliberació espontània. A continuació, es mostra l'efecte de l'activació de la PKC amb el PMA en presència dels moduladors no selectius (**A**) i selectius (**B**) dels receptors d'ADO (*columnes grises*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). El PMA augmenta l'alliberació espontània aproximadament un 200%. La gràfica mostra que el PMA induïx una potenciació d'alliberació, però menor que l'acció independent del PMA, si prèviament és modulat inespecíficament, si es bloqueja el receptor A_1 o bé si s'estimula el receptor A_{2A} . En concret, si el receptor A_1 és prèviament estimulat específicament, el PMA augmenta considerablement l'alliberació. Però pel contrari, una inhibició prèvia del receptor A_{2A} amb l'SCH-58261 evita l'acció potenciadora del PMA en la freqüència dels mEPPs. Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

9.3.2 Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió espontània

Després de veure la possible relació dels receptors d'ADO amb l'activació de la PKC s'estudiarà la situació contrària: l'efecte de la modulació receptors d'ADO amb la inhibició de l'activitat de la PKC. Per dur a terme aquests experiments, els receptors d'ADO s'han inhibit o estimulat i posteriorment, s'ha realitzat una segona incubació bloquejant l'activitat de la PKC amb la CaC (10 μ M). Com s'ha mencionat anteriorment, per a que la PKC es pugui acoblar a la neurotransmissió evocada i pugui ser inhibida per la CaC i al fer l'estimació del contingut quàntic (registre simultani dels EPPs i dels mEPPs), els experiments s'han de realitzar amb un estímul constant (d'1Hz) o bé a un increment de Ca^{+2} en la solució fisiològica (veure apartat 10.7 de *Materials i Mètodes* i 8.3.2 de *Resultats*). En experiments previs en el laboratori, es va veure que la CaC no modifica la freqüència dels mEPPs (% de variació: 15.10 ± 2.62 (a 1 Hz) i 14.91 ± 1.07 (en presència de Ca^{+2}), respectivament; $P < 0.05$, $n = 5$ músculs, mínim de 15 fibres per múscul; **Santafé i cols., 2005**). Com s'ha vist en els apartats previs, el bloqueig de tots els receptors d'ADO produeix un augment en l'alliberació espontània, mentre que l'activació inespecífica a concentracions micromolars té un efecte inhibitori (veure apartat 5.1.1 de *Resultats*).

9.3.2.1 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'un estímul continu (1 Hz) en la neurotransmissió espontània

En la primera tanda d'experiments, s'ha observat que la CaC (10 μ M) en presència del 8-SPT (100 μ M) amb un estímul continu d'1 Hz augmenta lleugerament l'alliberació espontània (% de variació: 30.53 ± 4.68 , **figura R.34, columna 4**). En canvi, en les mateixes condicions experimentals (1 Hz), la CaC (10 μ M) en presència de l'ADO (25 μ M) no modifica la freqüència dels mEPPs (% de variació: 12.72 ± 3.40 , **figura R.34, columna 5**). Per tant, la CaC (a 1 Hz) augmenta lleugerament l'alliberació quan els receptors d'ADO estan prèviament inhibits, mentre que quan s'estimulen aquests receptors la CaC no té efecte en l'alliberació espontània. El següent pas serà fer una replica d'aquests experiments però en condicions d'alt Ca^{+2} extern.

9.3.2.2 Modulació inespecífica dels receptors d'adenosina i la inhibició de la PKC en presència d'altas concentracions de calci extern en la neurotransmissió espontània

Atès que la PKC també es pot activar amb alt Ca^{+2} , s'ha considerat estudiar l'efecte del bloqueig de la PKC amb la CaC (10 μ M) en presència d'un antagonista inespecífic el 8-

Capítol IV. Resultats

SPT (100 μM) en presència d'altres concentracions de Ca^{+2} (5 mM) extern. El Ca^{+2} a altes concentracions (5 mM) després de 3 hores d'incubació augmenta l'alliberació espontània d'acetilcolina per si sol (% de variació: 41.07 ± 4.72). Si es bloqueja l'activitat de la PKC amb la CaC en presència de 8-SPT i alt Ca^{+2} (5 mM), s'observa un augment de l'alliberació espontània d'acetilcolina (% d'increment: 76.77 ± 20.14 , **figura R.34**, *columna 8*). Així mateix, s'ha estudiat la situació contrària. La CaC (10 μM) en presència d'ADO (25 μM) i a altes concentracions de Ca^{+2} (5 mM) produeix un augment de l'alliberació espontània (% d'increment: 110.92 ± 18.50 , **figura R.34**, *columna 9*). En aquest dos casos possiblement, a diferència de la situació d'1 Hz, potser que el Ca^{+2} preactivi a la PKC i faci augmentar l'alliberació espontània.

Es pot concloure que la CaC en presència del 8-SPT augmenta lleugerament l'alliberació espontània quan s'estimula a 1 Hz. En canvi en condicions d'alt Ca^{+2} , la CaC augmenta l'alliberació espontània en presència del 8-SPT o bé de l'ADO. Podria ser que l'efecte de potenciació que s'observa en condicions d'alt Ca^{+2} en presència dels moduladors no selectius dels receptors d'ADO, sigui donat per l'efecte prolongat del Ca^{+2} present en la solució fisiològica. Donat que aquest ió està present en la preparació des del pretractament (incubació d'1 hora conjuntament amb els moduladors purinèrgics, ja que són experiments de dobles incubacions) i en experiments controls es va veure que el Ca^{+2} (5mM) a les 3 hores augmentava la freqüència dels mEPPs. Possiblement, aquest augment de l'alliberació espontània que s'observa en condicions d'alt Ca^{+2} pot ser donat per una preactivació de la PKC amb el Ca^{+2} residual de la solució fisiològica. I a més aquests resultats poden suggerir que aquest Ca^{+2} (5 mM) que se li afageix a la solució fisiològica per tal d'acoblar a la PKC en la neurotransmissió evocada i pugui ser inhibida per la CaC pot ser una concentració superior a la concentració de Ca^{+2} que s'obté en condicions d'estimulació continua a 1 Hz. Això fa que els experiments en condicions d'alt Ca^{+2} tinguin un efecte més fort en l'alliberació espontània que en condicions d'estimulació a 1 Hz. Per un altre banda, la CaC en presència de Ca^{+2} i dels moduladors purinèrgics inespecífics té un efecte clarament potenciador. Possiblement, aquestes concentracions de Ca^{+2} són suficients per activar un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} que quan els PIRs són bloquejats o estimulats amb l'ADO i l'activitat de la PKC es troba inhibida, faci augmentar la freqüència dels mEPPs. Mecanisme que en condicions d'1 Hz no es dona perquè el Ca^{+2} que s'obté en aquestes condicions poden ser insuficients per transactivar aquest mecanisme paral·lel. Per tant, es pot concloure que hi ha una relació funcional entre els receptors d'ADO i la PKC.

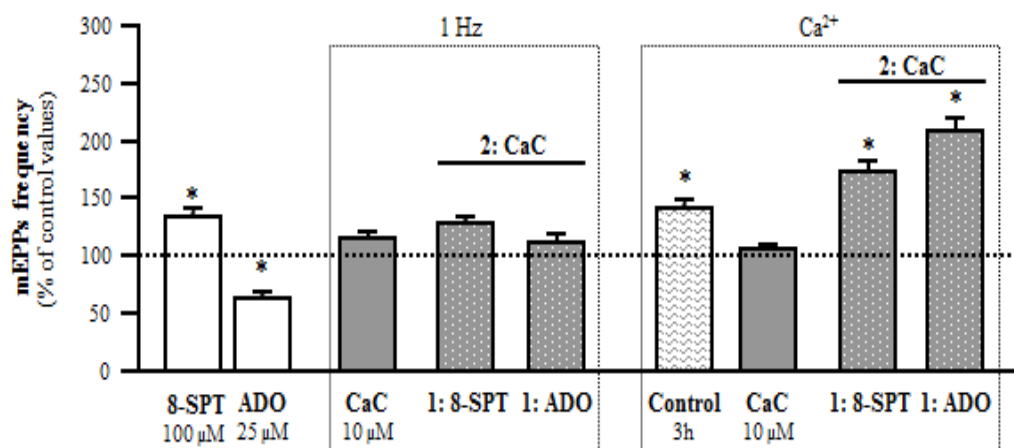


Figura R.34. Efecte dels receptors d'adenosina amb la inhibició de la PKC en la neurotransmissió espontània. A les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*), es mostra l'efecte independent dels moduladors purinèrgics no selectius en l'alliberació espontània. A continuació (*columnes grises*), es mostra l'efecte de paninhibidor CaC en presència del 8-SPT o bé l'ADO, en dues condicions experimentals diferents: amb el manteniment de l'activitat de la NMJ amb un estímul elèctric constant a 1 Hz (*box 1*) i amb un increment de la concentració de Ca^{+2} en la solució fisiològica (*box 2*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent, assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). En la gràfica, en la *box 1* s'observa que la CaC en presència de 8-SPT augmenta lleugerament l'alliberació espontània, mentre que no es modifica la freqüència en presència de l'ADO. En la *box 2* es mostra com el Ca^{+2} activant a la PKC pot augmentar l'alliberació espontània a les 3 hores d'incubació (*columna ondulada*), fet que podria influenciar en l'increment d'alliberació espontània de la CaC en presència dels moduladors no selectius dels receptors d'ADO, efecte que no s'observa tant fort en condicions d'1 Hz quan es bloqueja prèviament amb el 8-SPT. Per a cada columna: $n = 5$ experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, $*P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

9.4 Relació entre els receptors d'adenosina amb els canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió espontània

L'activitat sinàptica depèn del fluxe de Ca^{+2} a través dels VDCCs (Katz i Miledi, 1970). En el present estudi, s'ha proposat estudiar l'efecte dels receptors d'ADO amb els VDCCs. En experiments preliminars, el bloqueig dels canals P/Q amb l'agent ω -Aga IVA no modifica la freqüència (% de variació: 2 ± 0.16). En l'apartat 5.1.1 de *Resultats* es mostra que l'estimulació amb l'ADO exògena a concentracions micromolars té un efecte inhibitori en la freqüència dels mEPPs.

9.4.1 Efecte de l'adenosina exògena amb la inhibició dels VDCCs tipus P/Q en la neurotransmissió espontània

Degut als resultats obtinguts, s'ha estudiat si hi ha una dependència dels PIRs amb l'entrada del Ca^{+2} a través dels canals P/Q. S'han realitzat experiments on s'ha estimulat tots els receptors d'ADO amb l'ADO (25 μM) i a continuació s'ha bloquejat els canals P/Q amb l' ω -Aga IVA (100 nM). En aquest cas, no s'ha observat canvis en la freqüència dels mEPPs. En la situació inversa, l'ADO (25 μM) en presència de l' ω -Aga IVA (100 nM) tampoc produeix una modificació en la freqüència dels mEPPs (% de variació: 7.78 ± 4.17 i 13.62 ± 0.90 , respectivament; **figura R.35**, columnes 3 i 4). Per tant, es pot concloure que els receptors d'ADO i els VDCCs tipus P/Q tenen relació en la neurotransmissió espontània perquè l'ADO no pot disminuir la freqüència dels mEPPs en presència del bloquejador del canal tipus P/Q.

9.4.2 Efecte de l'adenosina exògena en presència d'altres concentracions de magnesi en la neurotransmissió espontània

Segons els resultats obtinguts, s'ha proposat estudiar l'estimulació inespecífica dels receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània en condicions de baix Ca^{+2} , reduint l'entrada de Ca^{+2} preincubant la preparació amb Mg^{+2} a dues concentracions diferents (0.5 i 1 mM). L'ADO (25 μM) en presència del Mg^{+2} (0.5 mM) no produeix canvis en la freqüència dels mEPPs. Però en canvi, a una concentració d'1 mM de Mg^{+2} s'observa un augment en la freqüència de mEPPs (% de variació: 11.26 ± 4.15 i 105.06 ± 35.27 , respectivament; **figura R.35**, columnes 5 i 6). Per tant, en una situació de baixa neurotransmissió o baix Ca^{+2} , els receptors d'ADO depenen de la entrada de Ca^{+2} pel seu efecte inhibitori, donat que a una concentració de Mg^{+2} de 0.5 mM no es modifica la freqüència de mEPPs i a 1 mM sorprenentment augmenta l'alliberació espontània quan l'efecte de l'ADO és inhibitori en concentracions normals de Ca^{+2} .

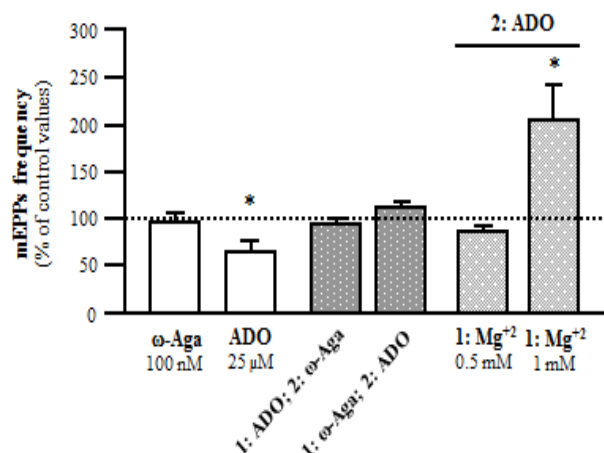


Figura R.35. Efecte de l'adenosina amb la inhibició dels canals de calci dependents de voltatge (VDCCs) i en condicions de baixa entrada de calci en la neurotransmissió espontània. Les primeres barres de l'histograma (a l'esquerra; *columnes blanques*) es mostra l'efecte independent en condicions basals de l'inhibidor del canal P/Q (ω -Aga IVA) i de l'ADO. A continuació, es mostra l'efecte l'ADO amb la inhibició dels canals P/Q (*columnes grises*) i l'efecte de l'ADO en presència del Mg⁺² (0.5 i 1 mM; condicions de baix Ca⁺²; *columnes negres*). L'ordre d'incubació dels moduladors es mostra en cada columna corresponent (a sota), assenyalat amb el número 1 i 2 (1: preincubació; 2: incubació). El gràfic indica que el bloqueig previ dels canals P/Q evita l'acció inhibitoria de l'ADO i la dependència dels receptors d'ADO amb l'entrada de Ca⁺². Donat que l'ADO en presència d'altres concentracions de Mg⁺² s'evita l'efecte inhibitori i es converteix en facilitatori. Per a cada columna: n = 5 experiments i un mínim de 15 fibres per múscul. Els valors s'expressen com mitjana \pm SEM, * $P > 0.05$, respecte als valors inicials (línia puntejada).

En resum, hi ha una dependència entre els receptors d'ADO amb els VDCCs i amb l'entrada de Ca⁺², donat que sorprenentment si s'estimulen tots els receptors d'ADO en presència de l' ω -Aga IVA no s'observa canvis en la freqüència dels mEPSPs, cosa que l'ADO per ella sola té un efecte inhibitori. En la situació inversa, tampoc s'observa un canvi en l'alliberació espontània, on sembla ser que aquesta dependència sigui unidireccional. A més, els receptors d'ADO que tenen una funció conservativa limitant l'alliberació espontània depenen de l'entrada de Ca⁺². L'ADO no pot disminuir l'alliberació en presència de Mg⁺² (condicions de baixa entrada de Ca⁺²). A altes concentracions de Mg⁺² augmenta l'alliberació tenint una acció potenciadora quan l'efecte de l'ADO com anteriorment s'ha descrit és inhibitori. Aquests resultats confirmen la premissa dels resultats obtinguts en l'apartat 9.3.2.2 dels *Resultats*, on s'ha evidenciat una relació funcional entre els PIRs i la PKC. Ja que, podria ser que en condicions d'alt Ca⁺² pot haver un mecanisme paral·lel dependent del Ca⁺² que interaccioni amb els PIRs quan són estimulats amb l'ADO i l'activitat de la PKC es troba inhibida, i faci augmentar la freqüència dels mEPSPs. Probablement, com s'ha evidenciat en els experiments dels VDCCs un d'aquests mecanismes possiblement podria ser els canals P/Q,

donat que el bloqueig previ amb l' ω -Aga evita l'efecte inhibitori de l'ADO i inclús quan es redueix fortament l'entrada de Ca^{+2} amb altes concentracions de Mg^{+2} aquest efecte es torna facilitatori.

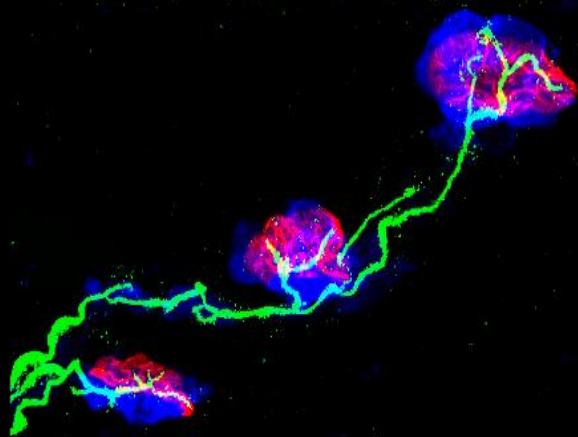
Els resultats d'electrofisiologia exposats mostren que els receptors d'ADO no es troben acoblats en la neurotransmissió evocada quan la fisiologia de la sinapsi es troba plenament operativa i intacte. Pel contrari, quan es canvia directament la fisiologia de la sinapsi (bloquejant la contracció amb alt Mg^{+2} o *d-tubocurarine*), l'ADO redueix el contingut quàntic com prèviament s'havia descrit per alguns autors (**Ginsborg i Hirst, 1972; Ribeiro i Walker, 1975; Pousinha i cols., 2010**). Així mateix, s'ha analitzat l'efecte prolongat de l'anàleg de l'ADO, la CADO (10 μ M i 300 nM) en l'alliberació evocada. I s'ha vist que a concentracions micromolars té un efecte inhibitori degut a un treball col·laboratiu dels receptors A_1 i A_{2A} . En canvi, la CADO a concentracions nanomolars en condicions basals i en presència dels bloquejadors purinèrgics no té efecte en l'alliberació evocada, suggerint que aquesta concentració es insuficient per activar aquesta via. A diferència de l'alliberació evocada, s'ha evidenciat que els PIRs es troben implicats en l'alliberació espontània tenint una funció conservativa limitant l'alliberació espontània. S'ha observat que el bloqueig i l'estimulació inespecífica augmenta i disminueix la freqüència dels mEPPs, respectivament. Sembla ser que l'únic receptor que es troba implicat en la disminució de la neurotransmissió espontània és el receptor A_1 . A més, mitjançant els experiments amb l'enzim ADA s'ha confirmat que l'ADO endògena no té efecte en la modulació de l'alliberació evocada, però en canvi té un efecte inhibitori en l'alliberació espontània. L'efecte prolongat de l'anàleg de l'ADO, CADO (300 nM), augmenta la freqüència dels mEPPs degut a que els dos receptors (A_1 i A_{2A}) necessiten treballar conjuntament per tenir aquest efecte en l'alliberació espontània. Però pel contrari, a altes concentracions (10 μ M) el sistema pot arribar a un equilibri entre els receptors A_1 i A_{2A} fent que no es modifiqui aquest alliberació d'acetilcolina espontània. En el cas dels experiments d'activitat sinàptica, s'ha evidenciat que els receptors d'ADO es troben implicats en el control de la depressió durant una activitat repetitiva i esgotadora. S'ha vist que és necessari un treball col·laboratiu entre els receptors d'ADO per reduir la depressió sinàptica a 40 Hz. Per una altre banda, forçant el sistema amb l'efecte prolongat de la CADO, s'ha observat que la CADO (10 μ M) té un efecte protector de la depressió però menor que l'efecte de l'ADO exògena, degut a que la CADO s'uneix de forma irreversible al receptor d'ADO amb la conseqüent activació de la via de les ubiquitinases. A més, aquest efecte protector és

depenent dels receptors d'ADO on el receptor A_{2A} té una paper modulador negatiu sobre el receptor A_1 en aquestes condicions. La CADO a concentracions nanomolars s'ha vist que és una concentració insuficient per activar aquesta via. Per una altre banda, en els experiments d'altres freqüències d'activació (100 Hz), l'ADO endògena produïda en la fenèdura durant els trens en aquestes condicions en aquest cas és suficient per tenir un efecte protector activant el receptor A_1 , ja que el bloqueig del receptor A_{2A} redueix considerablement la depressió.

Com s'ha mencionat durant aquesta tesi els receptors d'ADO són pleioentròpics i la seva activació pot influir en l'acció d'altres neurotransmissors i neuromoduladors indirectament, comportant-se com un modulador de moduladors ja que el funcionament de molts sistemes neuromoduladors presinàptics estan sota el control concís dels receptors d'ADO (Queiroz i cols., 2003; Cunha, 2005). Per aquest motiu s'ha realitzat l'estudi de la relació funcional entre els receptors d'ADO amb altres vies de senyalització (mAChRs, PKA, PKC i VDCCs) que controlen la neurotransmissió. S'ha observat que els receptors d'ADO i els mAChRs (M_1 i M_2) depenen un de l'altre, és a dir, hi ha una interrelació entre aquests dos grups de receptors en la modulació de la neurotransmissió evocada i espontània en condicions basals i en experiments realitzats amb la CADO. A més, el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió sinàptica compartint una via en comú, tot i que el mecanisme purinèrgic sembla ser més fort. També s'ha trobat una relació funcional entre els P1Rs i les serina/treonina quinases (PKA i PKC). Possiblement, l'acoblament de la PKA en l'alliberació evocada necessita la participació dels receptors d'ADO, tot i que la PKA no pot ser addicionalment estimulada en presència dels moduladors de purinèrgics. Pel contrari, en l'alliberació espontània no s'ha observat aquesta relació perquè l'estat (inhibit o estimulat) dels receptors d'ADO no afecta a l'acoblament de la PKA en la neurotransmissió espontània. En el cas de la PKC, s'ha evidenciat que un desequilibri dels receptors d'ADO donat per l'ús de moduladors no selectius i específics desacobla la PKC de la neurotransmissió evocada. Així mateix, s'ha vist una dependència de la PKC en l'alliberació espontània donat que el PMA pot potenciar considerablement la freqüència dels mEPPs en presència del l'agonista del receptor A_1 , però no es produeix aquesta potenciació amb la preincubació de l'antagonista del receptor A_{2A} . Per un altre banda, s'ha evidenciat que la CaC en presència dels moduladors purinèrgics i del Ca^{+2} , potencia l'alliberació espontània però més que en condicions d'1 Hz, suggerint que a aquestes concentracions de Ca^{+2} són suficients per activar un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} que interaccioni als P1Rs quan són bloquejats o bé estimulats amb l'ADO i l'activitat PKC es trobi inhibida i faci augmentar la freqüència dels mEPPs. Per últim, s'ha trobat una

Capítol IV. Resultats

relació funcional entre els PIRs i els VDCCs en l'alliberació evocada i espontània, ja que s'ha observat que el bloqueig previ dels canals P/Q i la posterior estimulació dels receptor d'ADO potencia l'alliberació evocada. Inclús en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} (increment de Mg^{+2} en la solució fisiològica), l'ADO evita l'efecte inhibitori del Mg^{+2} . Pel que fa a l'alliberació espontània, s'ha vist que els PIRs depenen dels VDCCs i de l'entrada del Ca^{+2} . Com s'ha comentat anteriorment, els PIRs tenen una funció conservativa limitant l'alliberació espontània, però aquesta funció possiblement és dependent del Ca^{+2} perquè l'ADO perd la seva capacitat inhibitoria quan és bloqueja l'entrada de Ca^{+2} a través del canals P/Q i inclús potencia l'alliberació en presència d'altres concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica. Aquest fet confirma i està en concordança amb la premissa comentada anteriorment, que menciona que en condicions d'alt Ca^{+2} (una condició necessària per a que la PKC s'acobli a la neurotransmissió evocada i pugui ser inhibida per la CaC). En aquestes condicions experimentals, en l'alliberació espontània pot haver un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} que interaccioni en aquestes condicions quan els PIRs són bloquejats o bé quan són estimulats per l'ADO i la PKC és troba inhibida, i faci augmentar la freqüència dels mEPPs. Ja que s'ha vist que en condicions d'altres concentracions de Mg^{+2} (situació de baixa entrada de Ca^{+2} pel terminal nerviós) l'efecte de l'ADO es reverteix i es torna facilitatori, confirmant aquesta dependència dels PIRs amb el Ca^{+2} .



Capítol V.

Discussió

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

En els contactes neuronals, l'alliberament de neurotransmissors està bàsicament controlat per la confluència funcional de diversos receptors metabotròpics que intercedeixen en vies de senyalització, a través d'un mecanisme que depèn de l'activitat. En la NMJ, els autoreceptors presinàptics muscarínics (**Santafé i cols., 2003, 2004**) i nicotínics (**Salgado i cols., 2000**) estan directament acoblats a la secreció d'acetilcolina a través de la regulació del propi mecanisme d'alliberació. Els receptors presinàptics de les neurotrofines i els receptors presinàptics de les citoquines (**Bibel i Barde, 2000; Roux i Barker, 2002; Pitts i cols., 2006**) poden respondre a dianes derivades de mediadors i cooperar en el control de la neurotransmissió. De fet, l'activitat del terminal nerviós i l'activitat muscular contribueixen a l'augment de l'ADO extracel·lular en la NMJ (**Cunha i Sebastião, 1993; Ribeiro i cols., 1996**) la qual, sembla modular l'alliberació presinàptica d'acetilcolina a través dels receptors purinèrgics (**Correia-de-Sá i cols., 1991; Salgado i cols., 2000**).

En el present estudi, es descriu mitjançant tècniques d'electrofisiologia per registre intracel·lular com els receptors d'ADO participen i interaccionen amb altres vies de senyalització implicades en el control de la neurotransmissió. Addicionalment, donat que la localització i l'expressió exacte a nivell cel·lular i la possible coexistència dels diferents subtipus de PIRs en els components presinàptics, postsinàptics i en la cèl·lula glial no estan plenament estudiats, en aquest treball, s'ha utilitzat la tècnica de la immunohistoquímica per estudiar aquesta localització precisa d'aquest receptors en les diferents cèl·lules que conformen la NMJ. El seu coneixement és essencial per entendre com operen en la sinapsi neuromuscular. Així, en aquesta tesi, s'ha contribuït a estudiar l'expressió i la localització dels receptors d'ADO i descriure el seu paper en la regulació de la neurotransmissió en la NMJ adulta.

1. EXPRESSIÓ I LOCALITZACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA A₁, A₂, A_{2B} i A₃ EN LA SINAPSI NEUROMUSCULAR

En estudis anteriors, hi ha diversos grups d'investigadors que han estudiat l'expressió i la localització dels receptors d'ADO en diferents teixits i òrgans utilitzant diverses tècniques en biologia molecular i estudis farmacològics. Però, fins el moment, hi ha pocs treballs publicats que hagin analitzat l'expressió i la localització dels receptors d'ADO d'una manera precisa a nivell cel·lular en el sistema neuromuscular. Per aquest motiu, una de les finalitats d'aquest treball ha estat estudiar l'expressió i la localització dels receptors d'ADO en el sistema neuromuscular.

Experimentalment, mitjançant la tècnica del Western blot i la immunohistoquímica s'ha estudiat l'especificitat dels anticossos utilitzats, la presència i la localització cel·lular dels receptors d'ADO en músculs LALs neonatals (P6-P7) i adults (P30-45) (veure amb més detall el procediment en els apartats 5-9 a *Materials i Mètodes*). En els dos casos s'han realitzat controls negatius per tots els receptors P1 i en cap cas, s'han observat reaccions inespecífiques (veure l'apartat 5.2.7 pel Western blot i l'apartat 8 per la immunohistoquímica a *Materials i Mètodes* i les **figures R.1-3** dels Westerns blots a l'apartat de *Resultats*). Per tant, els resultats obtinguts amb la tècnica de detecció de proteïnes (Western blot) i la de localització (immunohistoquímica convencional i de talls transversal semifins) poden ser considerats vàlids i reproduïbles.

1.1 Expressió dels receptors d'adenosina A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃

En els resultats obtinguts mitjançant el Western blot, en mostres de lisat de múscul esquelètic LAL d'adult i de nadó, en cervell i en medul·la adulta s'ha observat una única banda per cada un dels receptors d'ADO. Els pesos moleculars obtinguts han coincidit amb els pesos moleculars pronosticats. En cap cas han aparegut bandes inespecífiques.

Experimentalment, s'ha observat que els receptors A₁, A_{2B} i A₃ s'expressen més en múscul esquelètic adult que en el nadó, en canvi el receptor A_{2A} s'expressa més en el nadó que en el múscul LAL adult (veure **figures R.1-3** de l'apartat de *Resultats*). Aquesta observació suggereix, que el receptor A_{2A} possiblement pot tenir un paper en la sinapsi postnatal durant el procés de l'eliminació sinàptica, i els receptors A₁, A_{2B} i A₃ en l'establiment de la sinapsi en la maduresa. En l'adult, el receptor A_{2A} s'expressa més en la medul·la espinal adulta que en el múscul. Per un altre banda, el receptor A_{2B} és més abundant en el cervell i la medul·la espinal madura que en el múscul, mentre que el receptor A₃ és més abundant en el múscul, que en el cervell i la medul·la espinal adulta.

L'expressió dels receptors P1 en el múscul no es coneix en molt de detall. En la literatura, no hi ha estudis previs que determinin de forma concreta el pes molecular dels receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) en el múscul estriat esquelètic. No obstant, alguns treballs anteriors han mostrat diferències de pesos moleculars en diferents espècies i teixits quan s'utilitzen diferents anticossos. Per tant, en alguns casos, s'ha cregut oportú utilitzar i comparar dos anticossos diferents de dues cases comercials. En la literatura, hi ha alguns estudis que han demostrat canvis d'expressió dels receptors d'ADO amb l'edat en animals (**Jenner i cols., 2004; Cunha, 2005**) i també en humans (**Meyer i cols., 2007**). S'han identificat diferències d'expressió dels receptors depenent dels teixits i dels òrgans analitzats. En estudis de biologia molecular, d'autoradiografia quantitativa i de radiolligands s'ha observat una disminució de l'expressió i la densitat del receptor A_1 en regions del cervell del còrtex, el cerebel i l'hipocamp i en el teixit testicular, mentre que la densitat i l'expressió del receptor A_{2A} augmenta amb l'edat en aquestes àrees del cervell (**Cheng i cols., 2000; Cunha, 2005; Canas i cols., 2009**).

Experimentalment, pel receptor d'ADO A_1 s'ha detectat una única banda a 35 kDa en les quatre mostres de lisat (**figura R.1A** apartat de *Resultats*) utilitzant l'anticòs d'*Alomone* (AAR-006). Aquest pes molecular és molt proper al pes molecular nominal descrit de 36.5 kDa (**Lorenzen i Schwabe, 2001; Yu i cols., 2006**). En un treball publicat utilitzant el mateix anticòs d'*Alomone* (AAR-006) han observat una banda a 40 kDa en lisats de cultius cel·lulars de retina de rata (**Vindeirinho i cols., 2013**). En altres estudis realitzats prèviament, amb anticossos diferents als utilitzats en aquest treball, s'ha detectat el receptor aproximadament a 35-36 kDa en cultius primaris i teixit de múscul esquelètic humà i de rata (**Lynge i Hellsten, 2000; Lynge i cols., 2003**). A més a més, s'ha observat la presència d'aquest receptor a 38-39 kDa en diferents teixits i òrgans, com el teixit vascular, el ronyó i el fetge, amb anticossos diferents als utilitzats (**Zou i cols., 1999; Jackson i cols., 2002; Grden i cols., 2007**). En el sistema nerviós central, utilitzant anticossos diferents, s'ha observat una banda aproximadament a 36-37 kDa en els nervis terminals de neurones hipocàmpals de rata (**Rebola i cols., 2003; Canas i cols., 2009**). Aquests investigadors han separat i estudiat les fraccions presinàptiques, postsinàptiques i extrasinàptiques dels nervis terminals de l'hipocamp de rata. Mitjançant la tècnica del Western blot han observat immunoreactivitat en les zones actives dels terminals nerviosos, en la zona extrasinàptica i en les densitats postsinàptiques. Això, fa pensar que el receptor A_1 possiblement té un paper en la inhibició de l'alliberació de glutamat, en el control del metabolisme (**Håberg i cols., 2000**), en el control del creixement axonal i la maduració del nervi terminal (**Rivkees i cols.,**

2001). A més, mitjançant la tècnica d'immunoprecipitació conjuntament amb el Western blot, utilitzant diferents anticossos, s'ha obtingut un pes molecular similar de 39 kDa en diverses regions cerebrals com l'hipocamp, el cerebel i el còrtex de rata (**Cheng i cols., 2000; Namba i cols., 2010**).

En el cas del receptor d'ADO A_{2A} s'ha detectat una banda de 43 kDa en les quatre mostres de lisat (**figura R.1A** de l'apartat de *Resultats*) utilitzant l'anticòs de *Millipore (05-717)*. El molecular nominal descrit per aquest receptor és de 44.7 kDa (**Lorenzen i Schwabe, 2001; Yu i cols., 2006**), pes molecular molt proper al que s'ha detectat experimentalment. Utilitzant el mateix anticòs s'ha trobat una banda amb un pes similar (45 kDa) en la regió del caudat i el *putamen* d'humà i de primat (**Bogenpohl i cols., 2012; Villar-Menéndez i cols., 2014**). A més, s'ha observat una segona banda a 55 kDa en lisats cel·lulars d'HEK-293T, s'ha suggerit que possiblement sigui la forma glucosilada del receptor (**Rosin i cols., 1998; Bogenpohl i cols., 2012**). En estudis realitzats per altres investigadors que estudien l'expressió del receptor A_{2A} en el sistema muscular, s'ha observat una banda a 45 kDa en cultius primaris i teixit de múscul esquelètic humà i de rata, utilitzant un anticòs diferent (**Lynge i Hellsten, 2000; Lynge i cols., 2003**). Així mateix, s'ha trobat el mateix pes molecular (45 kDa) en teixits vasculars, cardiovasculars, de ronyó i de fetge porcins, humans i de rata, usant anticossos diferents al d'aquest treball (**Marala i Mustafa, 1998; Jackson i cols., 2002; Grden i cols., 2007**). En quan el sistema nerviós central mitjançant la tècnica del Western blot utilitzant anticossos diferents, el receptor A_{2A} s'ha detectat a 42-45 kDa en diverses regions: en l'estriat boví i de rosegador (**Barrington i cols., 1990; Marala i Mustafa, 1998; Lopes i cols., 2004; Ferreira i cols., 2015**), en els nervis terminals hipocampals de rosegadors (**Rebola i cols., 2002; Lopes i cols., 2004; Canas i cols., 2009**), en el còrtex de ratolí (**Lopes i cols., 2004**) i en la medul·la espinal de rata (**Brooke i cols., 2004**).

Com s'ha mencionat anteriorment, en els apartats de *Materials i Mètodes* i en els *Resultats*, pels receptors d'ADO A_{2B} i A_3 s'han utilitzat dos anticossos de dues cases comercials diferents (*Millipore* i *Santa Cruz*) amb resultats comparables. Hi ha pocs estudis previs que hagin determinat el pes molecular d'aquests receptors en el múscul esquelètic estriat, encara que s'han citat diferents pesos moleculars en diferents espècies i teixits. Així doncs, degut a l'ampli rang de pesos moleculars d'aquests receptors en diferents espècies i teixits, s'ha cregut oportú especificar aquesta informació en aquest apartat.

Pel receptor d'ADO A_{2B} s'ha determinat un rang de pesos moleculars de 34-52 kDa en diferents espècies (Lynge i Hellsten, 2000). No obstant, el pes molecular nominal descrit pel receptor A_{2B} és de 36.3 kDa (Lorenzen i Schwabe, 2001; Yu i cols., 2006). Aquest pes és molt similar als receptors A_1 i A_3 , mentre que el receptor A_{2A} té un pes molecular predit més alt (aproximadament de 45 kDa) degut a la presència d'una porció de l'extrem C-terminal més llarga (d'uns 122 aminoàcids) amb respecte als altres receptors d'ADO (Feoktistov i Biaggioni, 1997).

Experimentalment, l'anticòs del receptor A_{2B} de Santa Cruz (*sc-7506*) s'ha obtingut una banda a 47 kDa en el múscul d'animal adult i nadó, i una banda a 45 kDa en el cervell i la medul·la espinal adulta (figura R.2A de l'apartat de *Resultats*). Analitzant la bibliografia publicada, altres investigadors utilitzant el mateix anticòs han trobat resultats similars. En concret, s'ha detectat una banda a 40 kDa en cardiomiòcits aïllats de rata (Grube i cols., 2011) i una banda a 45 kDa en una línia de cultiu cel·lular que secreta el receptor de la hormona de creixement *secretagogue* tipus-1a (GHS-R1a de l'anglès *growth hormone secretagogue receptor*) (Carreira i cols., 2006). Així mateix, utilitzant l'anticòs de Millipore (*AB1589P*), en el present treball s'ha detectat una única banda a 52 kDa en el múscul esquelètic LAL d'animal adult i nadó, i una altre banda a 51 kDa en el cervell i la medul·la adulta (figura R.2A de l'apartat de *Resultats*). En altres estudis previs realitzats amb l'anticòs de Millipore (*AB1589P*), s'ha observat una banda de proteïna aproximadament a 52 kDa en cèl·lules musculars llises arterials humanes (Peyot i cols., 2000). Per un altre banda, a diferència d'aquest treball amb el mateix anticòs, s'ha trobat una única banda a 28 kDa en múscul esquelètic humà (Lynge i Hellsten, 2000). S'ha suggerit que aquesta banda pot correspondre a una part de la molècula del receptor. Posteriorment, el mateix grup d'investigadors han observat una banda a 36 kDa en cultius primaris de cèl·lules i de teixit de múscul esquelètic madur de rata (Lynge i cols., 2003). Possiblement, aquesta disparitat de pesos moleculars en el teixit muscular potser deguda a la diferència d'expressió del receptor en diferents espècies. A més a més, utilitzant el mateix anticòs s'ha detectat aquest receptor a 50-52 kDa en altres teixits i òrgans, com el teixit vascular i el ronyó de rata (Zou i cols., 1999; Jackson i cols., 2002). No obstant, alguns autors usant aquest anticòs han identificat dues bandes una a 47 kDa i un altre a 32 kDa en el fetge de rata, representant dos formes diferents de glucosilació del receptor A_{2B} (Grden i cols., 2007). En el sistema nerviós central aquest receptor és poc abundant (Cunha, 2005). No obstant, s'ha detectat una banda a 50 kDa en el cervell boví utilitzant l'anticòs de Millipore (*AB1589P*) (Tan-Allen i cols., 2005). Finalment, en estudis realitzats amb

anticossos diferents als usats en aquesta tesi s'han observat bandes de diferents mides en diferents òrgans i teixits: 35 kDa en el intestí prim i a 50-52 kDa en el timus, colon i placenta (**Puffinbarger i cols., 1995**).

Degut a que no hi ha estudis previs que s'hagin realitzat per determinar l'especificitat de la forma molecular del receptor A_3 en el múscul esquelètic estriat, com en el cas del receptor A_{2B} , s'han utilitzat dos anticossos policlonals de conill de dues cases comercials diferents (*Millipore* i *Santa Cruz*) amb resultats comparables.

Els resultats obtinguts pel receptor d'ADO A_3 en el Western blot utilitzant l'anticòs de *Santa Cruz* (*sc-13938*) en el múscul LAL (d'adult i de nadó), en el cervell i la medul·la adulta, en tots els casos, s'ha obtingut una banda única de 44 kDa (**figura R.3A** de l'apartat de *Resultats*). El pes molecular nominal descrit per aquest receptor és de 36.2 kDa (**Lorenzen i Schwabe, 2001; Yu i cols., 2006**). No obstant, aquest anticòs pot detectar tres bandes diferents a 44, 52 i 66 kDa (full tècnic de la casa comercial de *Santa Cruz*). Usant el mateix anticòs, en cultius cel·lulars que expressen GHS-R1a s'ha detectat una banda proteica a 52 kDa (**Carreira i cols., 2006**). Així mateix, en els estudis de Western blot realitzats amb l'anticòs de *Millipore* (*AB1590P*) s'ha identificat una mateixa banda única a 44 kDa per les quatre mostres de lisat, com en cas de l'anticòs de *Santa Cruz* (*sc-13938*) (**figura R.3A** de l'apartat de *Resultats*). En estudis fets amb aquest mateix anticòs s'ha trobat una banda a 52 kDa en teixits vasculars i en ronyó de rata, s'ha suggerit que possiblement podria ser la forma glucosilada del receptor (**Zou i cols., 1999; Jackson i cols., 2002**). Així mateix, en el cas de l'uroepiteli de rata s'ha detectat una banda a 52 kDa com s'ha descrit en el ronyó (**Jackson i cols., 2002**), i un altre banda a 36.3 kDa corresponent al pes molecular nominal (**Yu i cols., 2006**). Per un altre banda, utilitzant anticossos diferents a aquesta tesi, s'ha observat una banda a 38 kDa en el fetge de rata (**Grden i cols., 2007**) i tres bandes: a 44 kDa, 52 kDa i a 64 kDa en cèl·lules de glioblastoma humanes, en cèl·lules del jejú, en el testicle, en cèl·lules enterocromafines i en el colon (**Christofi i cols., 2001**).

En el cas del sistema nerviós central, el receptor A_3 és poc abundant, inclús hi ha certs estudis que han donat resultats negatius en la detecció de l'expressió del receptor i la seva funció és encara controvertida (**Costenla i cols., 2001; Cunha, 2005**). No obstant, amb el mateix anticòs de *Millipore* (*AB1590P*), s'ha identificat una banda a 44 kDa en la membrana dels nervis terminals de l'hipocamp de rata (**Lopes i cols., 2003**). Com s'ha pogut observar es troben diferències entre el pes molecular detectat experimentalment i el pes molecular nominal, alguns autors proposen que aquesta diferència és deguda a la forma glucosilada del receptor (**Rosin i cols., 1998; Jackson i cols., 2002**).

En conclusió, els resultats obtinguts dels Westerns blots estan en concordança amb el que prèviament s'ha publicat. A més a més, els nostres resultats indiquen que aquests receptors es troben presents en el múscul esquelètic i s'expressen de manera diferent depenent del teixit, ja que la distribució dels receptors purinèrgics és bastant irregular i diferent entre espècies, i principalment entre teixits (**Fredholm i cols., 2011**). Les diferències en el desenvolupament i l'especificitat en el teixit pot estar relacionat amb la neurotransmissió i nosaltres hem analitzat la presència dels receptors en la NMJ. No obstant, es pot posar de manifest que els nivells totals dels receptors d'ADO en el teixit sencer pot no ser una mesura precisa dels receptors presinàptics i postsinàptics, ja que grans quantitats són presents en altres tipus de cèl·lules i vasos sanguinis, les quals poden interferir en la senyal neuronal fent comparacions menys vàlides.

1.2 Localització dels receptors d'adenosina en la sinapsi neuromuscular

Els receptors d'ADO són presents en varies espècies i en diferents teixits. La seva distribució és bastant irregular i diferent entre espècies i teixits (**Fredholm i cols., 2011**). No obstant, no es coneix amb molta certesa la localització exacte dels receptors d'ADO en la NMJ, donat que analitzant treballs publicats que estudien la localització en el sistema neuromuscular, hi ha poques publicacions que localitzin els receptors d'ADO a nivell dels components cel·lulars de la NMJ. Així, un dels objectius d'aquesta tesi ha sigut estudiar la localització cel·lular dels receptors d'ADO en la NMJ. Per dur a terme aquest objectiu, s'ha utilitzat la immunohistoquímica convencional, d'alta resolució i l'obtenció de seccions òptiques, que ha permès determinar uns patrons de localització bastant precisos i ha ajudat a discernir la localització dels receptors d'ADO en els tres components que formen la NMJ (component presinàptic, component postsinàptic i la CS).

Els resultats obtinguts en les immunohistoquímiques en el present treball, mostren la localització simultània de cada un dels receptors d'ADO conjuntament amb els diferents marcadors de les diferents àrees sinàptiques: el component nerviós, la cèl·lula muscular i la cèl·lula glial de la NMJ. Concretament en aquest treball, s'ha realitzat la localització dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} en la NMJ neonatal i adulta, i els receptors A_{2B} i A_3 en la NMJ adulta.

1.2.1 Localització del receptor d'adenosina A_1

Per determinar la localització del receptor d'ADO A_1 s'han utilitzat els anticossos d'*Alomone* (AAR-006) i de *Millipore* (AB1587P), ambdós han donat una marca forta,

específica i detecten la mateixa localització en la NMJ. Experimentalment, segons els resultats obtinguts, el receptor d'ADO A_1 s'ha detectat en el component presinàptic i la CS en la NMJ neonatal i adulta. No s'ha observat la presència d'aquest receptor en el component postsinàptic (**figures R.4 i R.5** de l'apartat de *Resultats*). En estudis d'immunohistoquímica realitzats en teixit muscular esquelètic d'humà, utilitzant anticossos diferents als d'aquest treball, no s'ha trobat la presència del receptor A_1 en el sarcolemma i el citosol (**Lyngé i Hellsten, 2000**). Però l'han observat en cèl·lules musculars lliures, així com en cèl·lules endotelials humanes (**Lyngé i Hellsten, 2000**).

Analitzant treballs publicats, el receptor A_1 s'ha trobat distribuït en diferents teixits i òrgans. En estudis d'immunolocalització per microscòpia confocal amb el mateix anticòs de *Millipore (AB1587P)*, s'ha detectat en el cos cel·lular de neurones del gangli mientèric de l'ili de rata, s'ha suggerit un paper inhibitori en l'alliberació d'acetilcolina (**Vieira i cols., 2011**). En estudis de fluorescència amb anticossos diferents, el receptor A_1 s'ha detectat en l'uroepiteli de rata i en cèl·lules del tracte intestinal (**Christofi i cols., 2001; Yu i cols., 2006**). Mitjançant l'anàlisi de RT-PCR i de Northern blot, el receptor es troba àmpliament distribuït per tot el cos: en el cor, l'aorta, la melsa, el ronyó, el fetge, els testicles, els ulls i la vesícula biliar. A baixos nivells d'amplificació s'ha detectat en el pulmó, l'úter i l'estomac en humà i en rata (**Salvatore i cols., 1993; Dixon i cols., 1996**).

En el sistema nerviós central mitjançant immunohistoquímica utilitzant el mateix anticòs de *Millipore (AB1587P)*, el receptor A_1 s'ha localitzat en neurones de la regió lateral de l'hipotàlem, on es pensa que el receptor pot tenir un paper en la regulació de la son (**Thakkar i cols., 2002**) i en l'àrea CA1 de l'hipocamp on s'ha descrit un paper protector en el preconditionament isquèmic (CIP de l'anglès *cerebral ischemic preconditioning*) en rates (**Zhou i cols., 2004**). En un altre treball publicat utilitzant un anticòs diferent, s'ha detectat el receptor A_1 en les cèl·lules piramidals del còrtex cerebral i de la formació de l'hipocamp, en el cos cel·lular i les dendrites de les cèl·lules de Purkinje del cerebel i en l'arrel dorsal de la medul·la espinal en humà (**Schindler i cols., 2001**). Així mateix, el receptor A_1 s'ha trobat en cultius corticals i colocalitzat amb el receptor A_{2A} en nervis terminals glutamatèrgics hipocampals de rata. Es pensa que aquests receptors participen en la modulació de l'alliberació de glutamat (**Rebola i cols., 2005a,b; Rodrigues i cols., 2008**). A més a més, alguns autors han localitzat el receptor en els oligodendròcits (OLG de l'anglès *oligodendrocytes*) i en les cèl·lules precursors d'oligodendròcits (OPC de l'anglès *oligodendrocyte precursor cells*) en diferents etapes del desenvolupament. Aquest autors han suggerit que l'activació del receptor A_1 pot estimular la migració d'OPC en rates

(Othman i cols., 2003). En estudis de RT-PCR, Northern blot i hibridació *in situ* s'ha trobat l'expressió del receptor A_1 en diverses regions del cervell: en el còrtex, el cerebel, l'hipocamp, el tàlem, l'amígdala, el nucli *accumbens*, l'hipotàlem i la medul·la espinal i a baixos nivells en el bulb olfactori, l'estriat i el mesencèfal de rata (Mahan i cols., 1991; Reppert i cols., 1991; Dixon i cols., 1996). Per tant, en el sistema nerviós central el receptor A_1 és altament localitzat en les regions sinàptiques on modula l'alliberació de neurotransmissor com el glutamat, l'acetilcolina, la serotonina i el GABA (Cunha, 2001).

1.2.2 Localització del receptor d'adenosina A_{2A}

El receptor d'ADO A_{2A} s'ha localitzat en la NMJ concretament, en l'axó preterminal, en el terminal nerviós i la cèl·lula muscular, i s'ha trobat absent en la CS en la NMJ neonatal i adulta (figures R.6 i R.7 de l'apartat de *Resultats*), utilitzant l'anticòs de Millipore (05-717). No obstant, en estudis previs d'immunohistoquímica en la NMJ, la localització del receptor A_{2A} s'ha mostrat imprecisa. Utilitzant un anticòs diferent i en concordança amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, alguns autors han detectat el receptor A_{2A} en el terminal nerviós mostrant una gran colocalització amb la syntaxina. No obstant, aquest autors no han trobat immunoreactivitat en els axons intramusculars, ni en la cèl·lula muscular, ni en la CS (Baxter i cols., 2005). Altres investigadors utilitzant un anticòs diferent han localitzat el receptor A_{2A} en la membrana de les cèl·lules musculars esquelètiques, en el citosol, en cèl·lules musculars llises, així com en cèl·lules endotelials humanes (Lyngé i Hellsten, 2000). D'acord amb aquesta localització, alguns estudis han mostrat que l'ADO intracel·lular pot participar en la regulació de la força de contracció (Clark i Barry, 1994), en el transport de la glucosa (Vergauwen i cols., 1997; Han i cols., 1998) i en la vasodilatació en el múscul (Lyngé i Hellsten, 2000). Així mateix, en estudis d'expressió per PCR en temps real (de l'anglès *Real time PCR*) s'ha detectat mRNA en cultius primaris cel·lulars i en teixit de múscul esquelètic *soleus*, *white gastrocnemius* i *extensor digitorum longus* madur de rata (Lyngé i cols., 2003).

El receptor A_{2A} està àmpliament distribuït en diferents teixits i òrgans. En estudis d'immunohistoquímica utilitzant el mateix anticòs que en aquesta tesi, s'ha localitzat en els terminals nerviosos colinèrgics de l'ili de rata, on s'ha vist que l'activació d'aquest receptor té paper excitatori en l'alliberació d'acetilcolina (Duarte-Araújo i cols., 2004a,b; Vieira i cols., 2011). Així mateix, usant un anticòs diferent s'ha detectat en l'uroepiteli de rata (Yu i cols., 2006). Mitjançant les tècniques de RT-PCR i Northern blot s'ha observat mRNA en

el cor, el pulmó, la melsa, l'aorta, l'estomac, el testicle, la pell, el ronyó i el fetge de rata i d'humà (Salvatore i cols., 1993; Dixon i cols., 1996).

En el sistema nerviós central s'ha observat que la distribució de la immunoreactivitat del receptor A_{2A} és més discreta que la del receptor A_1 (Rivkees i cols., 1995). En estudis d'immunohistoquímica utilitzant un anticòs diferent, el receptor A_{2A} s'ha detectat en els nervis terminals hipocampals (Díaz-Hernández i cols., 2002; Rebola i cols., 2005a,b) de rata i en l'estriat de ratolí (Baxter i cols., 2005). Mitjançant la tècnica d'hibridació *in situ* i de RT-PCR s'ha trobat la presència del receptor A_{2A} en l'estriat, en el tubercle olfatori i en el nucli *accumbens* de rata (Jarvis i Williams, 1989; Parkinson i Fredholm, 1990; Dixon i cols., 1996). En estudis farmacològics s'ha mostrat la presència del receptor A_{2A} en neurones, micròglia, oligodendròcits i possiblement en astròcits (Li i cols., 2001; Saura i cols., 2005; Melani i cols., 2009). Com succeeix amb el receptor A_1 en el sistema nerviós central, aquest receptor és altament localitzat en les regions presinàptiques (hipocamp) on modulen l'alliberació de neurotransmissor com el glutamat, l'acetilcolina, el GABA i la noradrenalina (Cunha i cols., 2000; Lopes i cols., 2002; Rebola i cols., 2002, 2005b).

1.2.3 Localització del receptor d'adenosina A_{2B}

En l'estudi de la localització cel·lular del receptor d'ADO A_{2B} s'han utilitzat els anticossos de *Santa Cruz (sc-7506)* i de *Millipore (AB1589P)*. Tots dos anticossos mostren el mateix patró de localització en la NMJ. Segons els resultats obtinguts, el receptor A_{2B} s'ha localitzat en el component presinàptic i postsinàptic, però no s'ha trobat present en la CS en la NMJ adulta (figura R.8 de l'apartat de *Resultats*). En estudis d'immunohistoquímica utilitzant el mateix anticòs de *Millipore (AB1589P)*, el receptor A_{2B} s'ha observat en la membrana de les cèl·lules musculars esquelètiques, en el citosol, en cèl·lules musculars llises, així com en cèl·lules endotelials humanes (Lyngé i Hellsten, 2000). Com s'ha comentat en l'apartat anterior, es pensa que l'ADO intracel·lular pot participar en la regulació de la força de contracció (Clark i Barry, 1994), en la regulació del transport de la glucosa (Vergauwen i cols., 1997; Han i cols., 1998) i en la vasodilatació en el múscul (Lyngé i Hellsten, 2000). Mitjançant la utilització de tècniques com la PCR en temps real i RT-PCR s'ha detectat mRNA en cultius primaris cel·lulars i en teixit de múscul esquelètic madur de *soleus*, *white gastrocnemius* i *extensor digitorum longus* de rata (Dixon i cols., 1996; Lyngé i cols., 2003).

El receptor A_{2B} utilitzant l'anticòs de *Millipore (AB1589P)* s'ha detectat en diversos teixits i òrgans, com és el cas de les papil·les gustatives on sembla ser que l'activació del receptor A_{2B} per l'ADO potencia la resposta del gust dolç, a més d'augmentar la transmissió sensorial del sistema nerviós (**Kataoka i cols., 2012**). Així mateix, s'ha localitzat en el plexe mientèric (molt probable en les cèl·lules glials) (**Vieira i cols., 2011**) i en l'uroepiteli (**Yu i cols., 2006**). En anàlisi de Northern blot s'ha detectat la presència del receptor A_{2B} en l'intestí llarg, la bufeta i a baixos nivells en la medul·la espinal, el pulmó i la glàndula pituïtària (**Stehle i cols., 1992**). A molt baixos nivells, s'ha detectat en el jejú, el ronyó, el cor, la pell i s'han trobat traces en el fetge i la melsa de rata (**Dixon i cols., 1996**).

El receptor A_{2B} és menys abundant en el sistema nerviós central. No obstant, mitjançant immunohistoquímica amb un anticòs diferent al usat, s'ha localitzat en els nervis terminals glutamatèrgics de l'hipocamp on es pensa que modula la inhibició de la transmissió donada pel receptor A_1 (**Gonçalves i cols., 2015**). En estudis de RT-PCR i Northern blot s'ha detectat la presència del receptor A_{2B} en el cervell i la medul·la espinal de conill i de rosegadors (**Stehle i cols., 1992; Auchampach i cols., 2009**), en astròcits i la micròglia (**Hammarberg i cols., 2003; Allaman i cols., 2003; Wittendorp i cols., 2004**). S'ha descrit que l'estimulació del receptors d'ADO A_{2B} en les cèl·lules glials indueix la síntesi i l'alliberació de substàncies neuroprotectores com la interleuquina 6 (**Fiebich i cols., 1996; Schwaninger i cols., 1997; Vazquez i cols., 2008**).

1.2.4 Localització del receptor d'adenosina A_3

Experimentalment, el receptor d'ADO A_3 s'ha localitzat en el component presinàptic i postsinàptic, incloent el sarcoplasma per sota dels nAChRs. Però no s'ha trobat presència d'aquest receptor en la CS en la NMJ adulta (**figura R.9** de l'apartat de *Resultats*). Com en el cas anterior, també s'han utilitzat dos anticossos de dues cases comercials diferents (*Santa Cruz, sc-13938* i *Millipore, AB1590P*), mostrant el mateix patró de localització en la NMJ. Analitzant la bibliografia publicada en el sistema neuromuscular, en un estudi d'immunohistoquímica també s'ha observat la presència del receptor en les membranes presinàptiques dels terminals motors del múscul de diafragma i del múscul *gastrocnemius*, utilitzant un anticòs diferent (**Cinalli i cols., 2013**). Però a diferència d'aquest treball, aquest autors no han detectat immunoreactivitat d'aquesta proteïna en el component postsinàptic.

En general, aquest receptor s'ha trobat àmpliament distribuït en diferents òrgans i teixits perifèrics. En estudis d'immunohistoquímica, amb un anticòs diferent, s'ha detectat reactivitat del receptor A₃ en el cos cel·lular del gangli mientèric de rata on possiblement es pensa que té un efecte facilitatori en l'alliberació d'acetilcolina (**Vieira i cols., 2011**). En estudis de RT-PCR i Northern blot s'ha observat mRNA en la melsa, els pulmons, l'úter i els testicles (**Salvatore i cols., 1993; Dixon i cols., 1996**).

En el sistema nerviós central la presència del receptor A₃ és poc abundant (**Cunha, 2005; Vazquez i cols., 2008**). No obstant, entendre les funcions del receptor A₃ en el sistema nerviós central ha sigut difícil degut a la falta de lligands específics i la baixa densitat d'aquest receptor (**Rivkees i cols., 2000; Costenla i cols., 2001**). En estudis d'immunohistoquímica amb els mateixos anticòsos utilitzats (*Santa Cruz, sc-13938* i *Millipore, AB1590P*) s'ha detectat el receptor A₃ en els terminals sinàptics hipocampals i en cultius de neurones corticals (**Díaz-Hernández i cols., 2002; Rebola i cols., 2005b**). Amb la tècnica de RT-PCR s'ha trobat present en l'estriat, en el bulb olfatori, en l'hipocamp i en l'hipotàlem de rata (**Dixon i cols., 1996**). Així mateix, s'ha observat en els astròcits i la micròglia de ratolí mitjançant la tècnica de RT-PCR i d'hibridació *in situ* (**Hammarberg i cols., 2003; Wittendorp i cols., 2004**). Es pensa que l'estimulació del receptor A₃ en les cèl·lules glials provoca l'alliberació de substàncies neuroprotectores com la citoquina CCL2 també coneguda formalment com MPC-1 (de l'anglès *monocyte chemotactic protein 1*) (**Wittendorp i cols., 2004**).

Es pot concloure en el present treball, segons els estudis d'immunohistoquímica, que els receptors d'ADO es troben presents en els components presinàptics i postsinàptics en la NMJ i el receptor A₁ és també present en la CS. El grup de **Robitaille** ha mostrat que la glia està activament implicada en l'estabilitat i la plasticitat sinàptica (potenciació post-tetànica o depressió depenent del patró d'activitat de la sinapsi). Les CS descodifiquen el patró d'activitat sinàptica a través dels receptors d'ADO i subseqüentment aporten un *feedback* bidireccional a la sinapsi (**Todd i Robitaille, 2006a**). També els mAChRs estan presents en les CS (**Garcia i cols., 2005; Wright i cols., 2009**) i poden regular l'activació de les cèl·lules glials (en resposta a baixa activitat sinàptica) que indueix i guia un creixement axonal compensatori. Aquestes dades indiquen que els receptors d'ADO es localitzen en diferents compartiments i suggereix una complexa senyalització multicel·lular que en aquest treball no s'ha avaluat. Per un altre banda, tal i com s'ha vist, i es discutirà més endavant en els estudis d'electrofisiologia, aquests receptors s'han localitzat principalment

en el terminal nerviós, s'ha suggerit una possible participació directa en la modulació de l'alliberació de neurotransmissor. Això, pot fer pensar que hi hagi un complex balanç de tots els receptors d'ADO (en resposta a variables quantitats d'ADO produïdes en la fenedura sinàptica en varies condicions d'activitat) que pot determinar la seva participació en la funció sinàptica. Per aquest motiu, un dels altres objectius d'aquest treball, que més endavant es discutirà, és la possible participació dels receptors d'ADO en la neurotransmissió evocada i espontània en la NMJ adulta i la possible participació d'aquests receptors purinèrgics amb altres vies de senyalització que participen en el control de la neurotransmissió.

2. FACTORS QUE AFECTEN ALS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA MODULACIÓ DE LA NEUROTRANSMISSIÓ

Prèviament a discutir els resultats electrofisiològics, s'ha cregut oportú discutir i justificar l'elecció del mètode de prevenció de la contracció muscular i les condicions experimentals donat que en la literatura hi ha una gran disparitat de resultats.

2.1 Mecanisme de prevenció de la contracció muscular

En la literatura publicada fins el moment, les condicions de registre de la majoria d'experiments funcionals que s'han dut a terme han interferit en la fisiologia de la sinapsi. En la majoria dels casos, s'ha evitat la contracció natural amb altes concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica (baixa entrada de Ca^{+2}) o bé amb l'addició *d-tubocurarine*. Els dos tractaments alteren a la neurotransmissió (**Ginsborg i Jenkinson, 1976; Wessler i cols., 1986**). Les altes concentracions de Mg^{+2} provoquen una disminució de l'alliberació d'acetilcolina. Així com, en aquestes condicions, les proteïnes PKA i PKC perden el seu acoblament normal en l'alliberació de l'acetilcolina (**Santafé i cols., 2007**). Per un altre banda, l'addició de *d-tubocurarine* redueix la resposta sinàptica i influeix en els receptors nicotínics (nAChRs) i els muscarínics (mAChRs) (**Ferry i Kelly, 1988; Santafé i cols., 2006**). En el cas dels mAChRs, els bloquejadors selectius no afecten a la neurotransmissió, induint una complexa modulació al·lostèrica dels mAChRs canviant la sensibilitat dels bloquejadors selectius dels mAChRs (**Santafé i cols., 2006**). Inclús, alguns autors suggereixen que l'ús de *d-tubocurarine* evita el registre de la neurotransmissió espontània (mEPPs) i en conseqüència, l'estimació del contingut quàntic (m). Per tant, impossibilita saber si un augment o una disminució de l'amplada dels EPPs causat per la substància/es

estudiades, és el resultat d'una acció presinàptica o postsinàptica (**Correia-de-Sá i cols., 1991**). Aleshores, es confirma que hi ha diverses molècules sinàptiques que canvien la seva expressió funcional, si la neurotransmissió es veu alterada. Existeixen diversos exemples: (1) canviant la concentració iònica de la solució fisiològica (amb l'addició d'altres concentracions de Mg^{+2} extern o baix Ca^{+2}). En aquestes condicions, l'alliberació és marcadament baixa (**Correia-de-Sá i cols., 1991**); (2) quan els nivells d'acetilcolina en la fenedura sinàptica són baixos (amb l'addició de l'enzim l'acetilcolinesterasa); i (3) en els terminals nerviosos postnats on l'alliberació d'acetilcolina és baixa. En aquestes condicions, la resposta dels mAChRs del tipus M1 i M2 amb l'acetilcolina endògena alliberada, la qual normalment redueix l'alliberament en l'adult, (**Santafé i cols., 2003, 2006**), canvia i augmenta l'alliberació (**Santafé i cols., 2007**).

En aquest treball per evitar la contracció muscular s'ha utilitzat la toxina μ -CgTx GIIIB, i en els casos que s'ha cregut oportú, s'ha combinat amb el BTS que trenca la unió dels túbuls T en el sarcolemma de la fibra muscular. La μ -CgTx GIIIB bloqueja els canals de sodi dependents de voltatge de la fibra muscular, sense afectar als canals presents en els axons i en els nervis motors terminals (**Cruz i cols., 1985**), preservant inalterada la funció presinàptica de la sinapsi neuromuscular (NMJ). Analitzant la bibliografia publicada, no s'han trobat estudis ni referències que hagin avaluat una relació directe entre els receptors de l'adenosina (ADO) i la μ -CgTx GIIIB en el mecanisme de la modulació. No obstant, **Faria i col·laboradors al 2003** van descriure una possible relació entre la μ -CgTx GIIIB i l'alliberació de l'acetilcolina en determinades situacions. Aquests autors han observat paràlisi muscular amb l'addició de μ -CgTx GIIIB quan s'aplicaven trens tetànics d'estimulació (50 Hz durant 5 segons) indirectament en el tronc nerviós o directament en la fibra muscular. En aquestes condicions experimentals aquest autors han suggerit que hi ha una possible implicació de l'acció presinàptica (**Faria i cols., 2003**). No obstant, en aquesta tesi s'han realitzat estudis control amb l'objectiu de testar l'efecte d'aquesta neurotoxina en la neurotransmissió en les nostres condicions experimentals. En aquests experiments, s'ha evitat la contracció mitjançant el mètode *cut* (veure l'apartat 10.3 *Mètodes de prevenció de la contracció a Materials i Mètodes*) i s'ha confirmat que aquesta toxina no afecta a cap paràmetre de la neurotransmissió (contingut quàntic, freqüència i amplada dels mEPPs, i curs del temps de la neurotransmissió evocada -EPP-). Inclús, en alguns experiments d'electrofisiologia dels receptors d'ADO i de les serina/treonina quinases (realitzats amb anterioritat en el laboratori (**Santafé i cols., 2009**)), s'han repetit utilitzant el mètode *cut*. En els dos casos, s'han obtingut els mateixos resultats que pretractat el múscul amb la toxina

μ -CgTx GIIIB (veure apartat 10.3 a *Materials i Mètodes*). Tot i que, els dos procediments es poden reproduir exactament, s'ha escollit la μ -CgTx GIIIB perquè és un procediment menys laboriós i s'obtenen millors potencials de membrana (**Santafé i cols., 2009**). Aleshores, basant-nos en els estudis control i en els estudis previs realitzats en el grup, s'ha considerat que l'ús de la μ -CgTx GIIIB en els experiments electrofisiològics, es crea un escenari més fisiològic que les condicions d'alt Mg^{+2} i la paralització del múscul amb *d-tubocurarine*.

2.2 Efecte de l'adenosina amb la temperatura en la neurotransmissió

Segons la bibliografia, la majoria d'experiments que s'han recollit han sigut realitzats a temperatura ambient (aproximadament a 26°C) per minimitzar la variabilitat entre els experiments realitzats a l'estiu i a l'hivern a temperatura ambient. En aquesta tesi, amb l'objectiu de descartar la influència de l'ADO amb la temperatura, s'han realitzat alguns experiments on la solució del bany s'ha mantingut a 31°C. En l'apartat de *Materials i Mètodes* (secció: 10.8 *Procediment de l'experiment d'electrofisiologia*) es mostra que no s'han observat canvis significatius en l'efecte de l'ADO a aquesta temperatura tenint la funció sinàptica operativa (bloquejant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB). Així mateix, altres investigadors, han avaluat l'efecte prolongat de l'anàleg CADO o bé l'efecte inhibitori descrit per l'activació del receptor A_1 . En aquests casos, s'han realitzat experiments similars mantenint la solució del bany a 36-37°C i alterant la maquinària sinàptica, com s'ha comentat anteriorment. En aquestes condicions, tampoc s'han trobat diferències significatives amb la temperatura (**Nagano i cols., 1992; Hirsh i cols., 2002; Pousinha i cols., 2010**). En canvi, com era d'esperar, en el model neuromuscular d'amfibi s'ha demostrat que la temperatura pot afectar a l'acció inhibitoria de l'ADO descrita per alguns autors o la forma irreversible de l'ADO, la CADO, en mostres pretractades amb *d-tubocurarine* (**Ginsborg i Hirst, 1972; Silinsky, 1980, 1984**).

En quant a l'alliberació espontània, s'ha trobat que a temperatura ambient no s'observen grans canvis. Però, a rangs de temperatures superiors a 30°C augmenta ràpidament la freqüència dels mEPPs per tant, petits canvis en la temperatura estan associats a una forta pujada en la secreció, fent les mesures més variables (**Liley, 1956; Li, 1958; Hubbard i cols., 1971**).

Així doncs, en tots els experiments electrofisiològics realitzats en aquest treball, la temperatura i la humitat en l'àrea de treball ha estat controlada (26°C i 50%, respectivament) per evitar les diferències de temperatura entre l'hivern i l'estiu. La

temperatura del bany ha estat monitoritzada durant els experiments ($23.4 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$). La humitat sempre s'ha mantingut constant per evitar la diferència de concentració de les solucions i les drogues utilitzades, sobretot degut a la deshidratació de les solucions per ambients secs generats habitualment per l'ús de la calefacció o l'aire condicionat.

3. ELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ

La transmissió sinàptica està sota la regulació de les purines extracel·lulars, les quals a través dels seus receptors de membrana i els passos implicats en el procés d'exocitosi modulen l'activitat neuronal (**Palma i cols., 2011**). En estudis previs, s'ha descrit que en els nervis motors terminals l'ATP és coalliberat amb el neurotransmissor, l'acetilcolina, i una vegada en la fenèdura sinàptica l'ATP és degradat a l'ADO a través de la via de les ectonucleotidases (**Ribeiro i Sebastião, 1987; Meriney i Grinnell, 1991; Redman i Silinsky, 1994**). A més a més, de l'alliberació des del nervi terminal, aquestes purines també poden ser alliberades a l'espai sinàptic des de les fibres musculars actives (**Smith, 1991; Santos i cols., 2003**) i les cèl·lules de Schwann perisinàptiques (**Liu i cols., 2005; Todd i Robitaille, 2006b**). Una vegada en l'espai extracel·lular, l'ADO ajuda a modular la funció presinàptica a través dels autoreceptors d'ADO (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) (**Correia-de-Sá i cols., 1991; Salgado i cols., 2000**). Per un altre banda, l'ATP alliberat a través dels receptors P2 també pot contribuir al control de la transmissió neuromuscular de la NMJ d'amfibi i de ratolí (**Salgado i cols., 2000; Grishin i cols., 2005; De Lorenzo i cols., 2006**).

Fins el moment, en el sistema nerviós central, i en el cas de la NMJ en estudis on la funció de la maquinària sinàptica ha sigut alterada a nivell presinàptic o postsinàptic, s'ha descrit que el paper neuromodulatori de l'ADO en l'alliberació de neurotransmissor depèn majoritàriament de l'equilibri de l'activació del receptor inhibitori (A_1) i l'excitatori (A_{2A}) (**Correia-de Sá i cols., 1991; Sebastião i Ribeiro, 2000**). Alguns autors, han suggerit que hi ha diversos paràmetres que poden afectar a l'activació dels receptors A_1 i A_{2A} : (1) la freqüència i el patró d'estimulació, i per tant, grau de saturació de la fenèdura amb l'ADO endògena així com, la intensitat i la durada de la despolarització axonal; (2) les relatives densitats dels receptors A_1 i A_{2A} ; (3) la relativa eficiència intrínseca de l'activació de cada receptor; (4) l'existència d'altres sistemes de moduladors presinàptics que poden fer desequilibrar el balanç dels receptors A_1 i A_{2A} ; i (5) la concentració d'ADO que pot enfrontar a l'activació dels receptors A_1 i A_{2A} , com una funció d'organització de les

ectonucleotidases i dels transportadors d'ADO (**Correia-de-Sá i cols., 1996; Cunha, 2001; Pinto-Duarte i cols., 2005**). Per tant, s'ha suggerit que el balanç complex dels receptors A_1/A_{2A} pot determinar la inhibició/potenciació de l'alliberació d'acetilcolina (**Pousinha i cols., 2010**).

Una vegada confirmada l'expressió en el múscul esquelètic LAL i la localització dels receptors d'ADO en la NMJ, el següent objectiu en aquest treball ha sigut estudiar els receptors d'ADO en la modulació de l'alliberació d'acetilcolina quan la funció sinàptica està preservada i operativa. Per tant, en aquest estudi es descriu: (1) la participació dels receptors d'ADO: en el control de la neurotransmissió evocada i espontània; (2) la participació dels receptors d'ADO durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora (trens d'estímul a 40-100 Hz durant 2 minuts); (3) la implicació dels receptors d'ADO en la facilitació; i (4) la relació funcional d'aquests receptors amb altres vies de senyalització implicades en el control de la modulació de la neurotransmissió evocada i espontània, donat que s'ha descrit que el funcionament de molts sistemes neuromoduladors presinàptics estan sota el control concís dels autoreceptors metabotròpics d'ADO (**Queiroz i cols., 2003**). A continuació, es discutirà l'efecte dels moduladors exògens, dels anàlegs dels receptors d'ADO i de l'efecte de l'ADO endògena en la modulació de la neurotransmissió evocada a 1 Hz.

4. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN LA NEUROTRANSMISSIÓ EVOCADA

4.1 Efecte de la modulació dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió evocada a 1 Hz

En el present treball, en la primera bateria d'experiments que s'ha dut a terme s'ha avaluat l'efecte dels diferents antagonistes i agonistes purinèrgics en l'alliberació evocada en músculs LALs adults de ratolí. En condicions basals (únicament amb l'estimulació nerviosa a 1 Hz per analitzar l'alliberació evocada d'acetilcolina), i evitant la contracció amb la μ -CgTx GIIIB, es confirma que ni el bloqueig (amb el 8-SPT), ni l'estimulació no selectiva dels P1Rs (amb l'ADO a concentracions nanomolars i micromolars), ni el bloqueig, ni l'estimulació selectiva dels receptors d'ADO (amb els antagonistes i agonistes) no afecta a l'alliberació evocada (veure **figures R.10 i R.11** de l'apartat de *Resultats*). Això, ha suggerit que la interacció entre l'ADO endògena (junt amb l'ADO exògena) i les molècules P1Rs, probablement no contribueixin en la modulació tònica immediata o

constitutiva de l'alliberació de transmissor en condicions basals. A més, un desequilibri del mecanisme dels receptors A_1 i A_{2A} utilitzant moduladors selectius no revelen cap participació de l'ADO endògena en aquestes condicions. En músculs on prèviament s'han tractat amb la μ -CgTx GIIIB per evitar la contracció, la resposta de l'EPP pot estar propera a la saturació perquè molt transmissor és alliberat i un petit augment o disminució en l'amplada de l'EPP (eventualment produït pels moduladors dels PIRs) pot clarament no ser detectat. Per tant, es podria concloure que els receptors d'ADO no es troben acoblats a l'alliberació evocada, quan la maquinària sinàptica es veu preservada i està operativa (veure **figura D.1**). Tot i que s'ha descrit que aquests receptors influeixen en l'acció de diversos neurotransmissors/neuromoduladors/transportadors (**Sebastião i Ribeiro, 2009**). Alguns estudis han confirmat que l'ADO o l'addició de l'agonista selectiu del receptor A_{2A} el CGS-21680 pot activar al receptor Trk (de l'anglès *Tropomyosin-related kinase*) a través del receptor A_{2A} . Aquesta activació no requereix la unió de la seva corresponent neurotrofina per activar la resposta tròfica en motoneurons (**Lee i Chao, 2001; Rajagopal i cols., 2004; Wiese i cols., 2007**). A més, alguns autors han postulat que l'acció excitatòria del BDNF en la neurotransmissió pot ser induïda per la despolarització, que farà que augmentin els nivells extracel·lulars d'ADO. Aquesta ADO activarà al receptor d'ADO A_{2A} que està acoblat a l'adenilat ciclase la qual promourà un augment de la formació del cAMP, seguit de l'activació de la PKA. Aquesta PKA finalment facilitarà l'acció del BDNF a través del receptor TrkB en les sinapsis hipocampals i en la NMJ (**Diógenes i cols., 2004; Pousinha i cols., 2006**). La transactivació dels receptors de les tirosines quinases en resposta a la via de senyalització dels receptors acoblats a les proteïnes G ha estat molt estudiada (**Daub i cols., 1996; Fischer i cols., 2003; Rajagopal i cols., 2004**). Per tant, aquesta via de senyalització és una alternativa per l'activació del receptor Trk (**Wiese i cols., 2007**) ja que promou no només, un augment de l'activitat tirosina quinasa, si no un augment de la fosforilació d'efectors de les Trk tirosines quinases (**Lee i Chao, 2001; Lee i cols., 2002a,b; Rajagopal i cols., 2004**). Així mateix, en estudis previs en el grup, es va observar una relació propera entre els receptors metabotòpics TrkB i mAChRs, s'ha suggerit que els mAChRs també poden contribuir a la transactivació del receptor TrkB (**Garcia i cols., 2010**). Per tant, la modulació dels receptors de les neurotrofines a través dels receptors d'ADO, podria ser una hipòtesi interessant.

A diferència de la metodologia emprada en aquesta tesi, en la literatura prèvia, podem trobar un comportament bifàsic per l'ADO, sota condicions en les quals s'ha interferit en la fisiologia de la sinapsi. És a dir, l'ADO a concentracions micromolars

disminueix l'amplada de l'EPP en la NMJ adulta de rata (**Ginsborg i Hirst, 1972; Pousinha i cols., 2010**), mentre que a concentracions nanomolars pot tenir l'efecte oposat (**Pousinha i cols., 2010**). Unes dades semblants han estat descrites en amfibis (**Ribeiro i Walker, 1975; Sebastião i Ribeiro, 1990; Adámek i cols., 2010**). Aquestes dades indiquen, que hi ha un complex balanç entre els receptors A_1/A_{2A} que pot determinar la inhibició/potenciació de l'alliberació d'acetilcolina. Tot i que a baixes concentracions extracel·lulars d'ADO es poden activar els dos receptors (A_1 i A_{2A}), s'ha descrit que l'activació del receptor A_{2A} predomina per sobre el receptor A_1 , encara que requereix la coactivació del receptor A_1 (**Pousinha i cols., 2010**).

En aquestes condicions, en les quals s'ha interferit en la fisiologia de la sinapsi, els efectes de l'ADO i de l'anàleg CADO, a concentracions submicromolars, poden ser antagonitzats pel ZM241385 (de l'anglès *4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin5ylamino] ethyl) phenol*; **Poucher i cols., 1995**), i els efectes inhibitoris de l'ADO, a concentracions micromolars, han sigut relacionats amb l'activació del receptor A_1 (**Nagano i cols., 1992; Pousinha i cols., 2010, 2012**). Altres autors, confirmen que el paper inhibitori de l'ADO a concentracions micromolars en la NMJ de ratolí és degut a una reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs del tipus P/Q, en preparacions on s'ha utilitzat el *d-tubocurarine* per prevenir la contracció (**Silinsky, 2004**).

Com abans s'ha comentat, l'ús de moduladors selectius no afecten a l'alliberació evocada. Així mateix, altres estudis també han mostrat resultats similars on el bloqueig selectiu amb l'antagonista del receptor A_1 , el DPCPX (10 nM), i pel receptor A_{2A} amb els antagonistes SCH-58261 (50 nM) i ZM241385 (50 nM) tampoc modifiquen el contingut quàntic, en músculs en els que s'ha bloquejat la contracció amb l'addició del *d-tubocurarine* o bé amb altes concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica (**Pousinha i cols., 2010; Cinalli i cols., 2013; Nascimento i cols., 2015**). Però en canvi a diferència d'aquesta tesi, l'ús d'agonistes selectius afecten a la neurotransmissió evocada quan s'altera la maquinària sinàptica a nivell presinàptic o postsinàptic. L'estimulació selectiva del receptor A_1 amb l'agonista no metabolitzable CPA (de l'anglès *6-cyclopentyladenosine*; **Williams i cols., 1986**) disminueix el contingut quàntic (**Pousinha i cols., 2012; Nascimento i cols., 2015**) per un mecanisme que sembla disminuir les corrents de Ca^{+2} tipus P/Q (**Hamilton i Smith, 1991; Silinsky, 2004**). Per un altre banda, l'estimulació selectiva del receptor A_{2A} amb l'agonista CGS-21680, a concentracions de treball més baixes a les utilitzades, augmenta l'alliberació evocada d'acetilcolina. No obstant, en el cas dels animals

molt vells no s'observa aquest efecte, s'ha suggerit que hi ha una funció absent del receptor A_{2A} amb l'edat en rates (**Pousinha i cols., 2012; Nascimento i cols., 2015**).

En aquest treball, degut a les disparitats dels resultats obtinguts amb els antecedents i la bibliografia analitzada a conseqüència del mètode de prevenció de la contracció utilitzat, s'ha considerat adient realitzar experiments amb l'agonista inespecífic l'ADO. S'ha alterat la maquinària sinàptica a nivell presinàptic (amb altes concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica) o bé postsinàptic (pretractant la preparació amb el *d-tubocurarine*). En aquestes condicions, s'ha observat que l'ADO a concentracions micromolars (25 μM) redueix el contingut quàntic tal i com prèviament s'havia descrit en la NMJ (**Ginsborg i Hirst, 1972; Ribeiro i Walker, 1975; Pousinha i cols., 2010**). Per tant, s'ha confirmat que l'efecte de l'ADO depèn del mecanisme escollit per prevenir la contracció.

En un model diferent, en la NMJ d'amfibi, el bloqueig amb antagonistes inespecífics augmenta l'amplada dels EPPs de forma reversible en presència d'altres concentracions de Mg^{+2} o de *d-tubocurarine* (**Ribeiro i Sebastião, 1987; Redman i Silinsky, 1994**). En els nervis terminals motors de l'insecte *larvae Calliphora vicina* s'ha observat que l'ADO disminueix l'amplada de les corrents postsinàptiques evocades. Això és degut a que l'efecte inhibitori causat per l'ADO és inhibït per l'antagonista selectiu del receptor A_1 (DPCPX) i l'efecte excitatori causat per l'agonista del receptor A_{2A} , DPMA (de l'anglès *N6-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl)adenosine*) l'inhibeix el seu antagonista corresponent DMPX (de l'anglès *3,7-dimethyl-1-propargylxanthine*). Així s'ha demostrat que la presència dels receptors presinàptics d'ADO i el seu paper regulador en la neurotransmissió dels nervis motors d'insectes (**Magazanik i Fedorova, 2003**).

A més, en diverses àrees del sistema nerviós central, l'ADO té un paper important com a neuromodulador. A través del receptor A_1 hi ha una inhibició de l'alliberació de neurotransmissor i transmissor sinàptic en el neocòrtex i l'hipocamp (**Ribeiro, 1995**). L'ADO també pot activar al receptor A_{2A} , el qual és menys abundant en aquestes àrees del cervell, causant una discreta facilitació de la neurotransmissió i transmissió sinàptica en l'hipocamp i l'estriat (**Cunha i cols., 1994b, 1997**) donat que el bloqueig amb els antagonistes selectius evita l'efecte inhibitori i facilitatori dels agonistes, respectivament (**Rebola i cols., 2002; Gonçalves i cols., 2015**). En estudis previs s'ha descrit que els dos receptors estan coexpressats i colocalitzats principalment en els terminals nerviosos glutamatèrgics de l'hipocamp i en el nucli estriat (**Cunha i cols., 1994b; Rebola i cols., 2005a; Ciruela i cols., 2006**), i a més de tenir un efecte oposat també poden interaccionar entre ells. Tot i que hi ha estudis que mostren el contrari, que l'activació selectiva del

receptor A_{2A} pot modular l'alliberació d'acetilcolina sense requerir l'activació del receptor A_1 (Correia-de-Sá i cols., 1991; Cunha i cols., 1995; Cunha i Ribeiro, 2000). L'activació del receptor A_{2A} pel seu agonista selectiu (CGS-21680) facilita la transmissió sinàptica, atenuant l'efecte inhibitori tònic del receptor presinàptic A_1 mediat per la PKC, més que per l'activació de la PKA en els nervis terminals glutamatèrgics de l'hipocamp (Lopes i cols., 1999, 2002; Cunha i cols., 2000). Aquest estudi han proposat que aquest efecte pot ser probablement dependent de l'origen de l'ADO en la fenedura sinàptica en l'hipocamp i en la NMJ (Cunha i cols., 1996; Cunha, 2001). Un altre forma d'interacció entre aquests receptors és la formació d'heterodímers (A_1 - A_{2A}) descrita en els nervis glutamatèrgics, on la funcionalitat del receptor A_1 està controlada pel receptor A_{2A} , però no viceversa. A altes concentracions d'ADO s'activa el receptor A_{2A} i s'antagonitza l'efecte del receptor d'ADO A_1 , facilitant l'alliberació de glutamat (Ciruela i cols., 2006).

En els estudis d'immunohistoquímica realitzats en aquesta tesi, s'ha confirmat la presència dels receptors A_{2B} i A_3 en els nervis terminals de la NMJ adulta. Tot i així, els estudis electrofisiològics revelen que el corresponent bloqueig selectiu dels receptors A_{2B} i A_3 amb els antagonistes MRS1706 i MRS1334, respectivament, no afecten a l'alliberació evocada. No obstant, en publicacions recents s'ha descrit que un metabòlit de l'ADO, la inosina, redueix l'alliberació d'acetilcolina evocada en la NMJ de ratolí per una reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs del tipus P/Q. El mecanisme usat pel qual la inosina inhibeix la neurotransmissió també implica a la PKC i la calmodulina (Cinalli i cols., 2013). Tot i que, no es coneix un receptor específic per la inosina, s'ha vist que aquest metabòlit s'uneix normalment al receptor A_3 (Jin i cols., 1997; Tilley i cols., 2000; Gomez i Sitkovsky, 2003). Aquest fet és donat a que l'antagonista específic del receptor A_3 MRS1191 (de l'anglès *3 Ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-(6)-dihydropyridine-3,5 dicarboxylate*) evita la inhibició causada per la inosina en l'alliberació evocada, en condicions en les quals s'ha alterat la maquinària sinàptica (Cinalli i cols., 2013). Aquests resultats, difereixen d'altres estudis que mostren que la inosina no té efecte en l'amplada dels EPPs en el model neuromuscular de granota *Sartorius* (Ribeiro i Sebastião, 1987).

En un model d'estudi diferent, en el sistema nerviós entèric de rata, en estudis amb tècniques de radioisòtops que mesuren l'alliberació evocada de [3H] acetilcolina (a freqüència de 5 Hz) han mostrat que el receptor A_{2B} (localitzat en el plexe mientèric, més probablement en la cèl·lula glial) no interfereix directament en la neurotransmissió colinèrgica. En canvi, el receptor A_3 colocalitzat amb el receptor inhibitori A_1 , té una funció facilitatòria. Això, pot suggerir que l'estimulació del receptor A_3 situat en el cos de la

cel·lula nerviosa, en situacions d'alta concentració d'ADO o d'inosina, pot cooperar amb el receptor facilitatori A_{2A} i augmentar l'alliberació de [3H] acetilcolina (Vieira i cols., 2011).

Com s'ha mencionat anteriorment, en el sistema nerviós central el paper neuromodulador de l'ADO depèn principalment d'un equilibri de l'activació dels receptors A_1/A_{2A} (Sebastião i Ribeiro, 2000). Els receptors A_{2B} i A_3 estan expressats en quantitats significatives en el cervell (Zhou i cols., 1992; De i cols., 1993; Dixon i cols., 1996). La seva funció fisiològica a nivell cel·lular és desconeguda i controvertida, donat que l'afinitat dels receptors A_{2B} i A_3 per l'ADO és considerablement més baixa respecte als receptors A_1 i A_{2A} . A més, la dificultat de trobar antagonistes selectius per aquest receptors ha dificultat conèixer el seu paper biològic (Fredholm i cols., 2005). A més a més, s'ha proposat que la seva activació està implicada en situacions patològiques d'estrès (d'hipòxia i d'isquèmia) on hi ha una alta concentració d'ADO extracel·lular (von Lubitz, 1997; Dunwiddie i Masino, 2001; Popoli i Pepponi, 2012). No obstant, en uns estudis recents s'ha mostrat que el bloqueig del receptor A_{2B} amb l'antagonista MRS1754 (de l'anglès [*N*-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)-phenoxy]acetamide]; Ji i cols., 2001) o bé l'activació d'aquest receptor amb l'agonista BAY606583 (de l'anglès [2-((6-amino-3,5-dicyano-4-[4-(cyclopropylmethoxy)phenyl]pyridin-2-yl)sulfonyl)acetamide]; Hinz i cols., 2014) no modifica la transmissió basal sinàptica. Excepte, en el cas de l'estimulació amb l'agonista BAY606583 que disminueix la ràtio del *pair pulse*, efecte abolit pel seu antagonista (Gonçalves i cols., 2015). Però per un altre banda, s'ha observat que l'activació del receptor A_{2B} disminueix l'activació tònica del receptor A_1 per l'ADO endògena. En aquest estudi s'ha mostrat que el bloqueig selectiu del receptor A_1 o bé la incubació amb l'anàleg CADO, i la posterior addició de l'antagonista del receptor A_{2B} evita l'efecte excitatori provocat pel bloqueig selectiu del receptor A_1 , i atenua l'efecte inhibitori provocat per la CADO, respectivament (Gonçalves i cols., 2015). El mecanisme pel qual el receptor A_{2B} indueix una reducció funcional del receptor A_1 està sense resoldre. S'ha suggerit que una possibilitat podria ser l'heterodimerització entre els receptors A_{2B} i A_1 donat que el receptor A_{2B} pot dimeritzar amb altres receptors (Corset i cols., 2000; Moriyama i Sitkowsky, 2010) i enzims (Antonioli i cols., 2014), i el receptor A_1 pot formar dímers amb diferents receptors acoblats a proteïnes G (Ginés i cols., 2000; Ciruela i cols., 2001; Kamikubo i cols., 2013). Un altre alternativa possible, és que el receptor A_{2B} tingui l'habilitat de dessensibilitzar al receptor A_1 (Gonçalves i cols., 2015).

En el cas del receptor A_3 s'ha descrit un paper en la modulació de la plasticitat sinàptica, en el LTP (*long-term potentiation*) i LTD (*long-term depression*) en l'hipocamp (**Dunwiddie i cols., 1997; Costenla i cols., 2001**). L'activació del receptor A_3 amb l'agonista CL-IB-MECA (de l'anglès *2-chloro-N(6)-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide*) pot augmentar la magnitud del LTP induït per Θ -Burst i pot atenuar el LTD, ja que aquests efectes poden ser antagonitzats pel seu antagonista MRS1191 (**Costenla i cols., 2001**). Per una altre banda, l'activació del receptor A_3 amb l'agonista CI-IB-MECA redueix la sensibilitat del receptor A_1 (**Dunwiddie i cols., 1997**). El mecanisme pel qual l'antagonista del receptor A_3 bloqueja la resposta donada pel receptor A_1 no està clar. Però alguns estudis han proposat que l'activació del receptor A_3 està unida a la inhibició de l'adenilat ciclase (**Zhou i cols., 1992**) així com, a l'activació de la fosfolipasa C (PLC de l'anglès *phospholipase C*; **Ramkumar i cols., 1993**), però sembla que el principal mecanisme és la concurrent activació de la PKC (**Abbracchio i cols., 1995**). Tot i que sota condicions normals, no és probable que l'ADO afecti a la sensibilitat del receptor A_1 i que s'activi el receptor A_3 , degut a la baixa afinitat a l'ADO endògena respecte als receptors A_{2B} i A_3 . Es creu que quan la concentració d'ADO augmenta (per exemple en condicions d'hipòxia o d'isquèmia), l'activació del receptor A_3 i la subseqüent dessensibilització del receptor A_1 es pot donar. Per tant, aquest estudis evidencien que el receptor A_3 pot modular el nivell de sensibilitat del receptor A_1 , el qual normalment està tònicament activat per l'ADO endògena (**Dunwiddie i cols., 1997**).

En conclusió, en la NMJ adulta els receptors d'ADO aparentment no tenen un paper en el control immediat de l'alliberació evocada sota aquestes condicions basals (preservant la funció sinàptica). A més, es confirma que l'efecte de l'ADO en l'alliberació evocada depèn del mecanisme escollit per prevenir la contracció.

4.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa i de la CADO en la neurotransmissió evocada a 1 Hz

Per descartar la possibilitat que l'ADO endògena fos suficient per mantenir els receptors ocupats, donat que els receptors d'ADO no s'han trobat acoblats a l'alliberació evocada, s'ha estudiat l'efecte de l'ADO endògena en l'alliberació evocada. Per dur terme aquest estudi s'ha utilitzat l'enzim ADA que inactiva l'ADO endògena convertint l'ADO en inosina (**Arch i Newholme, 1978**). Els resultats obtinguts mostren que l'ADO endògena

no és responsable de modular la neurotransmissió a baixa freqüència d'estímul (a 1 Hz), atès que no modifica el contingut quàntic (veure **figura R.12** de l'apartat de *Resultats*).

A diferència d'aquest treball, en treballs previs on s'ha evitat la contracció amb el Mg^{+2} , s'ha observat que l'ADA (2 U/ml) causa una escassa disminució en l'alliberació evocada en la NMJ de rata (**Pousinha i cols., 2010, 2012**). En les mateixes condicions, en uns altres estudis en la NMJ de ratolí mostren que l'ADA a concentracions més baixes (1 U/ml) causa una disminució del contingut quàntic dels EPPs (**Nascimento i cols., 2015**). Possiblement, aquesta discrepància entre els resultats obtinguts i els que s'han descrit prèviament, pot ser deguda al mètode de prevenció de la contracció, a la concentració de la substància i a l'espècie estudiada. Ja que com anteriorment s'ha comentat, hi ha diverses molècules sinàptiques que canvien la seva expressió funcional si la funció sinàptica es veu alterada.

En el sistema nerviós entèric de rata amb estudis amb tècniques de radioisòtops per mesurar l'alliberació evocada de [3H] acetilcolina (a 5 Hz de freqüència), s'ha mostrat que l'ADO endògena generada té un efecte tònic facilitatori mediat per l'activació dels receptors A_{2A} . En aquest estudi no s'han observat diferències en l'alliberació evocada de [3H] acetilcolina entre el bloqueig selectiu del receptor A_{2A} i la inactivació de l'ADO amb una concentració de treball més baixa de l'enzim ADA (0.5 U/ml) (**Duarte-Araújo i cols., 2004a; Vieira i cols., 2011**).

A diferència d'aquesta tesi, com era d'esperar, en el model neuromuscular d'amfibi alterant la maquinària sinàptica, s'ha observat que l'ADA (2.5 U/ml) reversiblement augmenta el promig de l'amplada i el contingut quàntic dels EPPs. L'ADA evita l'efecte inhibitori de l'ADO exògena a concentracions micromolars, efecte abolit pel bloquejador de l'ADA (EHNA de l'anglès *erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine*). Així mateix, en l'hipocamp s'ha observat que l'ADA té el mateix comportament (0.5-2 U/ml) augmentant el fEPSP (de l'anglès *field excitatory postsynaptic potentials*) i l'alliberació [3H] acetilcolina evocada, indicant que l'ADO endògena produeix una inhibició tònica de l'alliberació evocada (**Sebastião i Ribeiro, 1985; Ribeiro i Sebastião, 1987; Cunha i cols., 1996**). Això pot suggerir, que l'ADO endògena pot tenir un efecte diferent en la neurotransmissió, dependent del model estudiat, la regió del sistema nerviós, la concentració i del mecanisme de prevenció de la contracció.

En aquest treball s'ha observat els receptors d'ADO no es troben implicats en la modulació de l'alliberació evocada mantenint la funció sinàptica preservada i operativa. En experiments paral·lels i en les mateixes condicions experimentals, l'agonista no

metabolitzable CADO a concentracions micromolars pot ser usat per reduir el contingut quàntic, degut a un treball col·laboratiu entre els receptors A_1 i A_{2A} . Els resultats mostren que la incubació de la CADO en presència del bloquejador inespecífic dels receptors d'ADO no modifica el contingut quàntic, però en canvi l'efecte prolongat de la CADO (10 μM) en presència dels antagonistes específics (DPCPX o SCH-58261) té la capacitat de reduir el contingut quàntic (veure [figura D.1](#)). Pel contrari, la CADO a concentracions nanomolars en condicions basals i en presència del 8-SPT, el DPCPX o bé de l'SCH-58261 no es modifica l'alliberació evocada. Això ha suggerit que la CADO a aquestes concentracions poden ser insuficients per activar als receptors d'ADO (veure [figura R.13](#) de l'apartat de *Resultats*).

A diferència dels resultats obtinguts en aquesta tesi, en estudis previs en la NMJ de rata s'ha descrit un comportament bifàsic per la CADO, com en el cas de l'ADO en condicions en les quals la funció sinàptica es veu alterada (en presència d'altres concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica o bé de *d-tubocurarine*). Altres autors, treballant a concentracions nanomolars (més baixes que la utilitzada en aquest treball), observen un efecte excitatori donat per l'activació del receptor A_{2A} , ja que a diferència d'aquest treball, l'efecte de la CADO es torna inhibitori en presència del seu antagonista selectiu (ZM241385) (**Pousinha i cols., 2010, 2012**). No obstant, en concordança amb aquest treball, la CADO a concentracions superiors (10 μM) té un efecte inhibitori tant en el model de rata com en el d'amfibi, a través de l'activació del receptor A_1 . Però en aquest cas, la presència de l'antagonista selectiu DPCPX (10 nM) atenua l'efecte inhibitori de la CADO descrit a concentracions micromolars (**Sebastião i Ribeiro, 1988, 1990; Pousinha i cols., 2010, 2012**) i l'efecte facilitatori a concentracions nanomolars (**Pousinha i cols., 2010**). Per tant, aquests investigadors han observat que quan la concentració de la CADO augmenta de nanomolar a micromolar hi ha un canvi preponderant de l'activació del receptor A_{2A} cap a l'exclusiva activació del receptor A_1 . S'ha postulat la possibilitat de la formació d'heteròmers amb aquest dos receptors A_1 i A_{2A} , com s'ha vist que succeeix en els terminals nerviosos glutamatèrgics (**Ciruela i cols., 2006**) i en els astròcits (**Cristóvão-Ferreira i cols., 2011**). Una vegada s'activa el receptor A_{2A} a baixes concentracions d'ADO pot inhibir les accions del receptor A_1 i a altes concentracions d'ADO el receptor A_1 pot actuar promovent la predominança del efecte inhibitori (**Pousinha i cols., 2010**). Pel que fa que el DPCPX atenuï l'efecte inhibitori i facilitatori, potser degut a que el bloqueig del receptor A_1 pugui induir un canvi conformacional en l'heteròmer que no permeti la unió de l'agonista al receptor A_{2A} o bé que no permeti l'acoblament efectiu del receptor A_{2A} al

sistema de transducció. De fet com anteriorment s'ha comentat, l'heterodimerització dels receptors acoblats a les proteïnes G pot afectar al funcionament del receptor (**Franco i cols., 2008**) donat que els monòmers i heteròmers poden tenir diferents propietats farmacològiques i de senyalització. La segona possibilitat és una interacció dels receptors A_1/A_{2A} a través de vies de transducció intracel·lulars que intervenen en la unió al receptor (**Sebastião i Ribeiro, 2000**), el que explicaria la necessitat de la funció del receptor A_1 per desencadenar la resposta del receptor A_{2A} en els nervis terminals (**Sebastião i Ribeiro, 2000; Pousinha i cols., 2010**). Tot i que, s'observen efectes diferents de la CADO amb la incubació prèvia dels antagonistes selectius degut a l'ús diferent del mètode de prevenció de la contracció, de la concentració de l'antagonista del receptor A_1 , a l'ús d'un antagonista diferent pel receptor A_{2A} i del model neuromuscular (en el cas del nostre treball amb el múscul LAL de ratolí -múscul tipus tònic- i en el cas d'aquests estudis amb el múscul de diafragma de rata -múscul tipus fàsic-). Aquests investigadors també estableixen que l'efecte de la CADO en l'alliberació evocada depèn d'una interacció entre els receptors d'ADO A_1 i A_{2A} . Així mateix, com en el cas de la NMJ, en el sistema nerviós central concretament en els nervis terminals colinèrgics, en experiments realitzats amb la tècnica de radioisòtops, la CADO (10 μ M) inhibeix l'alliberació evocada de [3 H] acetilcolina mitjançant el receptor A_1 . En aquest estudi s'ha mostrat que la CADO en presència del DPCPX té un efecte facilitatori degut a l'activació del receptor A_{2A} , efecte abolit per l'addició del seu antagonista l'SCH-58261. Aquests estudis han postulat que sota condicions de control del receptor inhibitori i facilitatori, l'addició exògena d'un agonista no selectiu ni metabolitzable a concentracions micromolars, majoritàriament promou l'activació inhibitoria del receptor A_1 , més que la facilitatòria del receptor A_{2A} (**Rebola i cols., 2002**).

5. PARTICIPACIÓ DELS ANTAGONISTES I AGONISTES DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ALLIBERACIÓ ESPONTÀNIA

En aquesta tesi s'ha estudiat la possible participació dels receptors d'ADO en la neurotransmissió espontània, que són els EPPs miniatura que apareixen de forma espontània. No precisen del bloqueig de la contracció ni de l'activació del potencial d'acció per part la unitat estimuladora (per a més informació veure l'apartat de *Materials i Mètodes*). Com s'ha mencionat anteriorment en l'apartat de *Resultats*, s'ha de tenir present que aquestes dues formes d'alliberació de l'acetilcolina (l'evocada i l'espontània) es

regeixen per mecanismes diferents i per tant, no s'ha d'esperar una confirmació de les dades obtingudes amb els experiments evocats.

És important ressaltar, que els resultats obtinguts en l'alliberació espontània en aquest treball, són en part diferents quan es contrasta amb altres estudis utilitzant condicions similars (sense cap bloquejador presinàptic o postsinàptic donat que el registre dels mEPPs no és necessari bloquejar la contracció natural muscular) (De Lorenzo i cols., 2004; Shakirzyanova i cols., 2006; Palma i cols., 2011). I el que és més important, tots els efectes de les substàncies purinèrgiques utilitzades en aquesta tesi han sigut a nivell presinàptic donat que en cap cas s'ha observat una modificació en l'amplada dels mEPPs (veure figures R.14A-B i R.15 de l'apartat de *Resultats*).

5.1 Modulació exògena dels receptors d'adenosina en la neurotransmissió espontània

Segons els resultats obtinguts sembla ser que els receptors d'ADO estan implicats en l'afinament de la maquinària de l'alliberació espontània (inclús en presència de μ -CgTx GIIIB i en condicions basals), perquè el bloqueig i l'estimulació inespecífica a concentracions micromolars dels receptors d'ADO augmenta i disminueix la freqüència dels mEPPs, respectivament. La participació d'aquests receptors en la reducció de l'alliberació espontània (quan és activada per l'ADO exògena) pot requerir la col·laboració dels dos tipus de receptors A_1 i A_{2A} , donat que l'estimulació selectiva d'aquests receptors (amb el CCPA i el CGS-21680, respectivament) no canvia la freqüència dels mEPPs. No obstant, el receptor A_1 sembla estar implicat tònicament en el manteniment de la baixa freqüència en condicions de repòs, perquè el seu bloqueig selectiu (DPCPX) augmenta la freqüència dels mEPPs (veure la figura D.1). Aquesta implicació pot estar relacionada amb que els PIRs tinguin un paper en la modulació del control del mecanisme intracel·lular del Ca^{+2} , fluctuacions estocàstiques les quals puguin contribuir a l'alliberació espontània. Per un altre banda, també s'ha estudiat la participació dels altres dos tipus de receptors d'ADO A_{2B} i A_3 en l'alliberació espontània. Experimentalment s'ha observat que aquests receptors no participen en la modulació de l'alliberació espontània, donat que el bloqueig selectiu amb els seus corresponents antagonistes selectius no modifica la freqüència dels mEPPs. Per tant, una funció dels receptors PIRs, i en particular del receptor A_1 , pot ser conservar els recursos a través d'una limitació de l'alliberació espontània (veure la figura R.14 de l'apartat de *Resultats*).

En estudis previs realitzats per altres autors, s'ha descrit un comportament bifàsic de l'ADO exògena en la neurotransmissió espontània, en el qual s'ha mostrat que l'ADO a

concentracions nanomolars (a diferència d'aquest treball) augmenta la freqüència del mEPPs, mentre que a concentracions micromolars inhibeix la freqüència dels mEPPs en el model de NMJ de rosegador (**Ginsborg i Hirst, 1972; De Lorenzo i cols., 2004; Veggetti i cols., 2008**) i d'amfibi (**Ribeiro i Walker, 1975; Barry, 1990; Shakirzyanova i cols., 2006; Adámek i cols., 2010**). Com en aquest treball, altres autors també han observat que l'acció inhibidora de l'ADO a concentracions micromolars en l'alliberació espontània és a través del receptor presinàptic A_1 , donat que l'acció de l'ADO exògena a concentracions micromolars s'ha bloquejat amb els antagonistes inespecífics i específics del receptor A_1 en la NMJ d'amfibi (**Barry, 1990; Searl i Silinsky, 2003, 2005; Shakirzyanova i cols., 2006; Shakirzyanova i cols., 2006**).

En el nostre model d'estudi (múscul esquelètic LAL, tipus fàsic) a diferència d'altres treballs publicats, no s'ha pogut reduir directament l'alliberació espontània amb l'estimulació selectiva del receptor A_1 amb el CCPA, ni augmentar l'alliberació amb l'activació específica del receptor A_{2A} amb el CGS-21680. Encara que, com abans s'ha comentat l'estimulació inespecífica amb l'ADO exògena a concentracions micromolars pot inhibir l'alliberació a través del receptor A_1 . En estudis similars i amb un model muscular diferent (múscul de diafragma, tipus tònic) han mostrat que en condicions normals, el bloqueig selectiu del receptor A_1 no afecta a l'alliberació espontània en la NMJ de ratolí. S'ha suggerit que el flux basal de l'ADO és mínim i no afecta a l'alliberació espontània (**De Lorenzo i cols., 2004**). En una situació diferent com són en condicions d'hipertonicitat en la qual es produeix un augment marcat d'alliberament d'acetilcolina de manera espontània, independent de l'entrada de Ca^{+2} (**Fatt i Katz, 1952; Hubbard i cols., 1968; Losavio i Muchnick, 1997**) i sense l'afectació dels VDCCs tipus L, N i P/Q (**Losavio i Muchnick, 1997**), el bloqueig del receptor A_1 amb l'antagonista DPCPX pot augmentar l'alliberació d'acetilcolina (**Veggetti i cols., 2008**). No obstant, amb l'estimulació selectiva (CCPA, 500 nM), a concentracions de treball superiors a les que s'han utilitzat en aquest treball, aconseguen disminuir l'alliberació espontània en condicions basals i d'hipertonicitat (**De Lorenzo i cols., 2004; Veggetti i cols., 2008**).

En experiments similars, en les mateixes condicions i concentració d'antagonista també s'ha observat que el bloqueig selectiu del receptor A_{2A} (SCH-58261) no afecta a l'alliberació espontània (**Palma i cols., 2011**). Inclús, altres autors en concordança amb els resultats obtinguts en aquest treball, mostren que el bloqueig selectiu del receptor A_{2A} amb un antagonista diferent a l'utilitzat (ZM241385) no modifica la freqüència dels mEPPs

(Hirsh i Silinsky, 2002). En canvi, la seva estimulació amb l'agonista selectiu CGS-21680, a concentracions inferiors a les utilitzades, augmenta la freqüència dels mEPPs, donat que el bloqueig previ amb l'antagonista selectiu SCH-58261 evita l'acció del CGS-21680. S'ha suggerit que el mecanisme pel qual l'activació del receptor A_{2A} exerceix una facilitació presinàptica en la secreció espontània, és com a resultat d'un augment de la concentració de Ca^{+2} citosòlic del nervi terminal provinent dels magatzems interns sensibles a *tapsigargin/ryanodine* (Palma i cols., 2011). Possiblement, aquestes discrepàncies entre els resultats obtinguts i la bibliografia analitzada poden ser degudes al model i les condicions experimentals així com, a l'efecte de les concentracions de treball utilitzades en els experiments.

Pel que fa als receptors A_{2B} i A_3 segons els resultats obtinguts s'ha evidenciat que no participen en la modulació de l'alliberació espontània. No obstant, en estudis recents s'ha vist que el metabolít de l'ADO, la inosina, pot activar al receptor A_3 en la NMJ de ratolí, induint una inhibició de l'alliberació espontània (Cinalli i cols., 2013).

5.2 Efecte de l'enzim adenosina deaminasa (ADA) i de la 2-cloroadenosina en l'alliberació espontània

Els resultats mostren que l'ADO exògena a través del receptor presinàptic A_1 pot controlar directament l'alliberació espontània d'acetilcolina, però en canvi l'estimulació selectiva del receptor A_1 amb l'agonista CCPA no té efecte en la freqüència dels mEPPs. Això, fa pensar que probablement l'ADO endògena (inclús sota condicions de repòs, quan no s'espera trobar molècules d'ADO endògena en la fenedura sinàptica) faci que el receptor A_1 pugui estar operatiu per mantenir tònicament l'alliberació espontània a baixos nivells i l'estimulació addicional de l'agonista CCPA pot ser inefectiva. Per confirmar aquesta premissa, s'ha realitzat experiments on s'ha eliminat l'ADO endògena mitjançant la incubació de l'enzim ADA. Experimentalment, s'ha vist que es produeix un augment significatiu de la freqüència dels mEPPs, efecte similar al produït amb el bloquejador no selectiu 8-SPT i l'antagonista selectiu del receptor A_1 , el DPCPX (veure figures R.14 i R.15 de l'apartat de *Resultats*). Aquests resultats, semblen indicar que l'ADO endògena pot ajudar a limitar l'alliberació espontània d'acetilcolina a través del receptor A_1 , tot i que aparentment els receptors d'ADO no tenen un paper en el control immediat de l'alliberació evocada. No obstant, en les mateixes condicions l'efecte prolongat de l'agonista no metabolitzable CADO promou una situació diferent (Di Angelantonio i cols., 2011; Pousinha i cols., 2012). Experimentalment, s'ha observat que a concentracions micromolars

té la capacitat de reduir el contingut quàntic, però no es modifica la freqüència dels mEPPs en condicions basals o bé en presència dels moduladors selectius degut a un balanç dels receptors d'ADO A_1/A_{2A} . A concentracions submicromolars, la freqüència dels mEPPs augmenta com a resultat d'un treball col·laboratiu entre els receptors A_1 i A_{2A} , donat que si inhibim els receptors inespecíficament o bé per separat no s'observa modificació en la freqüència de l'alliberació espontània (veure [figura R.16](#) de l'apartat de *Resultats*). Possiblement, aquest augment de l'alliberació espontània (CADO 300 nM) pot alterar la disponibilitat del *pool* de vesícules alliberables per exocitosi que pot donar com a resultat la disminució de l'alliberació induïda per la CADO (10 μ M). No obstant, això pot ser poc probable perquè la CADO a les concentracions que redueix el contingut quàntic (10 μ M), la freqüència no és alterada degut a un equilibri entre els receptors A_1 i A_{2A} .

En general, aquests resultats revelen una complexa implicació dels receptors d'ADO A_1 i A_{2A} en l'alliberació espontània i evocada quan estan fortament estimulats per la CADO més enllà de les característiques de les condicions basals.

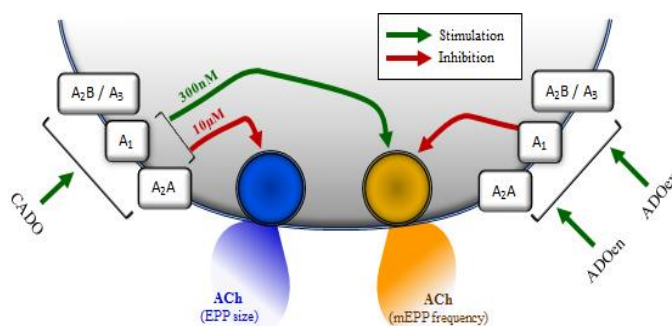


Figura D.1. Participació dels receptors d'adenosina en l'alliberació evocada i espontània. En condicions basals l'ADO endògena (ADO_{en}) tònicament redueix l'eficàcia del mecanisme no sincronitzat d'alliberació d'acetilcolina a través del receptor A_1 i els esdeveniments espontanis són reduïts. L'ADO exògena (ADO_{ex}) addicional potencia aquest efecte. La CADO a baixes concentracions augmenta la freqüència dels mEPPs i a altes concentracions de CADO (10 μ M) redueix el contingut quàntic. En ambdues situacions hi ha una implicació dels receptors A_1 i A_{2A} . Els receptors d'ADO A_{2B} i A_3 no es troben involucrats.

En uns estudis similars en el mateix model d'estudi, altres investigadors han obtingut resultats similars. **Nascimento i col·laboradors** han observat que l'ADA a concentracions inferiors a la utilitzada (1 U/ml) també augmenta la freqüència dels mEPPs (**Nascimento i cols., 2015**).

En el cas de la CADO analitzant la literatura prèvia es troba una gran disparitat de troballes. Com en aquest treball, **Hirsh i Silinsky** no han observat cap diferència en la freqüència de mEPPs a concentracions micromolars de la CADO (1 μ M) (**Hirsh i Silinsky,**

2002). Com en aquest estudi, aquests autors observen que la CADO (1 μM) en presència del bloquejador selectiu del receptor A_{2A} (ZM241385) no produeix efecte en la neurotransmissió espontània. No obstant, si que troben una disminució de l'alliberació espontània d'un 75% del valor control amb la CADO (10 μM) (Hirsh i Silinsky, 2002). S'ha proposat que el possible mecanisme pel qual l'anàleg de l'ADO té un efecte inhibitori és per una disminució de l'habilitat del Ca^{+2} per promoure el procés d'exocitosi (Silinsky, 1984, 1986; Silinsky i Solsona, 1992). Així mateix, en la NMJ de rosegador, s'ha observat que la CADO a concentracions de treball més baixes (30 nM), en presència d'alt Mg^{+2} , augmenta l'alliberació espontània fins a mitjana edat però que amb l'edat indueix l'efecte oposat induint una disminució de la freqüència dels mEPPs en animals vells (70-80 setmanes d'edat) (Pousinha i cols., 2010, 2012; Nascimento i cols., 2015). Això, s'ha interpretat com que aquests animals perden l'habilitat d'activar al receptor A_{2A} degut a una disminució del nombre de receptors A_{2A} o una disminució de l'afinitat del lligand pel receptor (Pousinha i cols., 2012).

En el cas de la NMJ d'amfibi s'ha observat que l'ús de l'anàleg de l'ADO, L-PIA (de l'anglès *N6-(L-Phenylisopropyl)adenosine*, 1 nM) disminueix la freqüència dels mEPPs, efecte bloquejat per l'antagonista selectiu del receptor A_1 (DPCPX) (Barry, 1990). Probablement, aquestes diferències de resultats poden ser degudes a la diferència entre espècies, a l'ordre de potencia com agonista del receptor d'ADO i al procediment experimental emprat.

6. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 40 Hz

Un dels objectius d'aquesta tesi, ha sigut estudiar la funció dels receptors d'ADO en la modulació de la plasticitat a curt termini durant l'activitat sinàptica imposada (trens d'estímul a 40 Hz durant 2 minuts). És conegut que altes freqüències d'estimulació (20-50 Hz) del nervi motor provoca una depressió en l'alliberació del neurotransmissor (Eccles i cols., 1941; Lundberg i Quilisch, 1953), degut a una disminució de les vesícules d'acetilcolina disponibles per a ser alliberades immediatament des del terminal presinàptic (Betz, 1970; Christensen i Martin, 1970) i per una disminució de les vesícules d'acetilcolina emmagatzemades en el terminal nerviós (Heuser i cols., 1979). A més, pot sorgir un deteriorament de la mida dels potencials postsinàptics (Liley i North, 1953; Mallart i Martin, 1968; Magleby, 1973; Wu i Bertz, 1998; Dittman i cols., 2000; Wesseling

i Lo, 2002; Stevens i Williams, 2007). En treballs anteriors en el grup, s'ha vist que hi ha molècules sinàptiques com el factor neurotròfic *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) i els mAChRs que tenen un paper protector en condicions d'activitat sinàptica imposada (trens d'estímul a 40 Hz durant 2 minuts). En aquests estudis s'ha mostrat que l'aplicació exògena del CNTF o bé el bloqueig dels mAChRs amb l'atropina (AT) disminueix i augmenta la magnitud de la depressió, respectivament. Això fa pensar que una funció dels mAChRs a part de protegir la funció sinàptica per una disminució de l'alliberació evocada (principalment a través del receptor M2) és reduir la depressió (**Garcia i cols., 2012; Tomàs i cols., 2014**). Per tant, degut aquest antecedents s'ha volgut investigar com els receptors d'ADO contribueixen en la modulació de la depressió a curt termini durant una activitat repetitiva.

A més, en tots els experiments d'activitat sinàptica a 40 Hz amb l'objectiu de poder identificar les modificacions en la gestió intracel·lular del Ca^{+2} s'ha estudiat, a més, els *paired pulses* o facilitació. En aquest estudi, no s'han trobat diferències significatives en els *pair pulses* en presència dels moduladors purinèrgics (veure **figura R.21** de l'apartat de *Resultats*). Això suggereix que la NMJ és un sistema molt estable comparat amb el sistema nerviós central on hi ha més variabilitat (**Accorsi-Mendoza i cols., 2013**).

6.1 Efecte dels moduladors inespecífics i específics dels receptors d'adenosina, de l'adenosina endògena i de la 2-cloroadenosina durant l'activitat sinàptica a 40 Hz

Els presents resultats confirmen que els PIRs es troben implicats en el control de la depressió sinàptica (trens a 40 Hz durant 2 minuts). S'ha observat que el bloqueig no selectiu dels receptors d'ADO (8-SPT) augmenta la depressió, mentre que l'addició de l'ADO exògena a concentracions micromolars (25 μ M) (conjuntament amb l'ADO endògena) té un efecte fortament protector, disminuint la magnitud de la depressió. Per un altre banda, la presència dels moduladors selectius dels receptors A_1 i A_{2A} , inclús, dels antagonistes dels receptors A_{2B} i A_3 no tenen efecte en la depressió sinàptica (veure **figura D.2** de l'apartat de la *Discussió* i les **figures R.17** i **R.18** de l'apartat de *Resultats*). L'augment de la depressió donat pel bloqueig complet dels receptors d'ADO, i l'efecte oposat de l'addició de l'ADO exògena a concentracions micromolars revelen que el mecanisme purinèrgic sembla estar implicat en la protecció de la funció sinàptica reduint la magnitud de la depressió durant una activitat repetitiva. A més, indica que dos o més receptors d'ADO necessiten treballar de forma col·laborativa per reduir aquesta depressió. No obstant, en les nostres condicions, l'ADA no pot reduir la depressió a 40 Hz, però si que

pot augmentar l'alliberació espontània (veure la **figura R.19** de l'apartat de *Resultats*). Tot això fa pensar que la producció d'ADO endògena pot ser insuficient, ja que no es coneix si els alts nivells d'ADO produïts en la fenèdura sinàptica durant l'activitat sinàptica són similars als obtinguts per l'aplicació de l'ADO exògena. Per un altre banda, s'ha observat que el complet bloqueig dels receptors d'ADO (8-SPT) augmenta la depressió, mentre que la hidròlisi de l'ADO endògena a través de l'enzim ADA no afecta a la modulació de la neurotransmissió. Per aquests resultats hi poden haver diverses explicacions possibles: (1) que l'efecte tònic dels receptors d'ADO quan estan bloquejats potser parcialment independent de l'estimulació amb l'ADO. Pot intervenir una transactivació del receptor d'ADO donada pel receptor tirosina quinasa en resposta a la via de senyalització dels receptors acoblats a les proteïnes G (**Daub i cols., 1996; Lee i Chao, 2001; Fischer i cols., 2003; Wiese i cols., 2007; Oliveira i cols., 2009; Garcia i cols., 2010**); i (2) una fracció de l'ADO endògena pot evitar la hidròlisi per donada per l'ADA (possiblement perquè la produïda està molt propera als receptors d'ADO).

Per un altre banda, l'efecte prolongat de la CADO (300 nM), en les nostres condicions, no té efecte en la depressió, possiblement aquestes concentracions de treball són insuficients per activar el sistema. No obstant, els resultats mostren que la CADO (10 µM) té l'habilitat de reduir la depressió encara que de forma no significativa. Probablement, aquest efecte protector pot ser mediat pel receptor A₁, i el receptor A_{2A} pot tenir un efecte modulador sobre el receptor A₁ perquè, la protecció es veu significativament augmentada després del bloqueig del receptor A_{2A} i es veu evitada quan ambdós receptors són bloquejats (veure la **figura D.2** de la *Discussió* i la **figura R.20** de l'apartat de *Resultats*).

Analitzant la literatura, en el model neuromuscular d'amfibi s'ha mostrat que l'ADO és un modulador de la depressió sinàptica durant altes freqüències d'estimulació (**Meriney i Grinnell, 1991**). Com s'ha comentat anteriorment, s'ha descrit que la depressió sinàptica està associada a una reducció de la probabilitat de l'alliberació a més de la disponibilitat de les vesícules sinàptiques per a ser alliberades (**Betz, 1970; Christensen i Martin, 1970**). En uns estudis més recents realitzats conjuntament amb microscòpia de fluorescència on es marquen les vesícules sinàptiques en combinació amb estudis electrofisiològics per registre intracel·lular, mostren la modulació del reciclatge de les vesícules sinàptiques per l'ADO durant altes freqüències d'estimulació (50 Hz durant 15s) en la NMJ de ratolí (**Perissinotti i Uchitel, 2010**). Aquest estudi evidencien que a més de l'efecte presinàptic de l'ADO en el procés d'exocitosi, l'ADO també pot tenir un paper en la recuperació de la vesícula. L'ADO endògena a través del receptor A₁ pot restringir

l'exocitosi vesicular. És a dir, sota condicions fisiològiques, l'alta freqüència d'estimulació comença a funcionar amb un alt contingut quàntic d'alliberació de transmissor donat per la utilització del *fast-release pool*. Degut aquest fet, el màxim efecte inhibitori de l'ADO que exerceix és considerablement menor que la completa inhibició. L'ADO generada durant el període d'activitat redueix la quantitat de entrada de Ca^{+2} i dirigeix les vesícules reciclades cap al *pool* vesicular de *slow-release*, per tant cap el *reserve pool*. A més, s'ha observat que el destí de la recuperació de les vesícules és modificat per l'activació del receptor A_1 , el qual redueix la mida del *fast-release pool* de vesícules sinàptiques a altes freqüències d'estimulació quan es bloqueja el receptor A_1 o bé quan s'aplica l'ADO exògena. Així, sota condicions fisiològiques, a altes freqüències d'estimulació es comença per un augment del contingut quàntic d'alliberació de transmissor degut a l'ús del *fast-release pool*. L'efecte inhibitori que exerceix l'ADO és considerablement menor que la completa inhibició. L'ADO generada durant el període inicial d'activitat redueix la l'entrada de Ca^{+2} i dirigeix les vesícules cap al *slow-release pool*. Aquest procés garanteix un manteniment del neurotransmissor però a baix nivell d'alliberació, garantint una ràpida i fidel comunicació sinàptica (**Perissinotti i Uchitel, 2010**). Probablement, aquest podria ser un mecanisme alternatiu pel qual l'ADO pot tenir un efecte protector en la depressió sota aquestes condicions experimentals.

Per un altra banda, hi ha estudis publicats que descriuen que l'activació tònica del receptor inhibitori A_1 i/o el receptor facilitatori A_{2A} està regulada per la concentració de nucleòsid en la sinapsi (**Correia-de-Sá i cols., 1996**). Els paràmetres d'estimulació del terminal nerviós (la freqüència, la duració del puls i la duració del tren) determinen la quantitat de transmissor i/o modulador alliberat i, ha sigut proposat durant molt temps com una característica important en el control sinàptic (**Correia-de-Sá i cols., 1996**). En estudis amb tècniques de radioisòtops on es mesura l'alliberació evocada de [3H] acetilcolina tot i sent, tècniques diferents a les utilitzades en aquest treball, s'han observat resultats similars (**Timóteo i cols., 2003**). En trens curts d'estimulació (a 5 o 50 Hz, durant 250 polsos) o bé, en trens curts de 5 Hz on seguidament s'ha estimulat a 50 Hz, tant l'ADA com el bloqueig selectiu del receptor A_1 així com, el bloqueig selectiu del receptor A_{2A} no modifiquen l'alliberació evocada. S'ha suggerit que aquestes condicions d'estimulació són inapropiades per generar nivells d'ADO endògena suficients i necessaris per activar als receptors presinàptics. En canvi, després del preconditionament tetànic, és a dir, primer una estimulació a 50 Hz (250 polsos) i immediatament després una estimulació a 5 Hz (250 polsos), el bloqueig del receptor A_{2A} o bé l'ADA (0.5 U/ml) augmenten l'alliberació

evocada de [^3H] acetilcolina, mentre que el bloqueig del receptor A_1 té una petita acció inhibidòria (**Timóteo i cols., 2003**). A més, s'ha proposat que el control en la transmissió neuromuscular per l'ADO endògena requereix un llindar de concentració de nucleòsid, el qual pot ser influenciat pel paradigma d'estimulació (**Correia-de-Sá i cols., 1996**). Per un altre banda, en experiments on hi ha una prolongació del puls (de 40 μs a 1 ms a 5 Hz de freqüència) o bé un augment en la freqüència d'estímul (d'1 Hz a 50 Hz durant 40 μs) s'ha observat que l'agonista del receptor A_{2A} (CGS-21680C de l'anglès *2-[4-(2-p-carboxyethyl)phenylamino]-5'-N-ethylcarboxamido adenosine*) té un efecte excitatori, mentre que l'efecte inhibitori de l'agonista del receptor A_1 [^3H]-RPIA (de l'anglès *R-N6-phenylisopropyl adenosine*) es veu significativament atenuat (**Correia-de-Sá i cols., 1996; Oliveira i cols., 2004**). A més, s'ha trobat que l'addició de l'ADO a concentracions molt altes (500 μM), té un efecte facilitatori. S'ha suggerit que prolongant els polsos individuals o augmentant la freqüència d'estímul en el nervi terminal poden influenciar en la formació d'ADO endògena, la qual pot potenciar la facilitació tònica de l'acetilcolina donada pel receptor A_{2A} , mentre que l'activació del receptor inhibitori A_1 es pot tornar menys efectiva (**Correia-de-Sá i cols., 1996; Timóteo i cols., 2003; Oliveira i cols., 2004**). Probablement, aquesta diferència de resultats obtinguts pot ser donada per la tècnica i el paradigma d'estimulació utilitzat.

7. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN L'ACTIVITAT SINÀPTICA EVOCADA A 100 Hz

Els resultats evidencien que el mecanisme purinèrgic sembla estar implicat en protegir la funció sinàptica durant una activitat repetitiva, a més s'ha investigat el seu possible efecte a alts nivells d'activitat (trens a 100 Hz, durant 2 minuts) on la producció d'ADO endògena es veu augmentada. En aquestes condicions, s'ha observat que ni el bloqueig complet dels receptors d'ADO (8-SPT), ni l'addició de l'ADO exògena poden canviar la magnitud de la depressió sinàptica. El fet que el bloqueig no selectiu (amb el 8-SPT) no tingui efecte en la depressió, indica que quan aquests receptors no estan operatius, la depressió no augmenta. Una possible explicació és que pot haver un conjunt de moduladors (acetilcolina) i autoreceptors (mAChRs) que poden substituir als receptors d'ADO en el control de la depressió (veure una recent revisió del nostre laboratori **Tomàs i cols., 2014**). Alternativament, l'ADO endògena pot desplaçar a l'antagonista 8-SPT dels receptors d'ADO tenint un efecte protector en la depressió, ja que com s'ha mostrat en els

experiments de trens d'estimulació a 40 Hz l'ADO té un efecte protector en la depressió. Així mateix, el fet que l'ADO exògena no modifiqui la depressió, pot ser que aquesta ADO addicional pot trobar als receptors ocupats o dessensibilitzats per l'ADO endògena. Donat que en aquestes altes freqüències d'estimulació fa que augmenti la concentració d'ADO en la fenedura sinàptica evitant l'efecte de l'ADO exògena addicional. A més, s'ha observat que l'inhibidor selectiu del receptor A_1 (DPCPX) no afecta a la depressió, mentre que la inhibició del receptor A_{2A} (SCH-58261) redueix fortament la depressió. Així mateix, s'ha evidenciat que la inactivació de l'ADO endògena mitjançant l'addició de l'enzim ADA augmenta fortament la magnitud de la depressió (veure [figura R.22](#) de l'apartat de *Resultats*). Aquest fet, que indica que la producció de l'ADO endògena en la fenedura sinàptica en aquestes condicions, pot ser suficient per reduir la magnitud de la depressió, i que aquesta ADO endògena a alts nivells d'activitat pot interaccionar amb els receptors A_1 per reduir la depressió (veure la [figura D.2](#)).

En el cas del sistema nerviós central hi ha altres investigadors que han descrit un comportament similar de l'ADO amb el receptor d'ADO A_{2A} i la transactivació del TrkB en determinades condicions. Com s'ha mencionat anteriorment en aquest treball, **Diógenes i col·laboradors al 2004** han descrit que l'activació del receptor A_{2A} pot representar un requisit crucial pel funcionament del factors neurotròfics en les sinapsis mitjançant estudis d'electrofisiologia en llesques de l'àrea CA1 de l'hipocamp de rata (**Diógenes i cols., 2004**). Atès que el receptor d'ADO A_{2A} té la capacitat de transactivar al receptor TrkB en absència de la seva corresponent neurotrofina (**Lee i Chao, 2001**) i pot desencadenar l'acció excitatòria del BDNF sobre la transmissió sinàptica (**Diógenes i cols., 2004, 2004; Pousinha i cols., 2006; Tebano i cols., 2008**). **Diógenes i col·laboradors al 2007** evidencien que la coaplicació del BDNF i del CGS-21680 no facilita els efectes del BDNF. La falta de l'efecte de la potenciació del CGS-21680 suggereix que l'estat d'activació del receptor A_{2A} està garantida per l'ADO endògena podent ser suficient per a que es manifesti els efectes del BDNF. D'acord amb aquesta troballa **Fontinha i col·laboradors al 2008** han evidenciat que l'activació del receptor A_{2A} fracassa la facilitació del LTP induïda pel BDNF en la regió CA1 de l'hipocamp. Però quan l'ADO endògena és inactivada amb l'enzim ADA, i d'aquesta manera no està tònicament activat, el CGS-21680 té la capacitat de facilitar l'acció del BDNF en LTP (**Fontinha i cols., 2008**). D'aquesta manera s'ha demostrat que la activació selectiva del receptor A_{2A} està críticament implicada en la modulació del BDNF en LTP en l'àrea CA1 de l'hipocamp (**Tebano i cols., 2010**). Per tant, tal i com succeeix amb els receptors de les neurotrofines en el sistema nerviós central i en la NMJ,

possiblement potser que l'ADO endògena interaccioni amb els receptors d'ADO i eviti l'efecte de l'ADO exògena.

En resum, sembla ser que l'ADO endògena pot protegir la depressió sinàptica principalment a través de l'estimulació del receptor A_1 durant una intensa activitat sinàptica, mentre que el receptor A_{2A} sembla modular la resposta del receptor A_1 . No està clar si la reducció de la depressió pot ser una simple conseqüència d'una reducció de l'alliberació a través dels receptors d'ADO. De fet, l'ADO redueix la freqüència dels mEPPs però no el contingut quàntic dels EPPs. I l'estimulació amb la CADO (10 μ M) redueix el contingut quàntic però no afecta a la freqüència dels mEPPs.

En la literatura hi ha estudis amb trens d'alta freqüència d'estímul realitzats amb un protocol diferent (trenns d'estímul a 100 Hz durant 400 ms cada 2 minuts, en presència d'altres concentracions de Ca^{+2}) en el model neuromuscular d'amfibi (Searl i Silinsky, 2003). Aquests estudis mostren que l'ADO té un efecte inhibitori. S'ha suggerit que l'ADO actua en un estadi més tardà durant el procés de secreció, al reduir el nombre de *primed* vesícules (procés en el qual les vesícules estan sotmeses a un procés de maduració, per a convertir-se en vesícules de neurotransmissor competents per a ser alliberades) degut a una baixa afinitat pel Ca^{+2} d'un component de l'aparell de secreció (Silinsky, 1981, 1984, 1985). Per tant, aquest autors evidencien que l'efecte de l'ADO es reflexa com una reducció de les vesícules *primed* amb el suficient Ca^{+2} unit als sensors de Ca^{+2} per promoure el procés d'exocitosi (Searl i Silinsky, 2003).

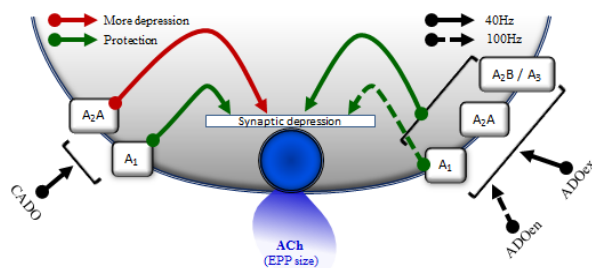


Figura D.2. Participació dels receptors d'adenosina en l'activitat sinàptica evocada a 40 i 100 Hz. Els receptors d'ADO estan implicats en el control de la depressió. A freqüències moderades d'estimulació (40 Hz durant 2 minuts) l'ADO endògena (ADOen) conjuntament amb l'ADO exògena (ADOex) té un efecte protector en la depressió sinàptica, degut a un treball col·laboratiu de dos o més subtipus de receptors d'ADO. No obstant, l'ADOen no pot reduir la depressió, el que suggereix que la producció de l'ADOen potser insuficient en aquestes condicions. L'efecte prolongat de la CADO (10 μ M) té un efecte protector (menor que l'ADOex) a través del receptor A_1 , tenint el receptor A_{2A} un efecte modulador sobre el receptor A_1 . En condicions d'alta freqüència d'estimulació (100 Hz durant 2 minuts), quan el receptor A_{2A} es troba bloquejat, l'ADOen té un potent efecte facilitatori a través del receptor A_1 . El que indica que alts ràtios d'activitat l'ADOen redueix la depressió mitjançant el receptor A_1 .

8. RELACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN L'ALLIBERACIÓ EVOCADA

Com s'ha descrit en la *Introducció* els receptors d'ADO són pleioentròpics, tenen la capacitat d'acoblar-se a diferents proteïnes G i a diferents sistemes de traducció, d'acord amb el seu grau d'activació i la seva particular localització cel·lular en diferents tipus cel·lulars (**Cunha, 2005**). Per tant, l'activació dels receptors d'ADO influeix en l'acció d'altres neurotransmissors i neuromoduladors indirectament, comportant-se com un modulador de moduladors ja que el funcionament de molts sistemes neuromoduladors presinàptics estan sota el control concís dels receptors d'ADO (**Queiroz i cols., 2003**). Donat que l'ADO usa vies hàbils per participar en aquestes funcions, funciona com un "ajustador" i en aquestes vies contribueix a una interacció sofisticada entre els propis receptors d'ADO i els receptors d'altres neuromoduladors i neurotransmissors, inclús tenint la capacitat de transactivar altres receptors (**Sebastião i Ribeiro, 2000; Lee i Chao, 2001; Diógenes i cols., 2004**) i modular esdeveniments en la plasticitat sinàptica (**de Mendonça i Ribeiro, 2001**). Per aquest motiu, s'ha analitzat la relació dels receptors d'ADO en diferents vies de senyalització implicades en el control de la neurotransmissió, mantenint en tot moment la funció sinàptica preservada i operativa (bloquejant la contracció amb la μ -CgTx GIIB).

8.1 Relació dels receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió

En estudis previs en el nostre laboratori, s'ha descrit que la funció muscarínica general contribueix al manteniment de la generació espontània d'acetilcolina. La funció muscarínica preserva la funció sinàptica per una disminució de l'alliberació evocada principalment per part del receptor M2 i redueix la magnitud de la depressió (**Santafé i cols., 2003, 2006; Garcia i cols, 2005; Tomàs i cols., 2014**). Tot i que els receptors d'ADO i els mAChRs intervenen de forma diferent en l'alliberació evocada, s'ha proposat estudiar si hi ha una possible interacció entre els autoreceptors metabotròpics presinàptics purinèrgics (PIRs) i els muscarínics (mAChRs) en la neurotransmissió evocada i en la depressió sinàptica.

8.1.1 Efecte entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió evocada

Els resultats obtinguts evidencien una mútua dependència entre els receptors d'ADO i els mAChRs en l'alliberació evocada. Els dos mecanismes semblen compartir la mateixa via de senyalització, donat que tant el bloqueig com l'estimulació inespecífica dels receptors d'ADO (prèvia a la incubació de l'inhibidor inespecífic dels mAChRs, l'AT o com a la inversa), no modifiquen el contingut quàntic. L'AT no pot fer la seva funció de potenciar l'alliberació. Així mateix, es confirma aquesta relació amb el bloqueig inespecífic previ dels mAChRs amb l'AT i la posterior incubació amb la CADO a concentracions micromolars, com en la situació inversa, no té efecte en l'alliberació evocada. Pensem que ni la CADO pot fer la seva funció d'inhibir així com l'AT tampoc pot potenciar l'alliberació evocada (veure [figura R.23](#) de l'apartat de *Resultats*).

Per un altre banda, s'ha estudiat quins subtipus de receptors d'ADO com de muscarínics (M1 i M2) es troben implicats en la modulació de l'alliberació evocada. S'ha observat que els receptors d'ADO estan relacionats amb els mAChRs del tipus M1 i M2. El bloqueig inespecífic com l'específic (8-SPT, DPCPX, SCH-58261) així com, l'estimulació inespecífica amb l'ADO (25 μ M), i la posterior incubació amb els bloquejadors muscarínics selectius (pirenzepina, PIR o metoctramina, MET) no afecten a l'alliberació evocada (veure la [figura R.24](#) de l'apartat de *Resultats*). Això, suggereix que la participació del mecanisme muscarínic depèn en certa manera de la permissió de la via purinèrgica i viceversa, donat que pel funcionament normal dels mAChRs es necessita un bon equilibri del conjunt dels receptors d'ADO. Així mateix, la modulació dels mAChRs no permet l'acoblament dels receptors d'ADO en l'alliberació evocada ([figura D.3](#)).

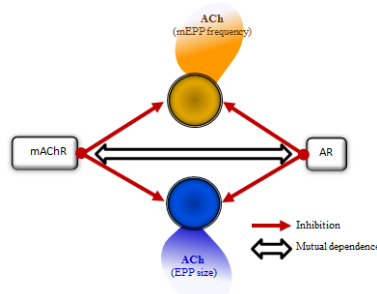


figura D.3. Relació entre els receptors d'adenosina i els muscarínics en l'alliberació evocada i espontània. La inhibició entre els receptors d'ADO i l'alliberació evocada únicament succeeix quan els receptors d'ADO s'estimulen amb la CADO i en el cas de l'alliberació espontània quan s'estimula amb l'ADO exògena a concentracions micromolars (*fletxes vermelles*). Els resultats obtinguts en el present estudi indiquen que hi ha una absoluta interdependència entre els receptors d'ADO i els mAChRs en la modulació de l'alliberació evocada i espontània, en condicions basals. Un desequilibri en un dels dos grups de receptors (quan un o més d'un subtipus de receptors està bloquejat) fa que l'altre grup de receptors es desacoblini de l'alliberació.

8.1.2 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz

Veient aquesta relació entre els receptors d'ADO i els mAChRs en la neurotransmissió evocada (1 Hz), s'ha volgut estudiar si existeix aquesta relació funcional durant l'activitat sinàptica. Els resultats mostren que el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió (trens a 40 Hz durant 2 minuts). Tot i que, el control purinèrgic sembla ser més fort, perquè la depressió pot ser augmentada amb l'antagonista 8-SPT després d'un inicial augment de la depressió donat pel bloqueig muscarínic amb l'AT. Per un altre banda, la inhibició purinèrgica inespecífica prèvia (8-SPT) evita l'efecte de la segona incubació del bloquejador muscarínic (l'AT), el que suggereix que possiblement pot haver una transactivació entre els receptors muscarínics i purinèrgics (veure [figura R.25](#) de l'apartat de *Resultats*). Analitzant la literatura, s'ha descrit que aquest receptors poden transactivar als receptors tirosines quinases. Per exemple, en cèl·lules HEK-293T, el *epidermal growth factor receptor* (EGFR) és torna actiu i dimeritza a través d'una via regulada pel receptor M1, requerint l'activació de la PKC independentment del *epidermal growth factor* (EGF). Això indica que la transactivació d'EGFR és un component significatiu en una via per la qual M1 pot modular els canals Kv1.2 ([Tsai i cols., 1997](#)). Per un altre banda, l'ADO o l'addició del seu agonista selectiu CGS-21680 pot activar als receptors Trk a través del receptor A_{2A} independentment de la unió de la seva corresponent neurotrofina per activar la resposta tròfica en motoneurons ([Lee i Chao, 2001](#); [Rajagopal i cols., 2004](#); [Wiese i cols., 2007](#)). A més, s'ha observat que l'ADO no pot reduir la depressió en presència de l'AT així com, l'AT no pot augmentar la depressió després de la preincubació de l'ADO. El que suggereix que l'ADO endògena (o bé, conjuntament amb l'exògena) té un efecte protector en la depressió impedit l'acció inhibidòria de l'AT. A la [figura D.4](#) es resumeixen els principals resultats i conclusions d'aquest apartat.

Resultats semblants als obtinguts en aquest treball han sigut descrits, en altres articles publicats on també s'ha descrit una relació funcional entre els receptors mAChRs (M1 i M2) i els receptors d'ADO ([Hamilton i Smith, 1991](#); [Oliveira i cols., 2002, 2015](#); [Oliveira i Correia-de-Sá, 2005](#)). Amb tècniques de radioisòtops per mesurar l'alliberació evocada de [³H] acetilcolina, a baixes freqüències d'estimulació (trens de 5 Hz), el receptor M1 està completament actiu. Les funcions dels receptors M2 i A_{2A} estan reprimides, el flux d'acetilcolina està controlat per la formació de petites quantitats d'ADO actuant per la via inhibidòria del receptor A₁. Però, la neuromodulació canvia a altes freqüències (dispar a 50

Hz). En aquestes condicions han postulat que hi ha una activació tònica del receptor A_{2A} que afavoreix la inhibició tònica del receptor M2 frenant l'acció oposada del receptor M1 (Oliveira i cols., 2002, 2015; Oliveira i Correia-de-Sá, 2005). Per tant, el flux d'ADO des del nervi terminal actiu (a través del receptor A_1) pot estar acoblada per reduir la funció del receptor M2, podent sent la via intracel·lular de l'adenilat ciclasa en comú (Oliveira i cols., 2009). A més, l'ADO i l'acetilcolina semblen actuar d'una manera similar, no-additiva per disminuir les corrents de Ca^{+2} via inhibidora (A_1R i M2), els quals comparteixen la via en comú de la proteïna G susceptible a la toxina *pertussis* (Hamilton i Smith, 1991).

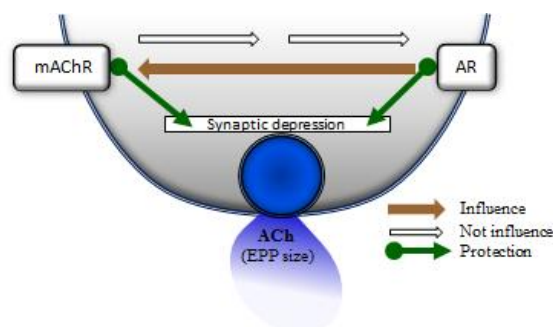


Figura D.4. Relació entre els receptors d'adenosina i els muscarínics en el control de la depressió sinàptica a 40 Hz. El mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió. No obstant, si els mAChRs són bloquejats (AT), els receptors d'ADO (AR) poden continuar protegint contra la depressió (el 8-SPT evita aquesta protecció) gairebé al màxim de capacitat (l'ADO addicional no augmenta aquesta protecció). Recíprocament, si els ARs són inhibits o estimulats, els mAChRs es desacoblen del mecanisme del control de la depressió (l'addicional inhibició amb l'AT no canvia la mesura dels últims EPPs en un tren). Per tant, el control purinèrgic de la depressió sembla ser més potent que el control muscarínic (en les condicions del present estudi).

Així mateix, amb la mateixa tècnica del radioisòtop però amb un altre model d'estudi s'ha descrit una possible interacció entre el receptor d'ADO A_{2A} i el receptor tipus M3 (Vieira i cols., 2009). En el sistema nerviós mientèric de rata, en trens de freqüència a 5 Hz (750 polsos) s'ha observat que el receptor facilitatori M3 depèn del flux d'ADO promovent l'activació del receptor facilitatori A_{2A} . En aquestes condicions, el bloqueig selectiu del receptor A_{2A} amb el seu antagonista ZM241385, la inhibició del transport d'ADO amb *dipyrimole* o bé la inhibició de l'ecto-5'-nucleotidasa amb *concanavalin A*, atenuen l'efecte inhibitori causat per l'antagonista del receptor M3 (4-DAMP de l'anglès *1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide*) i bloquegen l'efecte facilitatori de la oxotremorina en l'alliberació de [3H] acetilcolina (Vieira i cols., 2009).

8.2 Relació entre receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió evocada

Varis receptors de la membrana axonal es troben acoblats a vies intracel·lulars que convergeixen a un repertori de quinases efectores que estan implicades en l'exocitosi del transmissor. Un exemple d'aquestes quinases són les proteïnes quinases PKA i PKC (West i cols., 1991; Numman i cols.,1994; Tanaka i Nishuzuka, 1994; Byrne i Kandel, 1996; Catterall, 1999a; Santafé i cols., 2005, 2006, 2007). En aquesta tesi, s'ha estudiat la possible relació funcional de les serina/treonina quinases PKA i PKC amb els receptors d'ADO en el control de la neurotransmissió evocada. A les figures D.5 i D.6 es resumeixen els principals resultats i conclusions d'aquest apartat.

S'ha descrit que els receptors d'ADO modulen l'activitat de la via de senyalització de la PKA (Schulte i Fredholm, 2002; Fredholm i cols., 2003). L'acoblament tònic de l'activitat de la PKA per promoure l'alliberació d'acetilcolina (el qual és inhibït per l'H-89) va ser mantingut després de que els receptors d'ADO van ser inhibïts o estimulats. No obstant, en cap d'aquestes condicions pot influenciar a l'activitat de la PKA en augmentar l'alliberació d'acetilcolina amb l'agonista Sp-8-BrcAMP, la qual cosa suggereix que treballa pròxim al seu nivell màxim (figura D.5 i veure la figura R.26 de l'apartat de Resultats). En presència de l'ADO exògena hi ha tres condicions que coincideixen: (1) els últims EPPs d'un tren de 2 minuts a 40 Hz són més grans que en el control (menys depressió); (2) la PKA s'acobla tònicament per potenciar l'alliberació (l'alliberació és reduïda per l'H-89); i (3) la PKA no pot ser estimulada encara més amb el Sp-8-BrcAMP, en aquestes condicions. Per tant, la PKA pot treballar a prop del seu límit superior d'activitat per modular la reducció de la depressió. En presència del 8-SPT (antagonista inespecífic dels receptors d'ADO), els últims EPPs del tren són més petits que en el control (més depressió) i l'acoblament tònic de la PKA a l'alliberació evocada (modulació del contingut quàntic) tampoc pot ser estimulat en aquest cas, el que suggereix una parcial inhibició en l'absència de la funció dels receptors d'ADO.

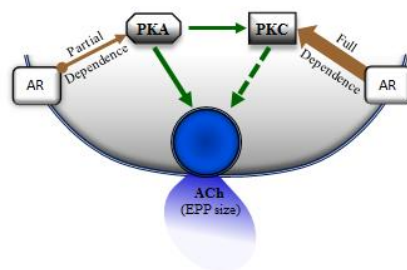


Figura D.5. Relació entre els receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió evocada. (Peu de figura de la pàgina anterior). Quan els receptors d'adenosina (AR) es troben bloquejats (8-SPT), la PKA està acoblada encara que no pugui ser addicionalment estimulada pel Sp-8-BrcAMP (*partial dependence*), el que suggereix que pot treballar a prop de la seva capacitat. No obstant, l'acoblament de la PKC en condicions regulades, en les quals l'acoblament pot ser induït per altes concentracions de Ca^{+2} , amb activitat continua a 1 Hz i amb l'estimulació amb PMA, l'acoblament és completament evitat (*full dependence*). La *fletxa* de PKA a PKC representa certa dependència de PKC sobre l'activitat de PKA en el bon control de l'alliberació d'acetilcolina (ACh) prèviament descrit (Santafé i cols., 2009). La *fletxa* de PKA a ACh representa l'acoblament tònic de la quinasa a l'alliberació, mentre que la *fletxa* discontinua de PKC cap a ACh indica que l'acoblament de la PKC a l'alliberació ACh succeeix en certes condicions regulades.

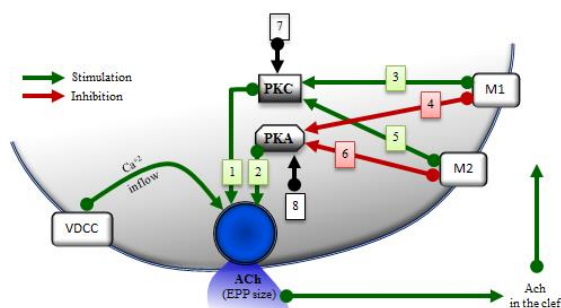


Figura D.6. Participació de la proteïna quinasa C (PKC), proteïna quinasa A (PKA) i els receptors muscarínics (mACHRs) en l'alliberació de neurotransmissió. (1) Mecanisme muscarínic. El bloqueig selectiu dels mACHRs tipus M1 i M2 mostren dos funcions diferents i oposades (augment-reducció, respectivament). No obstant, finament equilibrats, els receptors M1-M2 operen en un mecanisme que modula l'alliberació de la transmissió en la NMJ adulta de rata. El resultat final, no obstant, en general pot ser una funció conservativa per la limitació del mecanisme de potenciació (*probablement, el funcionament complet de la via número 2 en el diagrama*). Els mecanismes dels receptors M1 i M2 depenen de la normalitat funcional de PKC, PKA i dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC) tipus P/Q. (2) La participació de PKC. Quan la PKC està estimulada, aquest augment en l'alliberació ve de la integritat funcional dels canals P/Q que és mantinguda per la suficient entrada de Ca^{+2} . Una diana de la PKC pot ser els canals de Ca^{+2} per si mateix. En condicions sinàptiques normals, la PKC no contribueix tònicament a potenciar l'alliberació perquè el bloqueig de la PKC (CaC) no disminueix el contingut quàntic. No obstant, la PKC pot ser inhibida per la CaC (*via 1 en el diagrama*) en determinades circumstàncies, quan hi ha una implicació dels mACHRs com un desequilibri dels receptors M1 i M2 donat pel bloqueig selectiu d'aquests receptors. Per tant, ambdós mACHRs estan acoblats aï poden estimular a la PKC (*números 3 i 5 en el diagrama*), encara que aquest acoblament no és operatiu i la PKC no treballa quan el funcionament sinàptic normal està amb un bon equilibri del mecanisme muscarínic. A més, amb el bloqueig d'ambdós mACHRs (AT), la PKC pot ser inhibida per la CaC i augmenta l'alliberació. Aquest fet, suggereix un desemmascarament del no efecte dels mACHRs sobre la PKC en la modulació de l'alliberació (*probablement, la via 7 en el diagrama*). (3) La participació de la PKA. L'estimulació de la PKA (Sp-8-BrcAMP) indueix un augment en l'alliberació. Improbable per la PKC, en condicions normals la funció sinàptica de la PKA pot contribuir a potenciar l'alliberació (*número 2 en el diagrama*) perquè el bloqueig d'aquesta quinasa (H-89) pot reduir l'alliberació de transmissor. No obstant, el bloqueig dels receptors M1 o M2 redueix l'efecte tònic de la potenciació de l'alliberació donada per la PKA. Per tant, ambdós mACHRs estan acoblats aï poden inhibir a la PKA (*vies números 4 i 6*), encara que en condicions normals sense un desequilibri muscarínic aquest acoblament sembla ser inefectiu, perquè s'ha demostrat que la PKA té un component potenciador en l'alliberació. La potenciació de l'alliberació a través de la PKA també succeeix quan ambdós mACHRs són bloquejats amb l'AT, el que suggereix el desemmascarament d'una no estimulació muscarínica sobre la PKA (*número 8 en el diagrama*). Figura adaptada de la publicació de Santafé i cols. (2006).

No obstant, l'acoblament de la PKC en l'alliberació només es dona en diverses condicions, com per exemple, en presència de concentracions d'alt Ca^{+2} , durant una activitat continua a 1 Hz o bé amb l'estimulació del PMA (**Santafé i cols., 2006, 2007; Besalduch i cols., 2010**). Aquest acoblament és completament evitat amb el bloqueig o l'estimulació prèvia dels receptors d'ADO (veure **figura D.5**). En aquest treball es conclou que l'activitat d'acoblament de la PKC a l'alliberació evocada necessita un equilibri normal dels receptors d'ADO (veure **figures R.27 i R.28** de l'apartat dels *Resultats*). Tot i que, les relacions descrites són molt complexes i poden haver diverses explicacions alternatives, una conclusió important que s'evidencia en aquest treball és que potser el bloqueig dels receptors d'ADO desacobla a la PKC de la modulació de l'alliberació evocada d'acetilcolina. Aquest desacoblament, pot augmentar la depressió sinàptica en aquestes circumstàncies, perquè quan la PKC es troba acoblada, l'alliberació d'acetilcolina és potenciada (**Santafé i cols., 2005, 2006, 2007, 2009**) (veure **figura D.6**). No obstant, s'ha descrit que l'acoblament de la PKC és necessari pel funcionament dels mAChRs (**Santafé i cols., 2006, 2007, 2009**), i després del bloqueig dels receptors d'ADO i en conseqüència es desacobla la PKC, i els mAChRs no poden funcionar. Així mateix el bloqueig dels mAChRs acobla a la PKC en l'alliberació i això fa que es pugui augmentar la mida de l'EPP amb el resultat dels recursos quàntics destinats a augmentar els últims EPPs en el tren seran ràpidament utilitzats. Per tant, l'AT augmentarà la depressió.

Altres treballs publicats, corroboren els resultats obtinguts en aquesta tesi on també han trobat una interacció entre les serina/treonina quinases (PKA i PKC) i els receptors d'ADO. En la NMJ de rata, s'ha observat que el bloqueig selectiu previ de la PKA amb l'H-89, evita l'efecte excitatori descrit de l'agonista selectiu del receptor A_{2A} (CGS-21680) (**Pousinha i cols., 2006**), en preparacions pretractades amb *d-tubocurarine*. S'ha suggerit, que l'activació del receptor A_{2A} , com per exemple en una situació de despolarització on els nivells d'ADO augmenten, s'acobla a l'adenilat ciclase promovent un augment de la formació de cAMP, seguida d'una activació de la PKA (**Pousinha i cols., 2006**). Per un altre banda, com abans s'ha mencionat en la NMJ de ratolí, el metabòlit inosina estableix una inhibició de l'alliberació d'acetilcolina on també es troba implicat en aquest efecte la PKC i la calmodulina (**Cinalli i cols., 2013**).

A diferència dels resultats obtinguts en aquest estudi, a la bibliografia s'ha descrit que en la NMJ d'amfibi l'acció inhibidòria de l'ADO a concentracions micromolars (25-250 μ M) i en preparacions tractades amb *d-tubocurarine* (**Ginsborg i Hirst, 1972; Ribeiro i Walker, 1975; Pousinha i cols., 2010**) és independent del mecanisme de les proteïnes PKA

i PKC. Això és degut a que en presència o en absència de l'inhibidor no selectiu de diferents proteïnes quinases (PKA, PKC i PKG), l'H7 (de l'anglès *1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine*; **Hidaka i cols., 1984**), l'ADO disminueix l'alliberació evocada (**Hirsh i cols., 1990**). En canvi, en situacions on s'ha evitat la contracció amb altes concentracions de Mg^{+2} en la solució fisiològica, l'ADO a concentracions micromolars no presenta diferències significatives en l'efecte inhibitori prèviament descrit de l'ADO en presència i en absència de l'inhibidor de la PKC (*polymixin B*) i l'activador de la PKC (el forbol èster PDAc de l'anglès *Phorbol diacetate*) el qual atenua l'efecte inhibitori de l'ADO (1-3 μM) i del seu anàleg CADO (0.1-3 μM) (**Sebastião i Ribeiro, 1990**). Com s'ha comentat, l'H7 és un inhibidor no selectiu que bloqueja a les quinases PKA, PKC i PKG amb potències similars (**Hidaka, 1984**). Probablement, el propi bloqueig inespecífic d'aquestes proteïnes quinases pot desacoblar a les proteïnes quinases de l'alliberació sense tenir efecte sobre els receptors d'ADO, donat que s'ha descrit interaccions entre les serina/treonina quinases en el control de la neurotransmissió. Un exemple, és la dependència que té la PKC de l'activitat de la PKA (**Santafé i cols., 2009**). A més, com s'ha mencionat anteriorment en la *Introducció*, s'ha descrit que les serina/treonina quinases no tenen efecte en presència de Mg^{+2} , perquè el Mg^{+2} desacobla a les quinases PKA i PKC de la neurotransmissió evocada degut a una disminució de l'entrada del Ca^{+2} (**Santafé i cols., 2007**).

En el sistema nerviós central, també s'ha descrit una relació entre la PKA i la PKC i el receptor d'ADO A_{2A} . Clàssicament s'ha descrit que el receptor A_{2A} està acoblat a la via de traducció adenilat ciclasa/cAMP (**Fredholm i cols., 1994**). L'activació del receptor A_{2A} pot estar acoblat a diverses proteïnes G i la seva activació pot influenciar com a mínim a dues proteïnes quinases (PKA i PKC). En uns estudis electrofisiològics en vies colinèrgiques hipocampals, s'ha descrit que l'efecte facilitatori en l'alliberació d'acetilcolina donat pel receptor A_{2A} depèn de l'activació de la via cAMP/PKA. S'ha observat que la inhibició de la PKA (amb l'H-89) atenua l'efecte facilitatori del receptor A_{2A} i el bloqueig de la PKC amb *bisildolymaleimide*, no evita l'efecte de l'agonista CGS-21680 per facilitar l'alliberació d'acetilcolina. Aquest estudi proposa que l'efecte facilitatori del receptor A_{2A} requereix l'activació de la via adenilat ciclasa/cAMP/PKA més que la via de la PKC (**Rebola i cols., 2002**). No obstant, tot i que no s'han trobat evidències de la participació de la PKC en l'alliberació evocada d'acetilcolina dels nervis terminals hipocampals, no s'ha descartat un paper menor de la PKC quan la via de la PKA està bloquejada, com s'ha vist que passa en els nervis terminals de l'estriat (**Gubitz i cols.,**

1996). Pel contrari, en estudis de registres de fEPSP han observat que la facilitació de l'activació del receptor A_{2A} en la transmissió sinàptica hipocampal i l'atenuació del receptor inhibitor A_1 , la PKC està més implicada que el sistema de traducció de la PKA (Cunha i Ribeiro, 2000). Així mateix, s'ha vist que l'activació del receptor A_{2A} facilita l'activitat dels transportadors d'ADO per un mecanisme dependent de l'activitat de la PKC en l'hipocamp, el qual pot modular els nivells disponibles de l'ADO per activar al receptor A_1 (Pinto-Duarte i cols., 2005).

8.3 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals calci dependents de voltatge (VDCC) en la neurotransmissió evocada

Prèviament, s'ha demostrat que l' ω -Aga IVA inhibeix les corrents presinàptiques de Ca^{+2} i l'alliberació d'acetilcolina induïda per l'electricitat o per la despolarització donada pel K^+ en la NMJ de mamífer (Protti i Uchitel, 1993; Bowersox i cols., 1995; Losavio i Muchnick, 1997). A més, en la NMJ hi ha diversos estudis que mostren que els canals P/Q són els principals canals d'entrada de Ca^{+2} i reguladors de l'alliberació de transmissor (Protti i Uchitel, 1993; Mynlieff i Beam, 1994; Santafé i cols., 2001). Hi ha diversos estudis previs en el nostre laboratori on s'ha descrit la relació entre els VDCCs i altres molècules implicades en el control de la neurotransmissió com els mAChRs i les proteïnes PKA i PKC (Santafé i cols., 2003, 2005, 2006, 2007). Per aquest motiu, un dels objectius d'aquesta tesi ha sigut estudiar la possible relació funcional dels receptors d'ADO i els VDCCs en el control de la neurotransmissió evocada. Els resultats mostren que el bloqueig previ dels canals P/Q i la segona incubació amb l'ADO potencia l'alliberació evocada de l'acetilcolina. El bloqueig dels canals P/Q pot beneficiar als receptors d'ADO de tal forma que l'ADO exògena pot potenciar l'alliberació. Encara que com s'ha vist experimentalment en l'experiment recíproc, l'efecte de l' ω -Aga IVA en presència de l'ADO, té el mateix efecte que l' ω -Aga IVA de manera independent que en condicions basals. Així mateix, en un experiment addicional realitzat en el nostre laboratori, s'han bloquejat prèviament tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT i posteriorment, s'han bloquejat els canals P/Q, i l' ω -Aga IVA continua tenint un efecte inhibitori en l'alliberació evocada (% de disminució: 52.42 ± 4.15 ; $P < 0.05$, $n = 3$ músculs i un mínim de 15 fibres per múscul). Per tant, es pot concloure que hi ha una relació unidireccional entre els receptors d'ADO i els VDCCs. A més, a l'observar que el bloqueig dels canals P/Q amb l' ω -Aga podia beneficiar als receptors d'ADO de tal forma que l'ADO exògena podia potenciar la neurotransmissió evocada s'han realitzat els experiments de l'ADO en presència de Mg^{+2} (0.5-1 mM, baixa

entrada de Ca^{+2}). En aquestes condicions, el Mg^{+2} bloqueja el lloc d'entrada del Ca^{+2} de manera competitiva en el terminal nerviós (Jenkinson, 1957; Kharasch i cols., 1981). Els resultats mostren que no s'ha observat cap efecte en l'alliberació evocada (veure figura R.29 de l'apartat de *Resultats*). Possiblement, l'ADO endògena conjuntament amb l'exògena és suficient per evitar la inhibició produïda pel Mg^{+2} .

Uns altres estudis confirmen la relació entre els receptors d'ADO i els VDCCs del tipus P/Q proposant que la inhibició de l'alliberació evocada donada pel receptor A_1 , a concentracions altes d'ADO (500 μM -1 mM) en preparacions tractades amb *d-tubocurare*, està associada a una disminució de l'entrada de Ca^{+2} a través dels canals tipus P/Q en la NMJ de ratolí (Silinsky, 2004).

En la NMJ de rates diversos estudis han descrit que els canals P/Q són els principals canals d'entrada del Ca^{+2} i reguladors de l'alliberació de transmissor en patrons de baixa freqüència d'estimulació (0.2-0.5 Hz) (Protti i Uchitel, 1993; Mynlieff i Beam, 1994; Santafé i cols., 2001). No obstant, tot i que, en estudis electrofisiològics previs en el grup s'ha observat que els VDCCs tipus L i N no són operatius en la neurotransmissió evocada, hi ha estudis que suggereixen que la inhabilitat de detectar el canal tipus N en els nervis terminals pot ser deguda a la presència de l'ADO endògena (Arlinghaus i Lee, 1996; Malinowski i cols., 1997) o bé, a l'ús del *d-tubocurarine* que altera l'alliberació de transmissor (Wilson i cols., 1995; Katz i cols., 1997). En experiments de trens d'estimulació de curta durada (registre de 6 EPPs a 1 i 25 Hz; seccionant les fibres musculars per prevenir la contracció *-cut-*) han observat una relació entre els VDCCs tipus N i el receptor A_1 . En aquestes condicions experimentals s'ha suggerit que els canals N són actius, i que l'ADO inhibeix l'alliberació evocada per la inhibició dels canals N, en la NMJ de rata (Schwartz i cols., 2003). A més, en estudis amb tècniques de radioisòtop per mesurar l'alliberació evocada de [^3H] acetilcolina han trobat una relació entre els VDCCs tipus L i P i el receptor A_{2A} dependent del paradigma d'estimulació (Correia-de-Sá i cols., 2000). Aquest estudis han mostrat que quan s'augmenta la durada de l'estímul (de 40 μs a 1 ms, a una freqüència de 5 Hz), l'efecte facilitatori de l'activació del receptor A_{2A} (amb el CGS-21680) contribueix a la mobilització del Ca^{+2} des dels reservoris interns, a més de la facilitació de l'entrada del Ca^{+2} a través del canal L. Els canals P que també es troben implicats (Correia-de-Sá i cols., 2000). Per un altre banda, també s'ha establert que l'activació del receptor A_3 , en la NMJ de ratolí, per la inosina produeix una inhibició de l'alliberació d'acetilcolina mitjançant la reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs del tipus P/Q, on es troba implicada la

PKC i la calmodulina en condicions en les quals s'ha alterat la maquinària sinàptica (**Cinalli i cols., 2013**).

En model neuromuscular d'amfibi, hi ha treballs que mostren que l'efecte inhibitori de l'ADO en l'alliberació evocada no està relacionat amb la reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través de l'entrada del canal N, s'ha suggerit que l'ADO exerceix la seva acció en un lloc distal del *locus* de l'entrada del Ca^{+2} (**Silinsky, 1984; Silinsky i Solsona, 1992; Redman i Silinsky, 1994; Huang i cols., 2002**).

9. PARTICIPACIÓ DELS RECEPTORS D'ADENOSINA EN DIFERENTS VIES DE SENYALITZACIÓ EN LA NEUROTRANSMISSIÓ ESPONTÀNIA

Segons els resultats obtinguts, s'ha mostrat que hi ha una possible relació dels receptors d'ADO amb les vies de senyalització muscaríniques, les serina/treonina quinases i els VDCCs en el control de la neurotransmissió evocada i una relació dels receptors d'ADO amb els mAChRs durant una activitat sinàptica repetitiva i esgotadora. A continuació, es discutirà la participació dels receptors d'ADO en les diferents vies de senyalització en el control de la neurotransmissió espontània.

9.1 Relació entre els receptors d'adenosina i els receptors muscarínics en la neurotransmissió espontània

Com s'ha vist, el mecanisme purinèrgic i el muscarínic intervenen de forma diferent en la neurotransmissió evocada i espontània. Tot i així, s'ha observat que hi ha una absoluta dependència dels receptors d'ADO i els mAChRs en la modulació de l'alliberació espontània, perquè la presència dels moduladors inespecífics de l'ADO o bé de la CADO (10 μ M) i la posterior inhibició inespecífica dels mAChRs, així com la situació inversa, no afecta a la freqüència dels mEPPs (veure **figura R.30** de l'apartat de *Resultats*). És a dir, en aquestes condicions el 8-SPT no pot fer la seva funció de potenciar l'alliberació espontània. Ni l'ADO, ni l'AT poden disminuir l'alliberació. Per tant, sembla haver una forta relació entre els receptors d'ADO i els mAChRs envers a l'alliberació espontània de l'acetilcolina. Però, aquesta dependència en condicions en les quals es força el mecanisme dels receptors d'ADO amb la CADO (10 μ M) és unidireccional, donat que l'AT en presència de la CADO s'evita l'efecte inhibitori produït per l'AT, de manera que en l'experiment recíproc això no succeeix. Aprofundint en aquest estudi, s'ha evidenciat que si els receptors d'ADO estan acoblats a la neurotransmissió espontània, els mAChRs (M1 i M2) necessiten funcionar

regularment, i viceversa. El que indica que hi ha una absoluta interdependència dels receptors d'ADO (A_1 i A_{2A}) amb els mAChRs (M1 i M2) per modular l'alliberació evocada i espontània (veure **figura D.3**). A l'observar-se que ni l'estimulació inespecífica de l'ADO (25 μ M), ni el bloqueig dels receptors d'ADO (amb el 8-SPT, el DPCPX i l'SCH-58261) i el posterior bloqueig selectiu del receptor M1 amb la PIR o bé del receptor M2 amb la MET, no modifiquen l'alliberació espontània. Es a dir, ni l'ADO, ni la PIR i ni la MET poden disminuir l'alliberació així com, ni el 8-SPT i ni el DPCPX poden augmentar l'alliberació espontània en aquestes condicions (veure **figura R.31** de l'apartat de *Resultats*).

Aquesta relació no és universal, atès que en el model neuromuscular d'amfibi no s'ha observat una relació funcional entre els mAChRs tipus M2 i els receptors d'ADO A_1 en el control de la neurotransmissió espontània ni en condicions fisiològiques ni despolaritzants. S'ha suggerit, que la oclusió entre els receptors M2 i A_1 pot ser deguda a una convergència de vies intracel·lulars activades per M2 i A_1 R on poden tenir un efector comú situat en una disminució de l'entrada de Ca^{+2} (**Shakirzyanova i cols., 2006**).

9.2 Relació entre els receptors d'adenosina i les serina/treonina quinases (PKA i PKC) en la neurotransmissió espontània

A diferència de l'alliberació evocada, els resultats han mostrat que possiblement no hi ha una relació funcional entre els receptors d'ADO i la PKA, perquè el comportament dels moduladors de l'activitat de la PKA (l'H-89 i el Sp-8-BrcAMP) són similars als obtinguts de manera independentment i en absència dels moduladors purinèrgics. Per tant, això indica que l'estat dels receptors d'ADO (inhibit o estimulat) no influeix en l'acoblament de l'activitat de la PKA en l'alliberació espontània (veure **figura R.32** de l'apartat de *Resultats*).

A la literatura es troben estudis que confirmen els nostres resultats. **De Lorenzo i col·laboradors al 2004** evidencien que l'activació del receptor A_1 amb l'agonista CCPA disminueix la freqüència dels mEPPs. Observen que la via de senyalització cAMP-PKA no participa directament en la modulació de la secreció espontània per l'ADO. Aquest fet es deu a que l'efecte del CCPA en presència de l'H-89 induïx una inhibició presinàptica similar a la donada en la situació control, encara que en estudis previs en el sistema neuromuscular, s'ha descrit que l'activació dels receptors A_1 estan acoblats a les proteïnes G no susceptibles a la toxina *pertussis* (classe $G_{i/o}$) (**Hamilton i Smith, 1991; Mynlieff i Beam, 1994**). L'activació de les proteïnes G_i per l'ADO pot causar una inhibició de la

transducció de la senyal adenilat ciclase-cAMP, promovent una inactivació dels VDCCs tipus L, com passa en altres cèl·lules (Ebersolt i cols., 1983; Linden, 1991; Zink i cols., 1995).

Els estudis que hem realitzat per la PKC en l'alliberació espontània evidencien que l'activació amb el potenciador PMA en presència dels agents purinèrgics (8-SPT, ADO (25 μ M), DPCPX i CGS-21680), produeixen una potenciació de l'alliberació espontània, però menor que el propi efecte del PMA en condicions control. No obstant, l'estimulació selectiva del receptor A_1 amb l'agonista selectiu CCPA i la posterior addició del PMA potencia l'alliberació espontània, però en aquest cas ho fa en major magnitud que la que ho fa el PMA en absència dels moduladors purinèrgics. Això, podria suggerir una possible relació entre els receptors d'ADO i l'activació de la PKC. A més, la inhibició selectiva del receptor A_{2A} amb l'antagonista SCH-58261 i la posterior activació de la PKC amb el PMA no modifica la freqüència dels mEPPs, donat que com prèviament s'ha vist el bloqueig del receptor A_{2A} no modifica la freqüència dels mEPPs al no participar en l'alliberació espontània (veure la [figura R.33](#) de l'apartat de *Resultats*).

A més, en el nostre laboratori s'ha descrit que per tal que la PKC pugui acoblar-se a l'alliberació evocada i pugui ser inhibida per la CaC s'han de donar diverses condicions. És necessari que el seu acoblament pugui ser induït (augmentant la concentració de Ca^{+2} (5 mM) en la solució fisiològica, durant una activitat continua a 1 Hz o bé amb l'estimulació del PMA (Santafé i cols., 2006, 2007; Besalduch i cols., 2010). Per tant, tal i com s'ha comentat en l'apartat dels *Resultats*, per fer l'estimació del contingut quàntic s'han registrat simultàniament els EPPs i els mEPPs en aquestes dues condicions d'acoblament en la neurotransmissió evocada (a 1 Hz i amb Ca^{+2}). No obstant, en aquestes condicions, el bloqueig de l'activitat de la PKC amb la CaC no modifica la freqüència dels mEPPs. Els resultats mostren que en condicions de continua activitat sinàptica (a 1 Hz), el bloqueig inespecífic previ amb l'antagonista 8-SPT i la posterior incubació amb la CaC augmenta lleugerament l'alliberació espontània de l'acetilcolina, mentre que la CaC en presència de l'ADO (25 μ M) no afecta a l'alliberació espontània. Per un altre banda, la inhibició amb el 8-SPT com l'estimulació amb l'ADO (25 μ M), en presència d'altres concentracions de Ca^{+2} , i la posterior incubació amb l'inhibidor CaC potencia la freqüència dels mEPPs (veure [figura R.34](#) de l'apartat de *Resultats*). Com es veu, es pot observar una diversitat de resultats tot i que són experiments similars però en condicions diferents: l'activitat continua a 1 Hz o l'alt Ca^{+2} . En el cas de l'alt Ca^{+2} , l'efecte prolongat d'aquest ió donat que està present en la solució fisiològica conjuntament amb la preincubació de la substància

purinèrgica, i l'alta concentració de Ca^{+2} utilitzada (5 mM, on possiblement és una concentració de Ca^{+2} superior que la que s'obté en condicions d'estímul continu a 1 Hz) pot preactivar a la PKC i fer augmentar l'alliberació espontània. A més, com s'ha vist en la **figura R.34** experimentalment el Ca^{+2} a les 3 hores pot augmentar l'alliberació espontània. Aleshores, es pot concloure, que l'augment en l'alliberació observat pel bloqueig de l'activitat de la PKC en presència dels moduladors purinèrgics en condicions d'alt Ca^{+2} és donat per la preactivació de la PKC amb el Ca^{+2} residual i no per la modulació dels receptors d'ADO. Possiblement, a diferència de la situació anterior, on s'ha evidenciat una relació funcional entre els receptor d'ADO i l'activació de la PKC, en aquestes condicions la concentració de Ca^{+2} és suficient per activar un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} que quan els PIRs es troben bloquejats o estimulats amb l'ADO, i l'activitat de la PKC es troba inhibida faci augmentar la freqüència dels mEPPs.

A diferència dels resultats exposats en aquesta tesi, hi ha altres autors que demostren que no hi ha una participació directa de la via PLC-PKC en la modulació de la secreció espontània per l'ADO. Aquest fet és degut a que la incubació prèvia amb el PMA o bé el bloqueig de la PKC amb l'inhibidor inespecífic l'H7, i la posterior incubació amb el CCPA induïx una disminució de l'alliberació. És a dir, l'activació o la inhibició de la PKC no té efecte en la depressió induïda pel CCPA (descrita per alguns autors), únicament els VDCCs del tipus L i a través d'un mecanisme que implica el Ca^{+2} -calmodulina (**De Lorenzo i cols., 2004**). Altres estudis electrofisiològics realitzats amb l'anàleg de la ADO (la CADO), postulen que l'acció inhibitoria de l'ADO no succeeix com a conseqüència de la inhibició de la PKA, ni del bloqueig de la PKC o la PKG. Si no que proposen que l'efecte inhibitori de l'anàleg de l'ADO en la freqüència dels mEPPs és degut a una disminució de l'habilitat del Ca^{+2} per promoure el procés d'exocitosi (**Silinsky, 1984, 1986; Silinsky i Solsona, 1992**) i no pel bloqueig de les serina/treonina quinases (PKA i PKC) (**Hirsh i Silinsky, 2002**). En canvi, en un altre treball publicat recentment, s'ha vist que el metabòlit de l'ADO, la inosina, pot induir una inhibició de l'alliberació espontània per l'activació del receptor A_3 , i que la PKC pot estar implicada en l'acció d'aquest nucleòsid en la NMJ de ratolí (**Cinalli i cols., 2013**).

En el model neuromuscular d'amfibi, s'ha trobat una possible implicació entre la PKC i l'efecte inhibitori descrit per l'ADO. En presència dels inhibidors de la PKC *polymixin B* o bé l'H7, l'ADO ($5 \cdot 10^{-5}$ M) i l'estable anàleg PIA (de l'anglès *phenylisopropyladenosine*) significativament augmenta l'alliberació espontània d'acetilcolina. Inclús, quan la PKC està activada per l'OAG (de l'anglès *1-oleoyl-2-acetyl-*

sn-glycerol) o bé pel PMA, on l'alliberació es troba més augmentada, l'ADO encara pot inhibir l'alliberació. A més, l'ADA augmenta l'alliberació de transmissor significativament induïda per l'activació de la PKC (Brănișteanu i cols., 1989).

9.3 Relació entre els receptors d'adenosina i els canals calci dependents de voltatge (VDCCs) en la neurotransmissió espontània

Com anteriorment s'ha mencionat, l'activitat sinàptica depèn del flux de Ca^{+2} a través dels VDCCs (Katz i Miledi, 1970). Els resultats mostren que hi ha una dependència entre els PIRs i els VDCCs tipus P/Q i amb l'entrada de Ca^{+2} . Aquest fet es deu a que l'ADO en presència del bloquejador dels canals P/Q no modifica la freqüència dels mEPPs, és a dir, l'ADO no pot inhibir l'alliberació espontània. Aquesta relació es confirma en un experiment addicional realitzat en el nostre laboratori. S'ha observat que el bloqueig previ de tots els receptors d'ADO amb l'antagonista 8-SPT (100 μ M) i la segona incubació amb l' ω -Aga IVA induïx una disminució de l'alliberació espontània (% de disminució: 47.2 ± 5.87 ; $P < 0.05$, $n = 3$ músculs i un mínim de 15 fibres per múscul) quan l' ω -Aga IVA no modifica la freqüència dels mEPPs en absència dels moduladors purinèrgics i en presència de l'ADO. A més, altres experiments realitzats en presència de Mg^{+2} (0.5-1 mM) per disminuir l'entrada de Ca^{+2} en el terminal nerviós, evidencien que els receptors d'ADO depenen de l'entrada de Ca^{+2} . Aquest fet es deu a que l'ADO (25 μ M) en presència del Mg^{+2} no pot inhibir l'alliberació espontània d'acetilcolina, inclús a la concentració més alta utilitzada de Mg^{+2} l'efecte inhibitori de l'ADO (prèviament descrit) es torna facilitatori (veure figura R.35 de l'apartat de *Resultats*).

Per tant, es confirma la premissa de l'apartat anterior, que suggereix la possibilitat d'un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} . Aquest mecanisme fa que quan els PIRs es troben, com en aquest cas, estimulats per l'ADO o bé en presència de Mg^{+2} així com, en condicions de baixa entrada de Ca^{+2} en el terminal nerviós (degut al bloqueig dels VDCCs, en el cas de l'apartat anterior) es dona un augment de l'alliberació espontània. El que indica que probablement, la funció conservativa dels PIRs (principalment del A_1R) limitant l'alliberació espontània depèn dels canals P/Q i de l'entrada del Ca^{+2} .

Segons la bibliografia publicada, s'ha descrit que la secreció espontània no està relacionada amb l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs tipus P/Q, però sí amb els canals tipus L i N (Losavio i Muchnik, 1997). Amb el potencial de membrana en repòs, aquests canals s'obren estocàsticament, els quals permeten l'entrada del Ca^{+2} en el nervi terminal i la fusió d'una vesícula a la membrana presinàptica. Un mecanisme plausible és que l'ADO

redueixi l'entrada del Ca^{+2} a través dels VDCCs associats amb la secreció espontània, com succeeix amb l'alliberació evocada en el mamífer (**De Lorenzo i cols., 2004**). Així mateix, analitzant la literatura, a diferència d'aquest treball, han observat que l'ús d'agonistes selectius dels receptors d'ADO modulen la neurotransmissió espontània, s'ha suggerit que aquest efecte té una relació amb els VDCCs o bé amb l'entrada de Ca^{+2} en la NMJ de ratolí. A més hi ha autors que han observat, a diferència d'aquest treball, que l'efecte inhibitori del receptor A_1 activat per l'agonista CCPA és multimodal. Per una banda, depèn de la modulació dels VDCCs del tipus L a través d'un mecanisme relacionat amb el Ca^{+2} -calmodulina (sent independent de la inhibició directa de la PKA o de l'activació de la PKC en condicions normals), donat que la incubació amb nitrendipina redueix l'alliberació espontània i evita la inhibició del CCPA descrita per alguns autors. I en segon lloc, en una situació on la freqüència dels mEPPs és augmentada, per una exposició del nervi terminal a altes concentracions externes de K^+ (condicions despolaritzants), el CCPA inhibeix la freqüència dels mEPPs per una reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs tipus P/Q. S'ha suggerit que en condicions d'altres concentracions de K^+ , l'activació del receptor A_1 per l'ADO endògena evita l'excessiva alliberació de neurotransmissor (**De Lorenzo i cols., 2004**). Per un altre banda, en una situació on el nervi terminal està exposat a solucions hipertòniques on hi ha un augment marcat en l'alliberació espontània (**Fatt i Katz, 1952; Hubbard i cols., 1968; Doherty i cols., 1986; Brosius i cols., 1992; Yu i Miller, 1995; Rosenmund i Stevens, 1996; Mochida i cols., 1998**) i aquest augment no és dependent del Ca^{+2} (**Furshpan, 1956; Hubbard i cols., 1968; Quastel i cols., 1971; Kita i Van der Kloot, 1977**). En aquestes condicions és necessari la prevenció de la contracció violenta induïda per l'exposició d'aquest tipus de solució, mitjançant l'aplicació de la substància tetrodoxina a la solució. S'ha evidenciat una acció inhibitoria donada pel CCPA a través d'un mecanisme independent del Ca^{+2} en el procés d'exocitosi d'acetilcolina conclouent que es dona per una afectació de les proteïnes que estan relacionades amb la fusió de les vesícules sinàptiques (sinaptibrevina, SNAP-25, syntaxina, sinaptotagmina o altres) (**Silinsky, 2005; Veggetti i cols., 2008**). S'ha suggerit que l'ADO acumulada en la fenedura sinàptica en la resposta hipertònica pugui exercir una acció modulatòria en l'alliberació espontània de neurotransmissor (**Veggetti i cols., 2008**). És possible que l'alliberació espontània pugui tenir una maquinària molecular separada del complex SNARE relacionat amb l'alliberació ràpida sincrònica i la resposta ràpida hipertònica (**Veggetti i cols., 2008**).

En el cas del receptor A_{2A} , a diferència del nostre treball, alguns autors han descrit que l'activació d'aquest receptor amb l'agonista específic CGS-21680 és el resultat

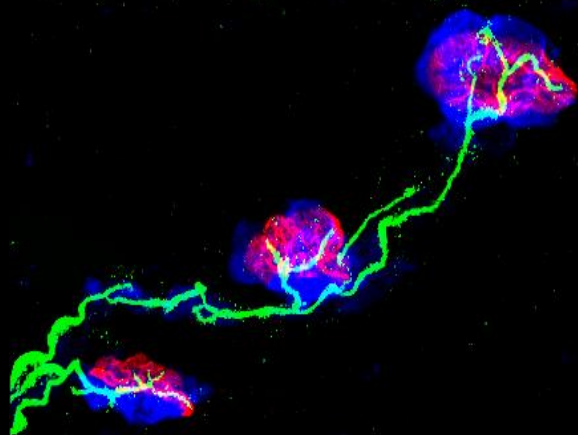
d'un augment de la concentració de Ca^{+2} citosòlic del nervi terminal provinent dels reservoris interns sensibles a *thapsigargin/ryanodine*. Contràriament, el reclutament del Ca^{+2} del *pool* extern no contribueix a l'efecte excitatori. L'augment de la freqüència dels mEPPs induït pel CGS-21680, descrit per alguns autors, no s'ha observat en aquest treball. Per un altre banda, en un altre estudi s'ha observat que la freqüència dels mEPPs roman inalterada amb el bloqueig dels VDCCs amb el bloquejador universal cadmi (Cd^{+2}) o amb l'eliminació del Ca^{+2} extracel·lular (amb el 0 Ca^{+2} -EGTA-EGTA de l'anglès *ethylene glycol-bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid*). Així mateix, el bloqueig selectiu dels canals P/Q i L no afecten a l'acció facilitatòria d'aquest agonista; s'ha suggerit que l'agonista del receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ facilita la secreció a través del flux d'entrada del Ca^{+2} (Palma i cols., 2011). En una situació diferent, en condicions despolaritzants (en presència d'altres concentracions de K^{+}), l'activació del receptor $\text{A}_{2\text{A}}$ pel CGS-21680 és possible que augmenti un canvi conformacional en el canal L que generaria un moviment de càrregues en la intramembrana, la qual podria obrir els receptors de rianodina (de l'anglès *ryanodine receptor*) permetent l'alliberació del Ca^{+2} al citosol i facilitant l'exocitosi.

En uns altres estudis més recents, els de Cinalli i laboradors al 2013, han mostrat que l'activació del receptor A_3 amb el metabòlit inosina interfereix per un mecanisme depenent del Ca^{+2} . La incubació amb el Cd^{+2} evita l'acció inhibidòria de la inosina. S'ha proposat que la inhibició de l'alliberació espontània és per la reducció de l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCC del tipus L. El bloqueig selectiu del canal P/Q com l'eliminació del Ca^{+2} extracel·lular (amb el 0 Ca^{+2} -EGTA) en presència de K^{+} evita l'acció de la inosina indicant una possible associació amb l'entrada de Ca^{+2} a través dels VDCCs tipus P/Q en aquestes condicions (Cinalli i cols., 2013).

En resum, els resultats evidencien que els receptors d'ADO no es troben acoblats a l'alliberació evocada quan la funció sinàptica està preservada i operativa. S'ha observat que quan es força el mecanisme purinèrgic amb l'efecte prolongat de la CADO (10 μM) s'indueix una disminució de l'alliberació evocada degut a un treball col·laboratiu dels receptors A_1 i $\text{A}_{2\text{A}}$. Per un altre banda, s'ha evidenciat que els receptors d'ADO estan involucrats en la modulació de l'alliberació espontània. Sembla ser que l'ADO endògena ajuda a limitar l'alliberació espontània a través del receptor A_1 . No obstant, si es força el mecanisme purinèrgic amb la CADO a baixes concentracions es produeix un augment de la freqüència dels mEPPs donat per un treball col·laboratiu dels receptors A_1 i $\text{A}_{2\text{A}}$. Així

mateix, s'ha demostrat que els receptors d'ADO cooperen en la modulació de la depressió sinàptica. En condicions d'activitat sinàptica moderada (trens 40 Hz durant 2 minuts) l'ADO exògena té un efecte protector degut al treball col·laboratiu de dos o més receptors d'ADO. A més, s'ha observat que en aquestes condicions la CADO (10 μ M) té l'habilitat de reduir la depressió (en menor magnitud que l'ADO exògena). Aquest efecte protector és a través del receptor A_1 on el receptor A_{2A} sembla tenir un cert paper modulador sobre el receptor A_1 . En canvi en condicions d'altra freqüència d'estímul, l'ADO produïda en la fenedura sinàptica durant els trens (100 Hz durant 2 minuts) és suficient per reduir la depressió a través del receptor A_1 , mentre que el receptor A_{2A} sembla modular la resposta del receptor A_1 . Per un altre banda, els receptors purinèrgics es comporten com moduladors d'altres vies de senyalització. En aquest treball s'ha mostrat que els receptors d'ADO i els mAChRs tenen una mútua dependència en la modulació de l'alliberació evocada, espontània i cooperen en el control de la depressió promovent canvis específics en l'activitat de la PKA i la PKC. A més, s'ha evidenciat una dependència dels receptors d'ADO amb la PKA i la PKC en l'alliberació evocada i espontània (excepte per la PKA). L'acoblament de la PKC en l'alliberació evocada depèn de la modulació dels receptors d'ADO, donat que la PKC necessita un equilibri normal dels receptors d'ADO. Per últim, s'ha evidenciat una relació dels receptors d'ADO amb el bloqueig dels VDCCs tipus P/Q en l'alliberació evocada i espontània, aquesta última depenent de l'entrada de Ca^{+2} . De fet, s'ha vist que la funció complementària en l'alliberació espontània, evocada i l'activitat-dependent de l'alliberació d'acetilcolina d'aquests receptors presinàptics i quinases poden modular els VDCCs i el *pool* de vesícules sinàptiques llestes per a ser alliberades, les quals són l'instrument de la neurotransmissió (Takamori i cols., 2012). L'entrada de Ca^{+2} és requerida per desencadenar l'exocitosi depenent del Ca^{+2} que sembla estar promoguda per l'activació dels receptors presinàptics mAChRs i del receptor TrkB (Santafé i cols., 2006; Amaral i Pozzo-Miller, 2012). La funció adequada dels mAChRs està modulada per l'ADO coalliberada amb l'acetilcolina en la NMJ (Oliveira i cols., 2009) i el TrkB (Garcia i cols., 2010). Les vies dels mAChRs i del TrkB comparteixen una connexió a través de la PLC, del DAG i de la PKC, la qual promou la modulació dels canals P/Q. Una reducció de l'entrada del Ca^{+2} podria reduir la l'alliberació de transmissor i d'aquesta manera la depressió.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. Els receptors d'adenosina estan localitzats en la sinapsi neuromuscular.

1.1 Tots els receptors d'adenosina s'expressen en el múscul LAL. Els receptors A_1 , A_{2B} i A_3 són més abundants en l'adult, mentre que el receptor A_{2A} és més abundant en el múscul estriat neonatal.

1.2 Tots els receptors d'adenosina són presents en la NMJ, estan localitzats de manera diferent en les tres cèl·lules que configuren la NMJ (múscul, nervi i cèl·lula de Schwann). Aquesta és la seva distribució:

1.2.1 El receptor A_1 es localitza en el terminal nerviós i en la cèl·lula de Schwann terminal, mentre que el receptor A_{2A} està present en la cèl·lula muscular postsinàptica, en l'axó i en el terminal nerviós en la NMJ neonatal i adulta.

1.2.2 Els receptors A_{2B} i A_3 estan presents en el terminal nerviós i la cèl·lula muscular postsinàptica, en el cas del receptor A_3 la localització postsinàptica també inclou el sarcoplasma, sota els AChRs. Ni el receptor A_{2B} ni el receptor A_3 es localitzen en la cèl·lula de Schwann.

2. Els receptors d'adenosina estan involucrats en l'alliberació d'acetilcolina evocada (1 Hz) i espontània.

2.1 Els receptors d'adenosina no estan acoblats a la modulació de l'alliberació d'acetilcolina evocada en condicions basals quan la funció sinàptica està preservada (bloqueig de la contracció muscular amb μ -CgTx GIIIB).

2.2 Els receptors d'adenosina semblen estar implicats en l'alliberació espontània quan els dos receptors A_1 i A_{2A} estan treballant junts. Però, el receptor A_1 pot per si mateix fer aquesta acció.

2.3 La prolongada estimulació dels receptors d'adenosina amb l'agonista no metabolitzable CADO (10 μ M) promou una reducció del contingut quàntic i augmenta la freqüència dels mEPPs a concentracions submicromolars degut a un treball col·laboratiu entre els receptors A_1 i A_{2A} .

3. Els receptors d'adenosina no estan involucrats en els *pair pulses* de les sinapsis neuromusculars, atès que cap dels moduladors purinèrgics emprats en aquesta tesi pot modular les seves característiques.

4. Els receptors d'adenosina participen en el control de la depressió a freqüències d'estimulació moderades de 40 Hz.

4.1 L'addició de l'adenosina exògena té un efecte protector reduint la magnitud de la depressió a freqüències moderades (40 Hz) donat a un treball col·laboratiu entre els receptors A_1 i A_{2A} . Pel contrari, el complet bloqueig dels receptors d'adenosina augmenta la depressió. L'acció de l'adenosina endògena és emmascarada per altres processos sinàptics.

4.2 La CADO a concentracions micromolars té l'habilitat de reduir la magnitud de la depressió. Aquest efecte protector pot ser a través del receptor A_1 , i el receptor A_{2A} pot tenir un efecte oposat.

5. Els receptors d'adenosina participen en el control de la depressió a altes freqüències d'estimulació a 100 Hz.

5.1 Ni l'adenosina exògena ni el bloqueig complet dels receptors d'adenosina tenen efecte a altes freqüències d'estimulació (100 Hz).

5.2 L'adenosina endògena pot protegir la depressió a través de l'estimulació del receptor A_1 , principalment, durant una intensa activitat repetitiva, mentre que el receptor A_{2A} sembla modular la resposta del receptor A_1 .

6. Existeix una interacció entre els receptors d'adenosina i els mAChRs, PKA, PKC i VDCCs en la neurotransmissió.

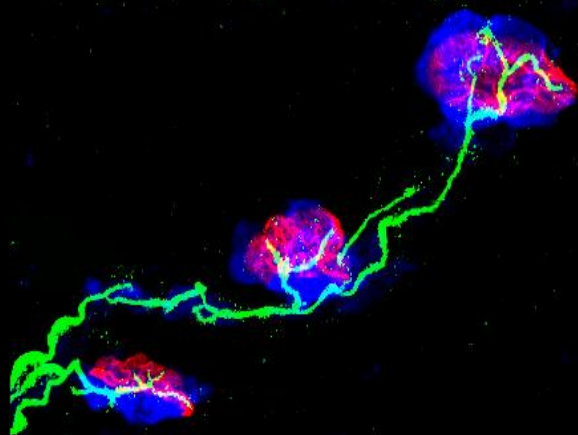
6.1 Hi ha una absoluta i mútua dependència entre els receptors d'adenosina i els mAChRs en la modulació de l'alliberació d'acetilcolina evocada i espontània. Inclús, amb l'efecte prolongat de la CADO (10 μ M) en l'alliberació evocada d'acetilcolina, encara que la CADO (10 μ M) té una dependència unidireccional en l'alliberació espontània. A més, el mecanisme purinèrgic i muscarínic cooperen en el control de la depressió (a 40 Hz), encara que el control purinèrgic sembla ser més fort que el mecanisme muscarínic.

6.2 Hi ha una interacció entre els receptors d'adenosina i la PKA en l'alliberació evocada, però no hi ha interacció en l'alliberació espontània.

6.3 L'activitat d'acoblament de la PKC a l'alliberació evocada d'acetilcolina necessita un equilibri normal dels receptors d'adenosina. Pel contrari, hi ha una interacció entre l'estimulació del receptor d'adenosina A_1 amb l'activació de la PKC en l'alliberació espontània. Pel contrari, hi ha una activació d'un mecanisme paral·lel dependent del Ca^{+2} que quan els PIRs es troben bloquejats o estimulats amb l'adenosina, i l'activitat de la PKC es troba inhibida fa augmentar la freqüència dels mEPPs.

6.4 Hi ha una dependència entre els receptors d'adenosina i els VDCCs tipus P/Q en l'alliberació evocada i l'espontània amb una dependència de l'entrada de Ca^{+2} .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Conclusions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

1. Adenosine receptors are located at the neuromuscular synapse.

1.1 All adenosine receptors are expressed in LAL muscle. A_1 , A_{2B} and A_3 receptors are more abundant in adults whereas the A_{2A} receptor is more abundant in the newborn striatal muscle.

1.2 All adenosine receptors are present at the NMJ, they are differentially localized in the three cells (muscle, nerve and Schwann cell) that configure the NMJ. They are distributed like this:

1.2.1 A_1 receptor is localized at the nerve terminal and terminal Schwann cell whereas the A_{2A} receptor is present in the postsynaptic muscle, in the axon and nerve terminal of the newborn and adult NMJ.

1.2.2 Both A_{2B} and A_3 receptors are present in the nerve terminal and postsynaptic muscle cell, in A_3R case the postsynaptic localization also includes the sarcoplasm, under the AChRs. Neither A_{2B} nor A_3 receptors are localized in Schwann cells.

2. Adenosine receptors are involved in evoked (1 Hz) and spontaneous release.

2.1 Adenosine receptors are not coupled to evoked acetylcholine release modulation in resting conditions when the machinery release is preserved (blocking muscle contraction with μ -CgTx GIIIB).

2.2 Adenosine receptors seem to be involved in spontaneous release when both A_1 and A_{2A} receptors are working together. But, A_1R can do this action by itself.

2.3 Prolonged stimulation of adenosine receptors with non-metabolizable agonist CADO (10 μ M) leads to reduced quantal content and increases the mEPPs frequency at submicromolar concentrations by a collaborative work between A_1 and A_{2A} receptors.

3. Adenosine receptors are not involved in pair pulses at the neuromuscular synapse, because neither purinergic modulators used in this thesis can modulate their characteristics.

4. Adenosine receptors are involved in the control of depression at the moderate frequency of stimulation of 40 Hz.

4.1 The addition of exogenous adenosine has a protective effect reducing the magnitude of depression at moderate frequency (40 Hz) due to some collaborative work between A₁ and A_{2A} receptors. In reverse, full blockage of all adenosine receptors increase the depression. The action of endogenous adenosine is masked by other synaptic processes.

4.2 CADO at micromolar concentration has some ability to reduce depression magnitude. This protective effect can be mediated by A₁ receptor. A_{2A} receptor can have opposite effects.

5. Adenosine receptors are involved in the control of depression at the high frequency of stimulation of 100 Hz.

5.1 Neither the additional exogenous adenosine nor the full block of adenosine receptors have any effect at a high frequency (100 Hz) of stimulation.

5.2 Endogenous adenosine can protect the depression through A₁ receptor stimulation, mainly, during an intense repetitive activity, whereas A_{2A} receptor seems to modulate the A₁ receptor response.

6. There is a relationship between adenosine receptors and mAChRs, PKA, PKC and VDCCs in the neurotransmission.

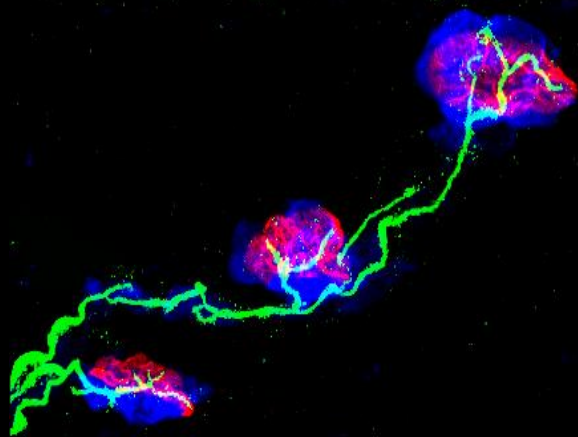
6.1 There is an absolute and mutual dependence between adenosine receptors and mAChRs in the modulation of evoked and spontaneous acetylcholine release. Even with the prolonged effect of CADO (10 μM) in evoked acetylcholine release, although CADO (10 μM) has unidirectional dependence in spontaneous release. In addition, the purinergic and muscarinic mechanism cooperate in the control of depression (at 40 Hz), although the purinergic control seems to be more powerful than the muscarinic one.

6.2 There is an interaction between adenosine receptors and PKA in evoked release, but there are no interactions in spontaneous release.

6.3 The activity coupling of PKC to evoked acetylcholine release normally needs a balance of adenosine receptors. In contrast, there is a possible interaction between adenosine A₁ receptor stimulation with PKC activation in spontaneous release. On the contrary, there is a parallel Ca⁺²-dependent mechanism that when PIRs are blocked or stimulated with adenosine, and the PKC activity is inhibited it may cause an increase in mEPPs frequency.

6.4 There is a dependency between adenosine receptors and VDCCs subtypes P/Q in evoked and spontaneous release with a Ca⁺² input dependence.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Bibliografia/

Bibliography

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

A

- Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & Therapeutics*, 64(3), 445–75.
- Abbracchio, M. P., Brambilla, R., Ceruti, S., Kim, H. O., von Lubitz, D. K., Jacobson, K. A., & Cattabeni, F. (1995). G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A₃ receptors in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 48(6), 1038–45.
- Abbs, E. T., & Joseph, D. N. (1981). The effects of atropine and oxotremorine on acetylcholine release in rat phrenic nerve-diaphragm preparations. *British Journal of Pharmacology*, 73(2), 481–3.
- Accorsi-Mendonça, D., Zoccal, D. B., Bonagamba, L. G. H., & Machado, B. H. (2013). Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats. *Physiological Reports*, 1(4), n/a–n/a.
- Adámek, S., Shakirzyanova, A. V., Malomouzh, A. I., Naumenko, N. V., & Vyskočil, F. (2010). Interaction of glutamate- and adenosine-induced decrease of acetylcholine quantal release at frog neuromuscular junction. *Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(5), 803–10.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73–120.
- Allaman, I., Lengacher, S., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2003). A_{2B} receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 696–704.
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76–87.
- Allen, T. G., & Brown, D. A. (1993). M2 muscarinic receptor-mediated inhibition of the Ca²⁺ current in rat magnocellular cholinergic basal forebrain neurones. *The Journal of Physiology*, 466, 173–89.
- Allen, T. G. (1999). The role of N-, Q- and R-type Ca²⁺ channels in feedback inhibition of ACh release from rat basal forebrain neurones. *The Journal of Physiology*, 515 Pt 1, 93–107.
- Amaral, M. D., & Pozzo-Miller, L. (2012). Intracellular Ca²⁺ stores and Ca²⁺ influx are both required for BDNF to rapidly increase quantal vesicular transmitter release. *Neural Plasticity*, 2012, 203536.
- Angaut-Petit, D., Molgo, J., Connold, A. L., & 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. *Neuroscience Letters*, 82(1), 83–8.

Bibliografia/Bibliography

- Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Del Tacca, M., & Blandizzi, C. (2008). Regulation of enteric functions by adenosine: pathophysiological and pharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, *120*(3), 233–53.
- Antonioli, L., Fornai, M., Awwad, O., Giustarini, G., Pellegrini, C., Tuccori, M., Caputi, V., Qesari, M., Castagliuolo, I., Brun, P., Giron, M. C., Blandizzi, C., & Colucci, R. (2014). Role of the A_{2B} receptor-adenosine deaminase complex in colonic dysmotility associated with bowel inflammation in rats. *British Journal of Pharmacology*, *171*(5), 1314–29.
- Arch, J. R., & Newsholme, E. A. (1978). The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays in Biochemistry*, *14*, 82–123.
- Arendash, G. W., Mori, T., Cao, C., Mamcarz, M., Runfeldt, M., Dickson, A., Rezai-Zadeh, K., Tane, J., Citron, B. A., Lin, X., Echeverria, V., Potter, H. (2009). Caffeine reverses cognitive impairment and decreases brain amyloid-beta levels in aged Alzheimer's disease mice. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *17*(3), 661–80.
- Arenson, M. S. (1989). Muscarinic inhibition of quantal transmitter release from the magnesium-paralysed frog sartorius muscle. *Neuroscience*, *30*(3), 827–36.
- Arévalo, J. C., Waite, J., Rajagopal, R., Beyna, M., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., & Chao, M. V. (2006). Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron*, *50*(4), 549–59.
- Arlinghaus, L., & Lee, K. S. (1996). Endogenous adenosine mediates the sustained inhibition of excitatory synaptic transmission during moderate hypoxia. *Brain Research*, *724*(2), 265–8.
- Ashkenazi, A., Winslow, J. W., Peralta, E. G., Peterson, G. L., Schimerlik, M. I., Capon, D. J., & Ramachandran, J. (1987). An M₂ muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science (New York, N.Y.)*, *238*(4827), 672–5.
- Ashkenazi, A., Peralta, E. G., Winslow, J. W., Ramachandran, J., & Capon, D. J. (1989). Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell*, *56*(3), 487–93.
- Atchison, W. D. (1989). Dihydropyridine-sensitive and -insensitive components of acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *251*(2), 672–8.
- Auchampach, J. A., Kreckler, L. M., Wan, T. C., Maas, J. E., Hoeven, D. Van Der, Gizewski, E., Narayanan, J., & Maas, G. E. (2009). Characterization of the A_{2B} Adenosine Receptor from Mouse, Rabbit, and Dog. *329*(1), 2–13.
- Auld, D. S., & Robitaille, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and

activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 9(2), 144–57.

B

- Bajjalieh, S. M., & Scheller, R. H. (1995). The biochemistry of neurotransmitter secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 1971–4.
- Baker, M. D. (2002). Electrophysiology of mammalian Schwann cells. *Progress in Biophysics & Molecular Biology Review*, 78, 83–103.
- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(2), 180–90.
- Baldwin, Stephen A., Beal, P. R., Yao, S. Y. M., Young, J. D., King, A. E., & Cass, C. E. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), 735–743.
- Balice-Gordon, R. J. (1996). Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Current Biology: CB*, 6(9), 1054–6.
- Banks, G. B., Fuhrer, C., Adams, M. E., & Froehner, S. C. (2003). The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: Requirement for rapsyn and the utrophin/dystrophin-associated complex. *Journal of Neurocytology*, 32(5-8), 709–726.
- Barradeau, S., Imaizumi-Scherrer, T., Weiss, M. C., & Faust, D. M. (2002). Intracellular targeting of the type-1 alpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12(6), 235–41.
- Barrington, W. W., Jacobson, K. A., & Stiles, G. L. (1990). Glycoprotein nature of the A₂-adenosine receptor binding subunit. *Molecular Pharmacology*, 38(2), 177–83.
- Barry, S. R. (1990). Adenosine depresses spontaneous transmitter release from frog motor nerve terminals by acting at an A₁-like receptor. *Life Sciences*, 46(19), 1389–97.
- Bastidas, A. C., Wu, J., & Taylor, S. S. (2015). Molecular Features of Product Release for the PKA Catalytic Cycle. *Biochemistry*, 54(1):2-10.
- Baumgartner, R., Umlauf, E., Veitinger, M., Guterres, S., Rappold, E., Babeluk, R., Mitulović, G., Oehler, R., Zellner, M. (2013). Identification and validation of platelet low biological variation proteins, superior to GAPDH, actin and tubulin, as tools in clinical proteomics. *Journal of Proteomics*, 94, 540–51.
- Baxter, R. L., Vega-Riveroll, L. J., Deuchars, J., & Parson, S. H. (2005). A_{2A} adenosine receptors are located on presynaptic motor nerve terminals in the mouse. *Synapse (New York, N.Y.)*, 57(4), 229–34.
- Bean, B. P. (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends in*

Bibliografia/Bibliography

- Pharmacological Sciences*, 13(3), 87–90.
- Bennett, M. K., Calakos, N., Kreiner, T., & Scheller, R. H. (1992a). Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex. *The Journal of Cell Biology*, 116(3), 761–75.
- Bennett, M. K., Calakos, N., & Scheller, R. H. (1992b). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5067), 255–9.
- Besalduch, N. (2009). Tesi doctoral. Serina/treonina quinases a la sinapsi neuromuscular: especialització de les isoformes de la proteïna quinasa C. Universitat Rovira i Virgili.
- Besalduch, N., Tomàs, M., Santafé, M. M., Garcia, N., Tomàs, J., & Lanuza, M. A. (2010). Synaptic activity-related classical protein kinase C isoform localization in the adult rat neuromuscular synapse. *Journal of Comparative Neurology*, 518(2), 211–228.
- Besalduch, N., Lanuza, M. A., Garcia, N., Obis, T., Santafé, M. M., Tomàs, M., Priego, M., & Tomàs, J. (2013). Cellular localization of the atypical isoforms of protein kinase C (α PKC ζ /PKM ζ and α PKC λ /I) on the neuromuscular synapse. *Neuroscience Letters*, 556, 166–9.
- Betz, W. J. (1970). Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, 206(3), 629–44.
- Bibel, M., & Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & Development*, 14(23), 2919–37.
- Biber, K., Klotz, K. N., Berger, M., Gebicke-Härter, P. J., & van Calker, D. (1997). Adenosine A₁ receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 4956–64.
- Birnbaumer, L., Campbell, K. P., Catterall, W. A., Harpold, M. M., Hofmann, F., Horne, W. A., Mori, Y., Schwartz, A., Snutch, T. P., & Tanabe, T. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 13(3), 505–6.
- Bogenpohl, J. W., Ritter, S. L., Hall, R. A., & Smith, Y. (2012). Adenosine A_{2A} receptor in the monkey basal ganglia: ultrastructural localization and colocalization with the metabotropic glutamate receptor 5 in the striatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(3), 570–89.
- Boulanger, L. M., Boulanger, L., & Poo, M. M. (1999). Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nature Neuroscience*, 2(4), 346–51.
- Bowersox, S. S., Miljanich, G. P., Sugiura, Y., Li, C., Nadasdi, L., Hoffman, B. B., Ramachandran, J., & Ko, C. P. (1995). Differential blockade of voltage-sensitive calcium channels

- at the mouse neuromuscular junction by novel omega-conopeptides and omega-agatoxin-IVA. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273(1), 248–56.
- Brand, A., Vissienon, Z., Eschke, D., & Nieber, K. (2001). Adenosine A(1) and A(3) receptors mediate inhibition of synaptic transmission in rat cortical neurons. *Neuropharmacology*, 40(1), 85–95.
- Brănișteanu, D. D., Covic, A., Brailoiu, E., Serban, D. N., & Haulica, I. D. (1989). Adenosine effects upon the spontaneous quantal transmitter release at the frog neuromuscular junction in the presence of protein kinase C-blocking and -activating agents. *Neuroscience Letters*, 98(1), 96–100.
- Broadie, K. S. (1995). Genetic dissection of the molecular mechanisms of transmitter vesicle release during synaptic transmission. *Journal of Physiology, Paris*, 89(2), 59–70.
- Broch, O. J., & Ueland, P. M. (1980). Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 35(2), 484–8.
- Brooke, R. E., Deuchars, J., & Deuchars, S. a. (2004). Input-specific modulation of neurotransmitter release in the lateral horn of the spinal cord via adenosine receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(1), 127–37.
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5059), 1021–5.
- Brosius, D. C., Hackett, J. T., & Tuttle, J. B. (1992). Ca(2+)-independent and Ca(2+)-dependent stimulation of quantal neurosecretion in avian ciliary ganglion neurons. *Journal of Neurophysiology*, 68(4), 1229–34.
- Burden, S. (1977). Development of the neuromuscular junction in the chick embryo: the number, distribution, and stability of acetylcholine receptors. *Developmental Biology*, 57(2), 317–29.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic Receptors. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones. A Multidisciplinary Approach*. ed. Straub R.W. & Bollis L. New York. Raven Press, 107–118.
- Burnstock, G., & King, B. F. (1996). Numbering of cloned P2 purinoceptors. *Drug Development Research*, 38(1), 67–71.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(12), 1471–83.
- Byrne, J. H., & Kandel, E. R. (1996). Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(2), 425–35.

C

- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D. C. G., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Luján, R., & Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A_{2A} receptors form higher-order oligomers in living cells. *Journal of Neurochemistry*, 109(5), 1497–507.
- Cacciari, B., Pastorin, G., Bolcato, C., Spalluto, G., Bacilieri, M., & Moro, S. (2005). A_{2B} adenosine receptor antagonists: recent developments. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(12), 1053–60.
- Calakos, N., & Scheller, R. H. (1996). Synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular description. *Physiological Reviews*, 76(1), 1–29.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S., Ferré, S., Lluís, C., Bouvier, M., & Franco, R. (2003). Adenosine A_{2A}-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46741–9.
- Canas, P. M., Duarte, J. M. N., Rodrigues, R. J., Köfalvi, A., & Cunha, R. A. (2009). Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 30(11), 1877–84.
- Cao, C., Cirrito, J. R., Lin, X., Wang, L., Verges, D. K., Dickson, A., Mamcarz, M., Zhang, C., Mori, T., Arendash, G. W., Holtzman, D. M., & Potter, H. (2009). Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 17(3), 681–97.
- Carman, A. J., Mills, J. H., Krenz, A., Kim, D.-G., & Bynoe, M. S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(37), 13272–80.
- Carreira, M. C., Camiña, J. P., Díaz-Rodríguez, E., Alvear-Perez, R., Llorens-Cortes, C., & Casanueva, F. F. (2006). Adenosine does not bind to the growth hormone secretagogue receptor type-1a (GHS-R1a). *The Journal of Endocrinology*, 191(1), 147–57.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casadó, V., Lluís, C., Goldberg, S. R., Moratalla, R., Franco, R., & Ferré, S. (2007). Striatal adenosine A_{2A} and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249–59.
- Castonguay, A., Lévesque, S., & Robitaille, R. (2001). Glial cells as active partners in synaptic functions. *Progress in Brain Research*, 132, 227–40.

- Catterall, W. A. (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annual Review of Biochemistry*, *64*, 493–531.
- Catterall, W. A. (1999a). Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *868*, 144–59.
- Catterall, W. A. (1999b). Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs. *Advances in Neurology*, *79*, 441–56.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*, 521–55.
- Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, *58*(3), 319–79.
- Caulfield, M. P., & Birdsall, N. J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*, *50*(2), 279–90.
- Chen, J.-F. (2014). Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *International Review of Neurobiology*, *119*, 257–307.
- Chen, W. C., Xue, H. Z., Hsu, Y. L., Liu, Q., Patel, S., & Davis, R. L. (2011). Complex distribution patterns of voltage-gated calcium channel α -subunits in the spiral ganglion. *Hearing Research*, *278*(1-2), 52–68.
- Chen, Y. Y., McDonald, D., Cheng, C., Magnowski, B., Durand, J., & Zochodne, D. W. (2005). Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *64*(7), 613–22.
- Chen, Z.-Y., Ieraci, A., Tanowitz, M., & Lee, F. S. (2005). A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(12), 5761–72.
- Cheng, J. T., Liu, I. M., Juang, S. W., & Jou, S. B. (2000). Decrease of adenosine A-1 receptor gene expression in cerebral cortex of aged rats. *Neuroscience Letters*, *283*(3), 227–9.
- Chiu, S. Y., & Kriegler, S. (1994). Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells. *Glia*, *11*(2), 191–200.
- Christensen, B. N., & Martin, A. R. (1970). Estimates of probability of transmitter release at the mammalian neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, *210*(4), 933–45.
- Christofi, F. L., Zhang, H., Yu, J. G., Guzman, J., Xue, J., Kim, M., Wang, Y. Z., & Cooke, H. J. (2001). Differential gene expression of adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ receptors in the human enteric nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *439*(1), 46–64.
- Chu, Y.-F., Chang, W.-H., Black, R. M., Liu, J.-R., Sompol, P., Chen, Y., Wei, H., Zhao, Q., & Cheng, I. H. (2012).

- Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid $\beta(1-42)$ levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*, 135(3), 2095–102.
- Cinalli, A. R., Guarracino, J. F., Fernandez, V., Roquel, L. I., & Losavio, A. S. (2013). Inosine induces presynaptic inhibition of acetylcholine release by activation of A₃ adenosine receptors at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology*, 169(8), 1810–23.
- Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., & Franco, R. (1997). Ligand-induced phosphorylation, clustering, and desensitization of A₁ adenosine receptors. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 788–97.
- Ciruela, F., Escriche M, Burgueno J, Angulo E, Casado V, Soloviev MM, Canela E. I, Mallol J, Chan WY, Lluís C, McIlhinney RA, F. R. (2001). Metabotropic Glutamate 1 α and Adenosine A₁ Receptors Assemble into Functionally Interacting Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18345–18351.
- Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R. J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Boryzc, J., Rebola, N., Goldberg, S. R., Mallol, J., Cortés, A., Canela, E. I., López-Giménez, J. F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R. A, Ferré, S., & Franco, R. (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(7), 2080–7.
- Clark, K. I., & Barry, S. R. (1994). Aminophylline enhances resting Ca²⁺ concentrations and twitch tension by adenosine receptor blockade in *Rana pipiens*. *The Journal of Physiology*, 481, Pt 1, 129–37.
- Clarke, D. A., Davoll, J., Philips, F. S., & Brown, G. B. (1952). Enzymatic deamination and vasodepressor effects of adenosine analogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 106(3), 291–302.
- Collis, M. G., & Hourani, S. M. (1993). Adenosine receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14(10), 360–6.
- Correia-de-Sá, P., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1991). Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. *British Journal of Pharmacology*, 103(2), 1614–20.
- Correia-de-Sá, P., & Ribeiro, J. A. (1994). Tonic adenosine A_{2A} receptor activation modulates nicotinic autoreceptor function at the rat neuromuscular junction. *European Journal of Pharmacology*, 271(2-3), 349–55.
- Correia-de-Sá, P., & Ribeiro, J. A. (1996). Adenosine uptake and deamination regulate tonic A_{2A} receptor facilitation of evoked [3H]acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *Neuroscience*, 73(1), 85–92.

- Correia-de-Sá, P., Timóteo, M. A., & Ribeiro, J. A. (1996). Presynaptic A₁ inhibitory/A_{2A} facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat hemidiaphragm. *Journal of Neurophysiology*, 76(6), 3910–9.
- Correia-de-Sá, P., Timóteo, M. A., & Ribeiro, J. A. (2000). A(2A) adenosine receptor facilitation of neuromuscular transmission: Influence of stimulus paradigm on calcium mobilization. *Journal of Neurochemistry*, 74(6), 2462–2469.
- Corset, V., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Forcet, C., Moysse, E., Chédotal, A., & Mehlen, P. (2000). Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A_{2B} receptor. *Nature*, 407(6805), 747–50.
- Costenla, A. R., Lopes, L. V, de Mendonça, A., & Ribeiro, J. A. (2001). A functional role for adenosine A₃ receptors: modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 302(1), 53–57.
- Courteaux, R. (1973). *Motor endplate structure. In structure and Function of Muscle. Vol 2. GH Bourne. pp. 483-530.* New York academic.
- Cristóvão-Ferreira, S., Navarro, G., Brugarolas, M., Pérez-Capote, K., Vaz, S. H., Fattorini, G., Conti, F., Lluís, C., Ribeiro, J. A., McCormick, P. J., Franco, R., & Sebastião, A. M. (2011). Modulation of GABA transport by adenosine A₁R-A_{2A}R heteromers, which are coupled to both G_s- and G_{i/o}-proteins. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(44), 15629–39.
- Cruz, L. J., Gray, W. R., Olivera, B. M., Zeikus, R. D., Kerr, L., Yoshikami, D., & Moczydlowski, E. (1985). Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(16), 9280–8.
- Cunha, R. A., & Sebastião, A. M. (1993). Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 424(5-6), 503–10.
- Cunha, R. A., Johansson, B., van der Ploeg, I., Sebastião, A. M., Ribeiro, J. A., & Fredholm, B. B. (1994a). Evidence for functionally important adenosine A_{2a} receptors in the rat hippocampus. *Brain Research*, 649(1-2), 208–16.
- Cunha, R. A., Milusheva, E., Vizi, E. S., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (1994b). Excitatory and inhibitory effects of A₁ and A_{2A} adenosine receptor activation on the electrically evoked [3H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 63(1), 207–14.
- Cunha, R. A., Johansson, B., Fredholm, B. B., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (1995). Adenosine A_{2A} receptors stimulate acetylcholine release from

- nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 196(1-2), 41–4.
- Cunha, R. A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1996). Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *British Journal of Pharmacology*, 119(2), 253–60.
- Cunha, R. A., Constantino, M. D., & Ribeiro, J. A. (1997). ZM241385 is an antagonist of the facilitatory responses produced by the A_{2A} adenosine receptor agonists CGS21680 and HENECA in the rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology*, 122(7), 1279–84.
- Cunha, R. A., Almeida, T., & Ribeiro, J. A. (2000). Modification by arachidonic acid of extracellular adenosine metabolism and neuromodulatory action in the rat hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37572–37581.
- Cunha, R. A., & Ribeiro, J. A. (2000). Adenosine A_{2A} receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neuroscience Letters*, 289(2), 127–30.
- Cunha, R. A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*, 38(2), 107–25.
- Cunha, R. A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade, 111–134.
- Cunha-Reis D, Sebastião A. M. & Ribeiro. J. A. (2000). Adenosine modulation and transduction mechanisms involved in the action of VIP on [3H]-GABA release from hippocampal synaptosomes. *Drug Dev. 50: 83 Res.*
- D**
- Dai, Z., & Peng, H. B. (1995). Presynaptic differentiation induced in cultured neurons by local application of basic fibroblast growth factor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(8), 5466–75.
- Dale, H. H., Feldberg, W., & Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 86(4), 353–80.
- Daly, J. W. (1982). Adenosine receptors: targets for future drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25(3), 197–207.
- Daly, J. W., Butts-Lamb, P., & Padgett, W. (1983). Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 3(1), 69–80.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor

- in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379(6565), 557–60.
- Day, N. C., Wood, S. J., Ince, P. G., Volsen, S. G., Smith, W., Slater, C. R., & Shaw, P. J. (1997). Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(16), 6226–35.
- Day, Y.-J., Huang, L., McDuffie, M. J., Rosin, D. L., Ye, H., Chen, J.-F., Schwarzwchild, M.A., Fink, J.S., Linden, J., & Okusa, M. D. (2003). Renal protection from ischemia mediated by A_{2A} adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 883–91.
- De Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H., & Zheng, J. (2014). Adenosine A_{2A} receptor as a drug discovery target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(9), 3623–50.
- De Lorenzo, S., Veggetti, M., Muchnik, S., & Losavio, A. (2004). Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release induced by adenosine at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology*, 142(1), 113–24.
- De Lorenzo, S., Veggetti, M., Muchnik, S., & Losavio, a. (2006). Presynaptic inhibition of spontaneous acetylcholine release mediated by P2Y receptors at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*, 142(1), 71–85.
- De, M., Austin, K.F., Dudley, M. W. (1993). Differential distribution of A3 receptors in rat brain. *Society of Neuroscience Abstracts* 19, 42.
- De Mendonça, A., & Ribeiro, J. A. (1997). Adenosine and neuronal plasticity. *Life Sciences*, 60(4-5), 245–51.
- Del Castillo, J., & Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of Physiology*, 124(3), 560–73.
- Della Latta, V., Cabiati, M., Rocchiccioli, S., Del Ry, S., & Morales, M.-A. (2013). The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 76, 182–9.
- Di Angelantonio, S., Piccioni, A., Moriconi, C., Trettel, F., Cristalli, G., Grassi, F., & Limatola, C. (2011). Adenosine A_{2A} receptor induces protein kinase A-dependent functional modulation of human (alpha)3(beta)4 nicotinic receptor. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 11), 2755–66.
- Díaz-Hernández, M., Pereira, M. F., Pintor, J., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A., & Miras-Portugal, M. T. (2002). Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(2), 441–50.
- Diógenes, M. J., Fernandes, C. C., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2004). Activation of adenosine A_{2A}

- receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(12), 2905–13.
- Diógenes M. J., Assaife-Lopes, N., Pinto-Duarte, A., Riberio, J. A., & Sebastiao, A. M. (2007). Influence of age on BDNF modulation of hippocampal synaptic transmission: interplay with adenosine A_{2A} receptors. *Hippocampus*, 17(7): 577-85.
- Dittman, J. S., Kreitzer, a C., & Regehr, W. G. (2000). Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1374–85.
- Dixon, A. K., Gubitz, a K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J., & Freeman, T. C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 118(6), 1461–8.
- Doherty, P., Hawgood, B. J., & Smith, I. C. (1986). Changes in miniature endplate potentials due to moderate hypertonicity at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 376, 1–11.
- Dowdall, M. J., Boyne, A. F., & Whittaker, V. P. (1974). Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *The Biochemical Journal*, 140(1), 1–12.
- Du, Y., & Grandis, J. R. (2015). Receptor-type protein tyrosine phosphatases in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 34(2), 61–9.
- Duarte-Araújo, M., Nascimento, C., Alexandrina Timóteo, M., Magalhães-Cardoso, T., & Correia-de-Sá, P. (2004a). Dual effects of adenosine on acetylcholine release from myenteric motoneurons are mediated by junctional facilitatory A_{2A} and extrajunctional inhibitory A₁ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 141(6), 925–34.
- Duarte-Araújo, M., Timóteo, M. A., & Correia-de-Sá, P. (2004b). Adenosine activating A_{2A}-receptors coupled to adenylate cyclase/cyclic AMP pathway downregulates nicotinic autoreceptor function at the rat myenteric nerve terminals. *Neurochemistry International*, 45(5), 641–51.
- Duclert, A., & Changeux, J. P. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiological Reviews*, 75(2), 339–68.
- Dumartin, B., Caillé, I., Gonon, F., & Bloch, B. (1998). Internalization of D1 dopamine receptor in striatal neurons in vivo as evidence of activation by dopamine agonists. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(5), 1650–61.
- Dunwiddie, T. V., Diao, L., Kim, H. O., Jiang, J., & Jacobson, K. A. (1997). Activation of Hippocampal Adenosine A₃ Receptors Produces a

Desensitization of A₁ Receptor-Mediated Responses in Rat Hippocampus, *17*(2), 607–614.

Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 31–55.

E

Eaton, S. L., Roche, S. L., Llavero Hurtado, M., Oldknow, K. J., Farquharson, C., Gillingwater, T. H., & Wishart, T. M. (2013). Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One*, *8*(8), e72457.

Ebersolt, C., Premont, J., Prochiantz, A., Perez, M., & Bockaert, J. (1983). Inhibition of brain adenylyl cyclase by A₁ adenosine receptors: pharmacological characteristics and locations. *Brain Research*, *267*(1), 123–9.

Eccles, J. C., Katz, B., & Kuffler, S. W. (1941). Nature of the "endplate potential" in curarized muscle. *J Neurophysiol*, *4*(5), 362–387.

Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., & Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annual Review of Biochemistry*, *56*, 567–613.

Edwards, F. A., Gibb, A. J., & Colquhoun, D. (1992). ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*, *359*(6391), 144–7.

Ekström, P. A., Bergstrand, H., & Edström, A. (1992). Effects of protein kinase

inhibitors on regeneration in vitro of adult frog sciatic sensory axons. *Journal of Neuroscience Research*, *31*(3), 462–9.

Engel, A. G., Walls, T. J., 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 defi. *Progress in Brain Research*, *84*, 125–37.

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

Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, *25*(3), 533–5.

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. *Journal of Neuroscience Research*, *59*(5), 692–7.

F

Faria, M., Oliveira, L. Timóteo, M. A., Lobo, M. G., Correia-de-Sá, P. (2003). Blockade of neuronal facilitatory nicotinic receptors containing $\alpha 3\beta 2$ subunits contribute to tetanic fade in the rat isolated diaphragm. *Synapse*, *49*(2):77-78.

Bibliografia/Bibliography

- Fatt, P., & Katz, B. (1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *The Journal of Physiology*, 115(3), 320–70.
- Fatt, P., & Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 117(1), 109–28.
- Federico, S., & Spalluto, G. (2012). Therapeutic potential of A₂ and A₃ adenosine receptor: a review of novel patented ligands, 2, 369–390.
- Feoktistov, I., & Biaggioni, I. (1995). Adenosine A_{2B} receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1979–86.
- Feoktistov, I., & Biaggioni, I. (1997). Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(4), 381–402.
- Feoktistov, I., Goldstein, A. E., & Biaggioni, I. (1999). Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A_{2B} receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Molecular Pharmacology*, 55(4), 726–34.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Reviews*, 53(1), 1–24.
- Ferré, S., Ciruela, F., Quiroz, C., Luján, R., Popoli, P., Cunha, R. A., Agnati, L. F., Fuxe, K., Woods, A. S., Lluís, C., & Franco, R. (2007). Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *TheScientificWorldJournal*, 7, 74–85.
- Ferreira, S. G., Gonçalves, F. Q., Marques, J. M., Tomé, Â. R., Rodrigues, R. J., Nunes-Correia, I., Ledent, C., Harkany, T., Venance, L., Cunha, R. A., & Köfalvi, A. (2015). Presynaptic adenosine A_{2A} receptors dampen cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of corticostriatal glutamatergic transmission. *British Journal of Pharmacology*, 172(4), 1074–1086.
- Ferry, C. B., & Kelly, S. S. (1988). The nature of the presynaptic effects of (+)-tubocurarine at the mouse neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 403, 425–37.
- Fiebich, B. L., Biber, K., Gyufko, K., Berger, M., Bauer, J., & van Calcar, D. (1996). Adenosine A_{2b} receptors mediate an increase in interleukin (IL)-6 mRNA and IL-6 protein synthesis in human astrogloma cells. *Journal of Neurochemistry*, 66(4), 1426–31.
- Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., & Ullrich, A. (2003). EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1203-8.
- Flucher, B. E., & Daniels, M. P. (1989). Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of

- acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron*, 3(2), 163–75.
- Fontinha, BM1., Diógenes, MJ., Ribeiro, J. A., Sebástiao. A. M. (2008). Enhancement of long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor requires adenosine A_{2A} receptor activation by endogenous adenosine. *Neuropharmacology*, 54(6), 924–933.
- Fox, S. H. (2013). Non-dopaminergic treatments for motor control in Parkinson's disease. *Drugs*, 73(13), 1405–15.
- Franco, R., Casadó, V., Cortés, A., Pérez-Capote, K., Mallol, J., Canela, E., Ferré, S., & Lluís, C. (2008). Novel pharmacological targets based on receptor heteromers. *Brain Research Reviews*, 58(2), 475–82.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P., & Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacological Reviews*, 46(2), 143–56.
- Fredholm, B. B., & Altiok, N. (1994). Adenosine A_{2B} receptor signalling is altered by stimulation of bradykinin or interleukin receptors in astroglia cells. *Neurochemistry International*, 25(1), 99–102.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Dubyak, G. R., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Schwabe, U., & Williams, M. (1997). Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18(3), 79–82.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology . XXV . Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 527–552.
- Fredholm, B. B., Cunha, R. A., & Svenningsson, P. (2003). Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors and therapeutic applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(4), 413–26.
- Fredholm, B. B., Chen, J. F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., & Vaugeois, J. M. (2005). Adenosine and Brain Function. *International Review of Neurobiology*, 63, 191–270.
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., & Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A_{2A} signaling. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 263–76.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Mu, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXXI . Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors - An Update, 63(1), 1–34.
- Fredholm, B. B. (2014). Adenosine--a physiological or pathophysiological agent? *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 92(3), 201–6.

- Freeman, W. i cols. (2007). *Life: The Sciences of biology*, Sinauer Association Inc. Eight Edition.
- Fukunaga, K., & Miyamoto, E. (1998). Role of MAP kinase in neurons. *Molecular Neurobiology*, 16(1), 79–95.
- Furshpan, E. J. (1956). The effects of osmotic pressure changes on the spontaneous activity at motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 134(3), 689–97.
- G**
- Ganguly, D. K., & Das, M. (1979). Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature*, 278(5705), 645–6.
- Garcia, N., Santafé, M. M., Salon, I., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2005). Expression of muscarinic acetylcholine receptors (M1-, M2-, M3- and M4-type) in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Histology and Histopathology*, 20(3), 733–43.
- Garcia, N., Tomàs, M., Santafé, M. M., Besalduch, N., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2010). The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and presynaptic muscarinic receptors modulates transmitter release in adult rodent motor nerve terminals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), 16514–22.
- Garcia, N., Santafé, M. M., Tomàs, M., Priego, M., Obis, T., Lanuza, M. A., Besalduch, N., & Tomàs, J. (2012). Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation. *Journal of the Peripheral Nervous System : JPNS*, 17(3), 312–23.
- Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 377(6546), 232–6.
- Gebicke-Haerter, P. J., Christoffel, F., Timmer, J., Northoff, H., Berger, M., & Van Calker, D. (1996). Both adenosine A₁- and A₂-receptors are required to stimulate microglial proliferation. *Neurochemistry International*, 29(1), 37–42.
- Georgiou, J., Robitaille, R., Trimble, W. S., & Charlton, M. P. (1994). Synaptic regulation of glial protein expression in vivo. *Neuron*, 12(2), 443–55.
- Gessi, S., Merighi, S., Varani, K., Leung, E., Mac Lennan, S., & Borea, P. A. (2008). The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(1), 123–40.
- Ghazanfari, N., Fernandez, K. J., Murata, Y., Morsch, M., Ngo, S. T., Reddel, S. W., Noakes, P. G., Phillips, W. D., & Phillips, W. D. (2011). Muscle specific kinase: organiser of synaptic membrane domains. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(3), 295–8.
- Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E. I., Rondin,

- S., Lew, J. Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L. F., Verniera, P., Lluís, C., Ferré, S., Fuxe, K., & Franco, R. (2000). Dopamine D1 and adenosine A₁ receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8606–11.
- Ginsborg, B. L., & Hirst, G. D. (1972). The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *The Journal of Physiology*, 224(3), 629–45.
- Ginsborg, B. L., & Jekinson, D. H. (1976). Transmission of impulses from nerve to muscle. In: Zarmis E. (ed) Neuromuscular junction. Springer. Berlin Heidelberg. New York. (*Handbuch der experimentellen Pharmakologie, vol. 2*), pp. 229-364.
- Gomez, G., & Sitkovsky, M. V. (2003). Differential requirement for A_{2A} and A₃ adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo. *Blood*, 102(13), 4472–8.
- Gonçalves, F. Q., Pires, J., Pliassova, A., Beleza, R., Lemos, C., Marques, J. M., Rodrigues, R. J., Canas, P. M., Köfalvi, A., Cunha, R. A., & Rial, D. (2015). Adenosine A_{2b} receptors control A₁ receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, (October 2014), n/a–n/a.
- Gray, J. H., Owen, R. P., & Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 447(5), 728–34.
- Grden, M., Podgorska, M., Szutowicz, A., & Pawelczyk, T. (2007). Diabetes-induced alterations of adenosine receptors expression level in rat liver. *Experimental and Molecular Pathology*, 83(3), 392–8.
- Greene, R. W., & Haas, H. L. (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 36(4), 329–41.
- Greer, P. L., & Greenberg, M. E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron*, 59(6), 846–60.
- Grishin, S., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Afzalov, R., & Giniatullin, R. (2005). Mechanisms of ATP action on motor nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *The European Journal of Neuroscience*, 21(5), 1271–9.
- Grube, K., Rüdibusch, J., Xu, Z., Böckenholt, T., Methner, C., Müller, T., Cuello, F., Zimmermann, K., Yang, X., Felix, S. B., Cohen, M. V., Downey, J. M., & Krieg, T. (2011). Evidence for an intracellular localization of the adenosine A_{2B} receptor in rat cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, 106(3), 385–96.
- Gu, J. G., Foga, I. O., Parkinson, F. E., & Geiger, J. D. (1995). Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal

- preparations. *Journal of Neurochemistry*, 64(5), 2105–10.
- Gubitz, A. K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K. A., & Richardson, P. J. (1996). Dual signalling by the adenosine A_{2A} receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, 67(1), 374–81.
- H**
- Ha, J. C., & Richman, D. P. (2015). Myasthenia gravis and related disorders: Pathology and molecular pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852(4), 651–657.
- Håberg, A., Qu, H., Haraldseth, O., Unsgård, G., & Sonnewald, U. (2000). In vivo effects of adenosine A₁ receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo ¹³C NMR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry*, 74(1), 327–33.
- Hall, Z. W., & Sanes, J. R. (1993). Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72 Suppl, 99–121.
- Hamilton, B. R., & Smith, D. O. (1991). Autoreceptor-mediated purinergic and cholinergic inhibition of motor nerve terminal calcium currents in the rat. *The Journal of Physiology*, 432, 327–41.
- Hammarberg, C., Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2003). Evidence for functional adenosine A₃ receptors in microglia cells. *Journal of Neurochemistry*, 86(4), 1051–4.
- Hammer, J., Qu, H., Håberg, A., & Sonnewald, U. (2001). In vivo effects of adenosine A₂ receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo ¹³C MR spectroscopy. *Journal of Neurochemistry*, 79(4), 885–92.
- Han, D. H., Hansen, P. A., Nolte, L. A., & Holloszy, J. O. (1998). Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes*, 47(11), 1671–5.
- Haskó, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(9), 759–70.
- Hemmings, H. C., Nairn, A. C., McGuinness, T. L., Haganir, R. L., & Greengard, P. (1989). Role of protein phosphorylation in neuronal signal transduction. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3(5), 1583–92.
- Henning, R. H. (1997). Purinoceptors in neuromuscular transmission.

- Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 115–28.
- Hettinger, B. D., Lee, A., Linden, J., & Rosin, D. L. (2001). Ultrastructural localization of adenosine A_{2A} receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *The Journal of Comparative Neurology*, 431(3), 331–46.
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology*, 57(2), 315–44.
- Heuser, J. E., Reese, T. S., & Landis, D. M. (1974). Functional changes in frog neuromuscular junctions studied with freeze-fracture. *Journal of Neurocytology*, 3(1), 109–31.
- Heuser, J. E., Reese, T. S., Dennis, M. J., Jan, Y., Jan, L., & Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *The Journal of Cell Biology*, 81(2), 275–300.
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., & Sasaki, Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry*, 23(21), 5036–41.
- Hilgenberg, L., & Miles, K. (1995). Developmental regulation of a protein kinase C isoform localized in the neuromuscular junction. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 1), 51–61.
- Hinz, S., Lacher, S. K., Seibt, B. F., & Müller, C. E. (2014). BAY60-6583 acts as a partial agonist at adenosine A_{2B} receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349(3), 427–36.
- Hirsh, J. K., Silinsky, E. M., & Solsona, C. S. (1990). The role of cyclic AMP and its protein kinase in mediating acetylcholine release and the action of adenosine at frog motor nerve endings. *British Journal of Pharmacology*, 101(2), 311–318.
- Hirsh, J. K., Searl, T. J., & Silinsky, E. M. (2002). Regulation by Rab3A of an endogenous modulator of neurotransmitter release at mouse motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 545(2), 337–343.
- Hirsh, J. K., & Silinsky, E. M. (2002). Inhibition of spontaneous acetylcholine secretion by 2-chloroadenosine as revealed by a protein kinase inhibitor at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology*, 135(8), 1897–902.
- Ho, T., Vessey, K. A., & Fletcher, E. L. (2014). Immunolocalization of the P2X₄ receptor on neurons and glia in the mammalian retina. *Neuroscience*, 277, 55–71.
- Hofmann, F., Biel, M., & Flockerzi, V. (1994). Molecular Basis for Ca²⁺ Channel Diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 399–418.
- Hong, S. J., & Chang, C. C. (1995). Calcium channel subtypes for the sympathetic and parasympathetic nerves of guinea-pig atria. *British*

Bibliografia/Bibliography

Journal of Pharmacology, 116(1), 1577–82.

Hoover, F., Mathiesen, I., Skålhegg, B. S., Lømo, T., & Taskén, K. (2001). Differential expression and regulation of the PKA signalling pathway in fast and slow skeletal muscle. *Anatomy and Embryology*, 203(3), 193–201.

Hsu, K. S., Huang, C. C., & Gean, P. W. (1995). Muscarinic depression of excitatory synaptic transmission mediated by the presynaptic M3 receptors in the rat neostriatum. *Neuroscience Letters*, 197(2), 141–4.

Huang, S.-M., Kitamura, A., Akita, T., Narita, K., & Kuba, K. (2002). Adenosine depresses a Ca(2+)-independent step in transmitter exocytosis at frog motor nerve terminals. *The European Journal of Neuroscience*, 15(8), 1291–8.

Hubbard, J. I., Jones, S. F., & Landau, E. M. (1968). An examination of the effects of osmotic pressure changes upon transmitter release from mammalian motor nerve terminals. *The Journal of Physiology*, 197(3), 639–57.

Hubbard, J. I., Jones, S. F., & Landau, E. M. (1971). The effect of temperature change upon transmitter release, facilitation and post-tetanic potentiation. *The Journal of Physiology*, 216(3), 591–609.

Hubbard, J. I., & Wilson, D. F. (1973). Neuromuscular transmission in a mammalian preparation in the absence of blocking drugs and the effect of D-tubocurarine. *The*

Journal of Physiology, 228(2), 307–25.

Huganir, R. L., Delcour, A. H., Greengard, P., & Hess, G. P. (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, 321(6072), 774–6.

Huguenard, J. R. (1998). Low-voltage-activated (T-type) calcium-channel genes identified. *Trends in Neurosciences*, 21(11), 451–2.

Huxley, A. F., & Stämpfli, R. (1949). Evidence for saltatory conduction in peripheral myelinated nerve fibres. *The Journal of Physiology*, 108(3), 315–39.

I

Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D. B., & Matsuda, K. (2014). Studies on an acetylcholine binding protein identify a basic residue in loop G on the β 1 strand as a new structural determinant of neonicotinoid actions. *Molecular Pharmacology*, 86(6), 736–46.

Imaizumi-Scherrer, T., Faust, D. M., Bénichou, J. C., Hellio, R., & Weiss, M. C. (1996). Accumulation in fetal muscle and localization to the neuromuscular junction of cAMP-dependent protein kinase A regulatory and catalytic subunits RI alpha and C alpha. *The Journal of Cell Biology*, 134(5), 1241–54.

J

- Jackson, E. K., Zhu, C., Tofovic, S. P., Edwin, K., & Stevan, P. (2002). Expression of adenosine receptors in the preglomerular microcirculation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 15261, 41–51.
- Jacobson, K. A., van Galen, P. J. M., Ji, X.-D., Ramkumar, V., Olah, M. E., & Stiles, G. L. (1993). Molecular Characterization of A₁ and A_{2a} Adenosine Receptors. *Drug Development Research*, 28(3), 226–231.
- Jahromi, B. S., Robitaille, R., & Charlton, M. P. (1992). Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*, 8(6), 1069–77.
- Jarvis, M. F., & Williams, M. (1989). Direct autoradiographic localization of adenosine A₂ receptors in the rat brain using the A₂-selective agonist, [3H]CGS 21680. *European Journal of Pharmacology*, 168(2), 243–6.
- Jarvis, S. M., Martin, B. W., & Ng, A. S. (1985). 2-Chloroadenosine, a permeant for the nucleoside transporter. *Biochemical Pharmacology*, 34(18), 3237–41.
- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), 15924–15929.
- Jena, B. P. (2009). Membrane fusion: role of SNAREs and calcium. *Protein and Peptide Letters*, 16(7), 712–7.
- Jenkinson, D. H. (1957). The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 138(3), 434–44.
- Jenner, T. L., Mellick, A. S., Harrison, G. J., Griffiths, L. R., & Rose-Meyer, R. B. (2004). Age-related changes in cardiac adenosine receptor expression. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(3), 211–7.
- Jiménez, A. I., Castro, E., Mirabet, M., Franco, R., Delicado, E. G., & Miras-Portugal, M. T. (1999). Potentiation of ATP calcium responses by A_{2B} receptor stimulation and other signals coupled to G_s proteins in type-1 cerebellar astrocytes. *Glia*, 26(2), 119–28.
- Ji, X., Kim, Y. C., Ahern, D. G., Linden, J., & Jacobson, K. A. (2001). [3H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A_{2B} adenosine receptors. *Biochemical Pharmacology*, 61(6), 657–63.
- Jin, X., Shepherd, R. K., Duling, B. R., & Linden, J. (1997). Inosine binds to A₃ adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(11), 2849–57.
- Jo, S. A., Zhu, X., Marchionni, M. A., & Burden, S. J. (1995). Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature*, 373(6510), 158–61.

Jung, N., & Haucke, V. (2007). Clathrin-mediated endocytosis at synapses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(9), 1129–36.

K

Kalamida, D., Poulas, K., Avramopoulou, V., Fostieri, E., Lagoumintzis, G., Lazaridis, K., Sideri, A., Zouridakis, M., Tzartos, S. J. (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Structure, function and pathogenicity. *The FEBS Journal*, 274(15), 3799–845.

Kamikubo, Y., Shimomura, T., Fujita, Y., Tabata, T., Kashiyama, T., Sakurai, T., Fukurotani, T., Kano, M. (2013). Functional cooperation of metabotropic adenosine and glutamate receptors regulates postsynaptic plasticity in the cerebellum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(47), 18661–71.

Kataoka, S., Baquero, A., Yang, D., Shultz, N., Vandenbeuch, A., Ravid, K., Kinnamon, S.C., Finger, T. E. (2012). A_{2B}R adenosine receptor modulates sweet taste in circumvallate taste buds. *PLoS One*, 7(1), e30032.

Katz, B., & Miledi, R. (1965). The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 161, 483–95.

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

Katz, B. Y. B., & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular, 481–492.

Katz, B., & Miledi, R. (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *The Journal of Physiology*, 207(3), 789–801

Katz, B., & Miledi, R. (1979). Estimates of quantal content during “chemical potentiation” of transmitter release. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 205(1160), 369–78.

Katz, A., Wu, D., & Simon, M. I. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. *Nature*, 360(6405), 686–9.

Katz, E., Ferro, P. A., Weisz, G., & Uchitel, O. D. (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 497 (Pt 3), 687–97.

Katz, E., Protti, D. A., Ferro, P. A., Rosato Siri, M. D., & Uchitel, O. D. (1997). Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and presynaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology*, 121(8), 1531–40.

Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, a, & Bate, M. (1996). The drosophila neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 545–75.

- Kharasch, E. D., Mellow, A. M., & Silinsky, E. M. (1981). Intracellular magnesium does not antagonize calcium-dependent acetylcholine secretion. *The Journal of Physiology*, *314*, 255–63.
- Kim, C., Xuong, N.-H., & Taylor, S. S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5710), 690–6.
- Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., Hubbard, S. R., Dustin, M. L., Burden, S. J. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, *135*(2), 334–42.
- Kita, H., & van der Kloot, W. (1977). Time course and magnitude of effects of changes in tonicity on acetylcholine release at frog neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology*, *40*(2), 212–24.
- Kull, B., Svenningsson, P., & Fredholm, B. B. (2000). Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Molecular Pharmacology*, *58*(4), 771–7.
- Kurachi, Y., Nakajima, T., & Sugimoto, T. (1986). On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, *407*(3), 264–74.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods (San Diego, Calif.)*, *38*(4), 283–93.
- L**
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–5.
- Lafarga, M., Berciano, M. T., & Carmo-Fonseca, M. (1997). Semithin cryosections as a tool to perform high resolution immunofluorescence and in situ hybridization analysis of the nervous tissue: a study in the supraoptic nucleus. *Journal of Neuroscience Methods*, *75*(2), 137–45.
- Lanuza, M. A., Li, M. X., Jia, M., Kim, S., Davenport, R., Dunlap, V., & Nelson, P. G. (2000). Protein kinase C-mediated changes in synaptic efficacy at the neuromuscular junction in vitro: the role of postsynaptic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience Research*, *61*(6), 616–25.
- Lanuza, M. A., Garcia, N., Santafé, M., Nelson, P. G., Fenoll-Brunet, M. R., & Tomàs, J. (2001). Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *Journal of Neuroscience Research*, *63*(4), 330–40.
- Lanuza, M. A., Besalduch, N., Garcia, N., Sabaté, M., Santafé, M. M., & 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. *Journal of Neuroscience Research*, 85(4), 748–56.
- Lanuza, M. A., Besalduch, N., González, C., Santafé, M. M., Garcia, N., Tomàs, M., Nelson, P. G., Tomàs, J. (2010). Decreased phosphorylation of δ and ϵ subunits of the acetylcholine receptor coincides with delayed postsynaptic maturation in PKC θ deficient mouse. *Experimental Neurology*, 225(1), 183–95.
- Lanuza, M. A., Santafé, M. M., Garcia, N., Besalduch, N., Tomàs, M., Obis, T., Priego, M., Nelson, P. G., Tomàs, J. (2014). Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: Localization and specific roles in neurotransmission and development. *Journal of Anatomy*, 224(1), 61–73.
- Lasley, R. D., Narayan, P., Uittenbogaard, A., & Smart, E. J. (2000). Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4417–21.
- Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Muller, C. E., Buée, L., & Blum, D. (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of Aging*, 35(9), 2079–90.
- Lazarevic, V., Pothula, S., Andres-Alonso, M., & Fejtova, A. (2013). Molecular mechanisms driving homeostatic plasticity of neurotransmitter release. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(December), 244.
- Le Novère, N., & Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *Journal of Molecular Evolution*, 40(2), 155–72.
- Lee, F. S., & Chao, M. V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3555–3560.
- Lee, FS, Rajagopal, R., & Chao, M. V. (2002). Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokines Growth Factor Review*, 13(1):11-7.
- Lee, Y., Rudell, J., Yechikhov, S., Taylor, R., Swope, S., & Ferns, M. (2008). Rapsyn carboxyl terminal domains mediate muscle specific kinase-induced phosphorylation of the muscle acetylcholine receptor. *Neuroscience*, 153(4), 997–1007.
- Li, C. L. (1958). Effect of cooling on neuromuscular transmission in the rat. *The American Journal of Physiology*, 194(1), 200–6.
- Li, M.-X., Jia, M., Jiang, H., Dunlap, V., & Nelson, P. G. (2001). Opposing actions of protein kinase A and C mediate Hebbian synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, 4(9), 871–872.

- Li, X. X., Nomura, T., Aihara, H., & Nishizaki, T. (2001). Adenosine enhances glial glutamate efflux via A_{2A} adenosine receptors. *Life Sciences*, 68(12), 1343–50.
- Li, Y., & Yu, Z. (2014). [Progress in application of the combination of neural stem cells and Schwann cells for nerve repairing]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi = Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery*, 28(13), 1006–9.
- Liley, A. W., & North, K. A. (1953). An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology*, 16(5), 509–27.
- Liley, A. W. (1956). An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. *The Journal of Physiology*, 132(3), 650–66.
- Lima, R. de F., Prado, V. F., Prado, M. A. M., & Kushmerick, C. (2010). Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *Journal of Neurochemistry*, 113(4), 943–51.
- Lin, M. J., & Lin-Shiau, S. Y. (1997). Multiple types of Ca²⁺ channels in mouse motor nerve terminals. *The European Journal of Neuroscience*, 9(4), 817–23.
- Linden, J. (1991). Structure and function of A₁ adenosine receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5(12), 2668–76.
- Linden, J., Taylor, H. E., Robeva, A. S., Tucker, A. L., Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Fink, J. S., & Reppert, S. M. (1993). Molecular cloning and functional expression of a sheep A₃ adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Molecular Pharmacology*, 44(3), 524–32.
- Linden, J. (1994). Cloned adenosine A₃ receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(8), 298–306.
- Liu, G. J., Werry, E. L., & Bennett, M. R. (2005). Secretion of ATP from Schwann cells in response to uridine triphosphate. *European Journal of Neuroscience*, 21(1), 151–160.
- Lloyd, H. G., & Fredholm, B. B. (1995). Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochemistry International*, 26(4), 387–95.
- Long, A. A., Kim, E., Leung, H.-T., Woodruff, E., An, L., Doerge, R. W., Pak, W. L., Broadie, K. (2008). Presynaptic calcium channel localization and calcium-dependent synaptic vesicle exocytosis regulated by the Fuseless protein. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(14), 3668–82.
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB

- family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35(4), 605–23.
- Lopes, Luísa V., Cunha, A., Rodrigo, & Ribeiro, J. A. (1999). Cross Talk Between A₁ and A_{2A} Adenosine Receptors in the Hippocampus and Cortex of Young Adult and Old Rats. *The American Physiological Society*, 3196–3203.
- Lopes, L. V., Cunha, R. A., Kull, B., Fredholm, B. B., & Ribeiro, J. A. (2002). Adenosine A(2A) receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A(1) receptor inhibition. *Neuroscience*, 112(2), 319–29.
- Lopes, L. V., Rebola, N., Pinheiro, P. C., Richardson, P. J., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2003). Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreport*, 14(12), 1645–8.
- Lopes, L. V., Halldner, L., Rebola, N., Johansson, B., Ledent, C., Chen, J. F., Fredholm, B. B., Cunha, R. A. (2004). Binding of the prototypical adenosine A(2A) receptor agonist CGS 21680 to the cerebral cortex of adenosine A(1) and A(2A) receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology*, 141(6), 1006–1014.
- López-Vera. (2010). Los Receptores Nicotínicos de acetilcolina. *REB*, 29(1), 8–12.
- Lorenzen, A., & Schwabe, U. (2001). P1 receptors. In *Handbook of Experimental Pharmacology, Purinergic and Pyrimidergic Signalling I: Molecular, Nervous and Urogenitary System Function*, edited by Abbracchio MP. and Williams M. Berlin. Springer-Verlang. vol 151/1, 19–45.
- Loreti, S., Vilaró, M. T., Visentin, S., Rees, H., Levey, A. I., & Tata, A. M. (2006). Rat Schwann cells express M1-M4 muscarinic receptor subtypes. *Journal of Neuroscience Research*, 84(1), 97–105.
- Losavio, A., & Muchnik, S. (1997). Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *The American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 1), C1835–41.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75.
- Lundberg, A., & Quilisch, H. (1953). Presynaptic potentiation and depression of neuromuscular transmission in frog and rat. *Acta Physiologica Scandinavica Supplementum*, 111, 111–20.
- Lyng, J., & Hellsten, Y. (2000). Distribution of adenosine A₁, A_{2A} and A_{2B} receptors in human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 169(4), 283–90.
- Lyng, J., Schulte, G., Nordsborg, N., Fredholm, B. B., & Hellsten, Y. (2003). Adenosine A_{2B} receptors modulate cAMP levels and induce CREB but not ERK1/2 and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1), 180–187.

M

- Magazanik, L. G., & Fedorova, I. M. (2003). Modulatory role of adenosine receptors in insect motor nerve terminals. *Neurochemical Research*.
- Magistretti, P. J., Hof, P. R., & Martin, J. L. (1986). Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: a possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 6(9), 2558–62.
- Magleby, K. L. (1973). The effect of repetitive stimulation on facilitation of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 234(2), 327–52.
- Mahan, L. C., McVittie, L. D., Smyk-Randall, E. M., Nakata, H., Monsma, F. J., Gerfen, C. R., & Sibley, D. R. (1991). Cloning and expression of an A₁ adenosine receptor from rat brain. *Molecular Pharmacology*, 40(1), 1–7.
- Malinowski, M. N., Cannady, S. B., Schmit, K. V., Barr, P. M., Schrock, J. W., & Wilson, D. F. (1997). Adenosine depresses transmitter release but is not the basis for “tetanic fade” at the neuromuscular junction of the rat. *Neuroscience Letters*, 230(2), 81–84.
- Mallart, A., & Martin, A. R. (1968). The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, 196(3), 593–604.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912–34.
- Marala, R. B., & Mustafa, S. J. (1998). Immunological characterization of adenosine A_{2A} receptors in human and porcine cardiovascular tissues. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 286(2), 1051–7.
- Maselli, R. a, Arredondo, J., Ferns, M. J., & Wollmann, R. L. (2012). Synaptic basal lamina-associated congenital myasthenic syndromes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1275, 36–48.
- Matsumoto, T., Tostes, R. C., & Webb, R. C. (2012). Alterations in vasoconstrictor responses to the endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate are region specific in DOCA-salt hypertensive rats. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 65(1), 81–90.
- McLachlan, E. M., & Martin, A. R. (1981). Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *The Journal of Physiology*, 311, 307–24.
- McMahan, U. J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55, 407–18.
- Mehndiratta, M. M., Pandey, S., & Kuntzer, T. (2014).

- Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD006986.
- Melani, A., Cipriani, S., Vannucchi, M. G., Nosi, D., Donati, C., Bruni, P., Giovannini, M. G., & Pedata, F. (2009). Selective adenosine A_{2A} receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia. *Brain : A Journal of Neurology*, 132(Pt 6), 1480–95.
- Mellor, H., & Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical Journal*, 332, Pt 2, 281–92.
- Meriney, S. D., & Grinnell, A. D. (1991). Endogenous adenosine modulates stimulation-induced depression at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 443, 441–55.
- Meyer, P. T., Elmenhorst, D., Boy, C., Winz, O., Matusch, A., Zilles, K., & Bauer, A. (2007). Effect of aging on cerebral A₁ adenosine receptors: A [18F]CPFPX PET study in humans. *Neurobiology of Aging*, 28(12), 1914–24.
- Miledi, R. (1973). Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 183(1073), 421–5.
- Minic, J., Molgó, J., Karlsson, E., & Krejci, E. (2002). Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *The European Journal of Neuroscience*, 15(3), 439–48.
- Mis, K., Matkovic, U., Pirkmajer, S., Sciancalepore, M., Lorenzon, P., Mars, T., & Grubic, Z. (2013). Acetylcholinesterase and agrin: different functions, similar expression patterns, multiple roles. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 297–301.
- Mochida, S., Yokoyama, C. T., Kim, D. K., Itoh, K., & Catterall, W. A. (1998). Evidence for a voltage-dependent enhancement of neurotransmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14523–8. from
- Moidunny, S., Vinet, J., Wesseling, E., Bijzet, J., Shieh, C.-H., van Ijzendoorn, S. C. D., Bezzi, P., Boddeke, H. WGM., & Biber, K. (2012). Adenosine A_{2B} receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 198.
- Montal, M., & Opella, S. J. (2002). The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1565(2), 287–93.
- Mori, M., Heuss, C., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (2001). Fast synaptic transmission mediated by P2X receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *The*

- Journal of Physiology*, 535(Pt 1), 115–23.
- Moriyama, K., & Sitkovsky, M. V. (2010). Adenosine A_{2A} receptor is involved in cell surface expression of A_{2B} receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39271–88.
- Mulugeta, E., Karlsson, E., Islam, A., Kalaria, R., Mangat, H., Winblad, B., & Adem, A. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Research*, 960(1-2), 259–62.
- Mynlieff, M., & Beam, K. G. (1994). Adenosine acting at an A1 receptor decreases N-type calcium current in mouse motoneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(6), 3628–34.
- N**
- Nagano, O., Földes, F. F., Nakatsuka, H., Reich, D., Ohta, Y., Sperlagh, B., & Vizi, E. S. (1992). Presynaptic A₁-purinoceptor-mediated inhibitory effects of adenosine and its stable analogues on the mouse hemidiaphragm preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 346(2), 197–202.
- Nagy, A., Baker, R. R., Morris, S. J., & Whittaker, V. P. (1976). The preparation and characterization of synaptic vesicles of high purity. *Brain Research*, 109(2), 285–309.
- Nai, Q., Wang, X., Jin, Y., Sun, D., Li, M., Hu, B., & Zhang, X. (2010). Ciliary neurotrophic factor enhances nicotinic synaptic transmission in sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 88(4), 887–95.
- Nakata, H., Yoshioka, K., Kamiya, T., Tsuga, H., & Oyanagi, K. (2005). Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 26(2-3), 233–8.
- Namba, K., Suzuki, T., & Nakata, H. (2010). Immunogold electron microscopic evidence of in situ formation of homo- and heteromeric purinergic adenosine A₁ and P2Y2 receptors in rat brain. *BMC Research Notes*, 3(1), 323.
- Nascimento, F., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2015). Presymptomatic and symptomatic ALS SOD1 (G93A) mice differ in adenosine A1 and A2A receptor-mediated tonic modulation of neuromuscular transmission. *Purinergic Signalling*.
- Nathanson, N. M. (2008). Synthesis, trafficking, and localization of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 119(1), 33–43.
- Nelson, P. G., Lanuza, M. A., Jia, M., Li, M.-X., & Tomàs, J. (2003). Phosphorylation reactions in activity-dependent synapse modification at the neuromuscular junction during development. *Journal of Neurocytology*, 32(5-8), 803–16.
- Nelson, P. G. (2005). Activity-dependent synapse modulation and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*, 2(5), 497–506.

- Newby, A. C. (1984). Adenosine and the concept of "retaliatory metabolites." *Trends in Biochemical Sciences*, 9(2), 42–44.
- Newsholme, E. A. (1978). Substrate cycles: their metabolic, energetic and thermic consequences in man. *Biochemical Society Symposium*, (43), 183–205.
- Nieber, K., Poelchen, W., & Illes, P. (1997). Role of ATP in fast excitatory synaptic potentials in locus coeruleus neurons of the rat. *British Journal of Pharmacology*, 122(3), 423–30.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(7), 484–96.
- Noji, T., Karasawa, A., & Kusaka, H. (2004). Adenosine uptake inhibitors. *European Journal of Pharmacology*, 495(1), 1–16.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., & Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316(6027), 440–3.
- Numann, R., Hauschka, S. D., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (1994). Modulation of skeletal muscle sodium channels in a satellite cell line by protein kinase C. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(7), 4226–36.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A., & Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(4), 137–41.
- Ogata, T. (1988). Structure of motor endplates in the different fiber types of vertebrate skeletal muscles. *Archives of Histology and Cytology*, 51(5), 385–424.
- Olah, M. E., & Stiles, G. L. (2000). The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacology & Therapeutics*, 85(2), 55–75.
- Oliveira, L., Timóteo, M. A., & Correia-de-Sá, P. (2002). Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. *The European Journal of Neuroscience*, 15(11), 1728–36.
- Oliveira, L., Timóteo, M. A., & Correia-de-Sá, P. (2004). Tetanic depression is overcome by tonic adenosine A_{2A} receptor facilitation of L-type Ca²⁺ influx into rat motor nerve terminals. *The Journal of Physiology*, 560(Pt 1), 157–168.
- Oliveira, L., & Correia-de-Sá, P. (2005). Protein kinase A and Ca(v)1 (L-Type) channels are common targets to facilitatory adenosine A_{2A} and muscarinic M1 receptors on rat motoneurons. *Neuro-Signals*, 14(5), 262–72.
- Oliveira, L., Timóteo, M. A., & Correia-de-Sá, P. (2009). Negative crosstalk

- between M1 and M2 muscarinic autoreceptors involves endogenous adenosine activating A₁ receptors at the rat motor endplate. *Neuroscience Letters*, 459(3), 127–31.
- Oliveira, L., Costa, A. C., Noronha-Matos, J. B., Silva, I., Cavalcante, W. L., Timóteo, M. A., Corrado, A. P., Dal Belo, C. A., Ambiel, C. R., Alves-do-Prado, W., & Correia-de-Sá, P. (2015). Amplification of neuromuscular transmission by methylprednisolone involves activation of presynaptic facilitatory adenosine A_{2A} receptors and redistribution of synaptic vesicles. *Neuropharmacology*, 89, 64–76.
- Ongini, E., & Fredholm, B. B. (1996). Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(10), 364–72.
- Othman, T., Yan, H., & Rivkees, S. a. (2003). Oligodendrocytes express functional A₁ adenosine receptors that stimulate cellular migration. *Glia*, 44(2), 166–72.
- Overk, C. R., Felder, C. C., Tu, Y., Schober, D. A., Bales, K. R., Wu, J., & Mufson, E. J. (2010). Cortical M1 receptor concentration increases without a concomitant change in function in Alzheimer's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(1), 63–70.
- Paes-De-Carvalho, R. (2002). Adenosine as a signaling molecule in the retina: biochemical and developmental aspects. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 74(3), 437–51.
- Palma, A. G., Muchnik, S., & Losavio, A. S. (2011). Excitatory effect of the A_{2A} adenosine receptor agonist CGS-21680 on spontaneous and K⁺-evoked acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*, 172, 164–76.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M. T., & Krishtal, O. (1998). A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*, 10(12), 3898–902.
- Parkinson, F. E., & Fredholm, B. B. (1990). Autoradiographic evidence for G-protein coupled A₂-receptors in rat neostriatum using [3H]-CGS 21680 as a ligand. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 342(1), 85–9.
- Patton, B. L. (2003). Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *Journal of Neurocytology*, 32(5-8), 883–903.
- Penner, R., & Dreyer, F. (1986). Two different presynaptic calcium currents in mouse motor nerve terminals. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 406(2), 190–7.
- Perissinotti, P. P., Giugovaz Tropper, B., & Uchitel, O. D. (2008). L-type calcium channels are involved in fast endocytosis at the mouse neuromuscular junction. *The European Journal of Neuroscience*, 27(6), 1333–44.

P

Bibliografia/Bibliography

- Perissinotti, P. P., & Uchitel, O. D. (2010). Adenosine drives recycled vesicles to a slow-release pool at the mouse neuromuscular junction. *The European Journal of Neuroscience*, 32(6), 985–96.
- Perkins, G. A., Wang, L., Huang, L. J., Humphries, K., Yao, V. J., Martone, M., Deerinck T. J., Barraclough, D. M., Violin, J. D., Smith D., Newton, A., Scott, D. J., Taylor, S. S., & Ellisman, M. H. (2001). PKA, PKC and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neuroscience*; 2:17.
- Perrini, S., Henriksson, J., Zierath, J. R., & Widegren, U. (2004). Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes*, 53(1), 21–4.
- Peterfreund, R. A., MacCollin, M., Gusella, J., & Fink, J. S. (1996). Characterization and expression of the human A_{2A} adenosine receptor gene. *Journal of Neurochemistry*, 66(1), 362–8.
- Peyot, M.-L., Gadeau, a.-P., Dandre, F., Belloc, I., Dupuch, F., & Desgranges, C. (2000). Extracellular Adenosine Induces Apoptosis of Human Arterial Smooth Muscle Cells via A_{2b}-Purinoceptor. *Circulation Research*, 86(1), 76–85.
- Phillis, J. W., & Wu, P. H. (1982). The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology*, 72(2), 179–87.
- Pinto-Duarte, A., Coelho, J. E., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (2005). Adenosine A_{2A} receptors control the extracellular levels of adenosine through modulation of nucleoside transporters activity in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 93(3), 595–604.
- Pitts, E. V., Potluri, S., Hess, D. M., & Balice-Gordon, R. J. (2006). Neurotrophin and Trk-mediated signaling in the neuromuscular system. *International Anesthesiology Clinics*, 44(2), 21–76.
- Plomp, J. J., Morsch, M., Phillips, W. D., & Verschuuren, J. J. G. M. (2015). Electrophysiological analysis of neuromuscular synaptic function in myasthenia gravis patients and animal models. *Experimental Neurology*, 1–14.
- Popoli, P., & Peponi, R. (2012). Potential therapeutic relevance of adenosine A_{2B} and A_{2A} receptors in the central nervous system. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 11(6), 664–74.
- Poucher, S. M., Keddie, J. R., Singh, P., Stoggall, S. M., Caulkett, P. W., Jones, G., & Coll, M. G. (1995). The in vitro pharmacology of ZM 241385, a potent, non-xanthine A_{2A} selective adenosine receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 115(6), 1096–102.
- Pousinha, P. A., José Diogenes, M., Alexandre Ribeiro, J., & Sebastião, A. M. (2006). Triggering of BDNF facilitatory action on neuromuscular transmission by adenosine A_{2A}

- receptors. *Neuroscience Letters*, 404(1-2), 143–147.
- Pousinha, P. A., Correia, A. M., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2010). Predominance of Adenosine Excitatory over Inhibitory Effects on Transmission at the Neuromuscular Junction of Infant Rats. *Pharmacology*, 332(1), 153–163.
- Pousinha, P. A., Correia, A. M., Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2012). Neuromuscular transmission modulation by adenosine upon aging. *Neurobiology of Aging*, 33(12), 2869–2880.
- Proctor, W. R., & Dunwiddie, T. V. (1987). Pre- and postsynaptic actions of adenosine in the in vitro rat hippocampus. *Brain Research*, 426(1), 187–90.
- Protti, D. A., Szczupak, L., Scornik, F. S., & Uchitel, O. D. (1991). Effect of omega-conotoxin GVIA on neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *Brain Research*, 557(1-2), 336–9.
- Protti, D. A., & Uchitel, O. D. (1993). Transmitter release and presynaptic Ca^{2+} currents blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Neuroreport*, 5(3), 333–6.
- Protti, D. A., Reisin, R., Mackinley, T. A., & Uchitel, O. D. (1996). Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology*, 46(5), 1391–6.
- Pu, Y., Peach, M. L., Garfield, S. H., Wincovitch, S., Marquez, V. E., & Blumberg, P. M. (2006). Effects on Ligand Interaction and Membrane Translocation of the Positively Charged Arginine Residues Situated along the C1 Domain Binding Cleft in the Atypical Protein Kinase C Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33773–33788.
- Puffinbarger, N. K., Hansen, K. R., Resta, R., Laurent, A. B., Knudsen, T. B., Madara, J. L., & Thompson, L. F. (1995). Production and characterization of multiple antigenic peptide antibodies to the adenosine A_{2b} receptor. *Molecular Pharmacology*, 47(6), 1126–32.
- Pull, I., & McIlwain, H. (1972). Adenine derivatives as neurohumoral agents in the brain. The quantities liberated on excitation of superfused cerebral tissues. *The Biochemical Journal*, 130(4), 975–81.
- Q**
- Qin, J., Liang, J., & Ding, M. (2014). Perlecan antagonizes collagen IV and ADAMTS9/GON-1 in restricting the growth of presynaptic boutons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(31), 10311–24.
- Quastel, D. M., Hackett, J. T., & Cooke, J. D. (1971). Calcium: is it required for transmitter secretion? *Science (New York, N.Y.)*, 172(3987), 1034–6.
- Queiroz, G., Talaia, C., & Gonçalves, J. (2003). Adenosine A_{2A} receptor-mediated facilitation of noradrenaline release involves protein kinase C activation and attenuation of presynaptic inhibitory receptor-mediated effects in the rat

- vas deferens. *Journal of Neurochemistry*, 85(3), 740–8.
- Quezada, C., Garrido, W., Oyarzún, C., Fernández, K., Segura, R., Melo, R., Casanello, P., Sobrevia, L., & San Martín, R. (2013). 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228(3), 602–8.
- R**
- Rafael, J. A., Townsend, E. R., Squire, S. E., Potter, A. C., Chamberlain, J. S., & Davies, K. E. (2000). Dystrophin and utrophin influence fiber type composition and post-synaptic membrane structure. *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1357–67.
- Rajagopal, R., Chen, Z.-Y., Lee, F. S., & Chao, M. V. (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(30), 6650–6658.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413–92.
- Ramakrishnan, N. a, Drescher, M. J., & Drescher, D. G. (2012). The SNARE complex in neuronal and sensory cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 50(1), 58–69.
- Ramkumar, V., Stiles, G. L., Beaven, M. A., & Ali, H. (1993). The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(23), 16887–90.
- Rebola, N., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2002). Transducing system operated by adenosine A_{2A} receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus, 454, 31–38.
- Rebola, N., Pinheiro, P. C., Oliveira, C. R., Malva, J. O., & Cunha, R. a. (2003). Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Research*, 987(1), 49–58.
- Rebola, N., Rodrigues, R. J., Lopes, L. V., Richardson, P. J., Oliveira, C. R., & Cunha, R. a. (2005a). Adenosine A₁ and A_{2A} receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133(1), 79–83.
- Rebola, N., Rodrigues, R. J., Oliveira, C. R., & Cunha, R. a. (2005b). Different roles of adenosine A₁, A_{2A} and A₃ receptors in controlling kainate-induced toxicity in cortical cultured neurons. *Neurochemistry International*, 47(5), 317–325.
- Redman, R. S., & Silinsky, E. M. (1994). ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 477 (Pt 1), 117–27.
- Ren, J., & Harty, R. F. (1994). Presynaptic muscarinic receptors modulate acetylcholine release from rat antral mucosal/submucosal nerves.

- Digestive Diseases and Sciences*, 39(5), 1099–106.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Stehle, J. H., & Rivkees, S. A. (1991). Molecular cloning and characterization of a rat A₁-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(8), 1037–48.
- Ribeiro, J. a, & Walker, J. (1975). The effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on transmission at the rat and frog neuromuscular junctions. *British Journal of Pharmacology*, 54(2), 213–8.
- Ribeiro, J. A., & Sebastião, A. M. (1987). On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 384, 571–85.
- Ribeiro, J. A. (1995). Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacology & Toxicology*, 77(5), 299–305
- Ribeiro, J. A., Cunha, R. A., Correia-de-Sá, P., & Sebastião, A. M. (1996). Purinergic regulation of acetylcholine release. *Progress in Brain Research*, 109, 231–41.
- Richmond, J. E., & Jorgensen, E. M. (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the C. elegans neuromuscular junction. *Nature Neuroscience*, 2(9), 791–7.
- Ritzel, M.W., Yao, S. Y., Huang, M. Y., Elliot, J. F., Cass, C. E. & Young J. D. (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding human Na⁺-nucleoside cotransporter (hCNT1). *American Journal Physiological*, 272(2 Pt1):C707-14.
- Rivkees, S. A. (1994). Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology*, 135(6), 2307–13.
- Rivkees, S. A., Price, S. L., & Zhou, F. C. (1995). Immunohistochemical detection of A₁ adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Research*, 677(2), 193–203.
- Rivkees, S. A., Thevananther, S., & Hao, H. (2000). Are A₃ adenosine receptors expressed in the brain? *Neuroreport*, 11(5), 1025–30.
- Rivkees, S. a, Zhao, Z., Porter, G., & Turner, C. (2001). Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(1-2), 160–71.
- Robitaille, R., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J., & Charlton, M. P. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron*, 11(4), 645–55.
- Robitaille, R. (1995). Purinergic receptors and their activation by endogenous purines at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(11), 7121–31.

Bibliografia/Bibliography

- Robitaille, R., Bourque, M. J., & Vandaele, S. (1996). Localization of L-type Ca^{2+} channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(1), 148–58.
- Robitaille, R., Jahromi, B. S., & Charlton, M. P. (1997). Muscarinic Ca^{2+} responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, *504*;Pt 2, 337–47.
- Rodrigues, R. J., Canas, P. M., Lopes, L. V., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2008). Modification of adenosine modulation of acetylcholine release in the hippocampus of aged rats. *Neurobiology of Aging*, *29*(10), 1597–601.
- Rosato Siri, M. D., & Uchitel, O. D. (1999). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at neonatal rat neuromuscular junctions. *The Journal of Physiology*, *514*;Pt 2, 533–40.
- Rosenmund, C., & Stevens, C. F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, *16*(6), 1197–207.
- Rosi, S., McGann, K., Hauss-Wegrzyniak, B., & Wenk, G. L. (2004). The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine $\text{A}_{2\text{B}}$ receptors. *Journal of Neurochemistry*, *86*(1), 220–227.
- Rosin, D. L., Robeva, A., Woodard, R. L., Guyenet, P. G., & Linden, J. (1998). Immunohistochemical localization of adenosine $\text{A}_{2\text{A}}$ receptors in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, *401*(2), 163–86.
- Rousse, I., & Robitaille, R. (2006). Calcium signaling in Schwann cells at synaptic and extra-synaptic sites: active glial modulation of neuronal activity. *Glia*, *54*(7), 691–9.
- Rousse, I., St-Amour, A., Darabid, H., & Robitaille, R. (2010). Synapse-glia interactions are governed by synaptic and intrinsic glial properties. *Neuroscience*, *167*(3), 621–32.
- Roux, P. P., & Barker, P. A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology*, *67*(3), 203–33.
- Royle, S. J., & Lagnado, L. (2010). Clathrin-mediated endocytosis at the synaptic terminal: bridging the gap between physiology and molecules. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *11*(12), 1489–97.
- Ryzhov, S., Novitskiy, S. V., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A. E., Carbone, D. P., Biaggioni, I., Dikov, M. M., & Feoktistov, I. (2008). Host $\text{A}_{2\text{B}}$ Adenosine Receptors Promote Carcinoma Growth 1, *10*(9), 987–995.

S

- Sachdeva, S., & Gupta, M. (2013). Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi*

- Pharmaceutical Society*, 21(3), 245–53.
- Salgado, A. I., Cunha, R. A., & Ribeiro, J. A. (2000). Facilitation by P2 receptor activation of acetylcholine release from rat motor nerve terminals: interaction with presynaptic nicotinic receptors. *Brain Research*, 877(2), 245–250.
- Salpeter, M. M., & Loring, R. H. (1985). Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Progress in Neurobiology*, 25(4), 297–325.
- Salpeter, M. (1987). *The vertebrate neuromuscular junction*. Ed. Alan R Liss, Inc., New York.
- Salvatore, C. A., Jacobson, M. A., Taylor, H. E., Linden, J., & Johnson, R. G. (1993). Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), 10365–9.
- Sandoval-Romero, A., & Félix-Grijalva, R. (2003). Cerebellar ataxia and absence epilepsy: genes, channels, neurons and mice. *Revista de Neurología*, 37(5), 447–53.
- Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. 389–442.
- Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(11), 791–805.
- Santafé, M. M., Urbano, F. J., Lanuza, M. A., & Uchitel, O. D. (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), 227–34.
- Santafé, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Uchitel, O. D., & Tomás, J. (2001). Calcium channels coupled to neurotransmitter release at dually innervated neuromuscular junctions in the newborn rat. *Neuroscience*, 102(3), 697–708.
- Santafé, M. M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M. A., Uchitel, O. D., & 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(1), 119–127.
- Santafé, M., Salon, I., Garcia, N., Lanuza, M. A., Uchitel, O. D., & Tomàs, J. (2004). Muscarinic autoreceptors related with calcium channels in the strong and weak inputs at polyinnervated developing rat neuromuscular junctions. *Neuroscience*, 123(1), 61–73.
- Santafé, M. M., Lanuza, M. A., 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, M. M., Lanuza, M. A., Garcia, N., & Tomàs, J. (2006). Muscarinic autoreceptors modulate transmitter release through protein kinase C and protein kinase A in the rat motor nerve terminal. *The European Journal of Neuroscience*, 23(8), 2048–56.
- Santafé, M. M., Lanuza, M. A., Garcia, N., Tomàs, M., & Tomàs, J. (2007). Coupling of presynaptic muscarinic autoreceptors to serine kinases in low and high release conditions on the rat motor nerve terminal. *Neuroscience*, 148(2), 432–40.
- Santafé, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Tomàs, M., & Tomàs, J. (2009). Interaction between protein kinase C and protein kinase A can modulate transmitter release at the rat neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience Research*, 87(3), 683–90.
- Santafé, M. M., Garcia, N., Tomàs, M., Obis, T., Lanuza, M. A., Besalduch, N., & Tomàs, J. (2014). The interaction between tropomyosin-related kinase B receptors and serine kinases modulates acetylcholine release in adult neuromuscular junctions. *Neuroscience Letters*, 561, 171–175.
- Santos, D. A., Salgado, A. I., & Cunha, R. A. (2003). ATP is released from nerve terminals and from activated muscle fibres on stimulation of the rat phrenic nerve. *Neuroscience Letters*, 338(3), 225–8.
- Sardari, S., Pourmorad, F., Tiemoa, A., Nam, N., & Parang, K. (2003). Protein Kinases and their Modulation in the Central Nervous System. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 3(4), 341–364.
- Sarges, R., Howard, H. R., Browne, R. G., Lebel, L. A., Seymour, P. A., & Koe, B. K. (1990). 4-Amino[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines. A novel class of potent adenosine receptor antagonists and potential rapid-onset antidepressants. *Journal of Medicinal Chemistry*, 33(8), 2240–54.
- Saura, J., Angulo, E., Ejarque, A., Casadó, V., Tusell, J. M., Moratalla, R., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Lluís, C., Franco, R., & Serratos, J. (2005). Adenosine A_{2A} receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *Journal of Neurochemistry*, 95(4), 919–929.
- Schindler, M., Harris, C. A., Hayes, B., Papotti, M., & Humphrey, P. P. (2001). Immunohistochemical localization of adenosine A₁ receptors in human brain regions. *Neuroscience Letters*, 297(3), 211–5.
- Schöneberg, T., Schulz, A., & Gudermann, T. (2002). The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 144, 143–227.
- Schubert, P., Komp, W., & Kreutzberg, G. W. (1979). Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. *Brain Research*, 168(2), 419–24.

- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2000). Human Adenosine A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ Receptors Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells All Mediate the Phosphorylation of Extracellular-Regulated Kinase 1/2, *58*(3), 477–482.
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2002). Diverse inhibitors of intracellular signalling act as adenosine receptor antagonists. *Cellular Signalling*, *14*(2), 109–13.
- Schulte, G., & Fredholm, B. B. (2003). The G(s)-coupled adenosine A_{2B} receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38. *Experimental Cell Research*, *290*(1), 168–76.
- Schwaninger, M., Neher, M., Viegas, E., Schneider, A., & Spranger, M. (1997). Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *Journal of Neurochemistry*, *69*(3), 1145–50.
- Schwartz, A. D., Whitacre, C. L., Lin, Y., & Wilson, D. F. (2003). Adenosine inhibits N-type calcium channels at the rat neuromuscular junction. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, *30*(3), 174–7.
- Schwarz, T. L. (2006). Transmitter release at the neuromuscular junction. *International Review of Neurobiology*, *75*, 105–44.
- Schweizer, F. E., & Ryan, T. A. (2006). The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(3), 298–304.
- Scott, L. J., Bacou, F., & Sanes, J. R. (1988). A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *8*(3), 932–44.
- Scott, R. H., & Dolphin, A. C. (1989). G-protein regulation of neuronal voltage-activated calcium currents. *General Pharmacology*, *20*(6), 715–20.
- Searl, T. J., & Silinsky, E. M. (2003). Phorbol esters and adenosine affect the readily releasable neurotransmitter pool by different mechanisms at amphibian motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, *553*(Pt 2), 445–456.
- Searl, T. J., & Silinsky, E. M. (2005). Modulation of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent miniature endplate potentials by phorbol ester and adenosine in frog. *British Journal of Pharmacology*, *145*(7), 954–62.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1985). Enhancement of transmission at the frog neuromuscular junction by adenosine deaminase: evidence for an inhibitory role of endogenous adenosine on neuromuscular transmission. *Neuroscience Letters*, *62*(2), 267–70.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1988). On the adenosine receptor and adenosine inactivation at the rat diaphragm neuromuscular junction.

- British Journal of Pharmacology*, 94(1), 109–20
- Rossiiskaia Akademiia Nauk, 92(6), 761–70.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1990). Interactions between adenosine and phorbol esters or lithium at the frog neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology*, 100(1), 55–62.
- Shakirzyanova, A. V, Bukharaeva, E. A., Nikolsky, E. E., & Giniatullin, R. A. (2006). Negative cross-talk between presynaptic adenosine and acetylcholine receptors. *The European Journal of Neuroscience*, 24(1), 105–15.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (1996). Adenosine A₂ receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 48(3), 167–89.
- Sheardown, M. J. (2002). Muscarinic M 1 receptor agonists and M 2 receptor antagonists as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12(6), 863–870.
- Sebastião, A. M., Macedo, M. P., & Ribeiro, J. A. (2000). Tonic activation of A_{2A} adenosine receptors unmasks, and of A₁ receptors prevents, a facilitatory action of calcitonin gene-related peptide in the rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology*, 129(2), 374–80.
- Sheng, Z. H., Rettig, J., Takahashi, M., & Catterall, W. A. (1994). Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron*, 13(6), 1303–13.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(9), 341–346.
- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014, January). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 2024–52.
- Sebastião, A. M., & Ribeiro, J. A. (2009). Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (193), 471–534.
- Silinsky, E. M. (1980). Evidence for specific adenosine receptors at cholinergic nerve endings. *British Journal of Pharmacology*, 71(1), 191–4.
- Shakirzyanova, A. V, Bukharaeva, E. A., Giniatullin, R. A., & Nikol'skiĭ, E. E. (2006). [Mechanism of carbachol and adenosine action on spontaneous quantal mediator release at frog neuromuscular junction]. *Rossiiskii Fiziologicheskii Zhurnal Imeni I.M. Sechenova /*
- Silinsky, E. M. (1981). On the calcium receptor that mediates depolarization-secretion coupling at cholinergic motor nerve terminals. *British Journal of Pharmacology*, 73(2), 413–29.
- Silinsky, E. M. (1984). On the mechanism by which adenosine receptor activation inhibits the release of

- acetylcholine from motor nerve endings. *The Journal of Physiology*, 346, 243–56.
- Silinsky, E. M. (1985). The biophysical pharmacology of calcium-dependent acetylcholine secretion. *Pharmacological Reviews*, 37(1), 81–132.
- Silinsky, E. M. (1986). Inhibition of transmitter release by adenosine: are Ca^{2+} currents depressed or are the intracellular effects of Ca^{2+} impaired? *Trends in Pharmacological Sciences*, 7, 180–185.
- Silinsky, E. M. (1991). Purinergic effects in autonomic ganglia, in *Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators Cell Function*. (J. W. ed. C. P. Phillis, Ed.) pp.319-327.
- Silinsky, E. M. (2004). Adenosine decreases both presynaptic calcium currents and neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 2), 389–401.
- Silinsky, E. M. (2005). Modulation of calcium currents is eliminated after cleavage of a strategic component of the mammalian secretory apparatus. *The Journal of Physiology*, 566(Pt 3), 681–8.
- Silinsky, E. M., & Solsona, C. S. (1992). Calcium currents at motor nerve endings: absence of effects of adenosine receptor agonists in the frog. *The Journal of Physiology*, 457, 315–28.
- Sjoberg, T. J., Kornev, A. P., & Taylor, S. S. (2010). Dissecting the cAMP-inducible allosteric switch in protein kinase A R1alpha. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 19(6), 1213–21.
- Slater, C. R., Lyons, P. R., Walls, T. J., Fawcett, P. R., & 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: A Journal of Neurology*, 115 Pt 2, 451–78.
- Slutsky, I., Parnas, H., & Parnas, I. (1999). Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*, 514 (Pt 3, 769–82.
- Smith, D. O. (1991). Sources of adenosine released during neuromuscular transmission in the rat. *The Journal of Physiology*, 432, 343–54.
- Socodato, R., Brito, R., Calaza, K. C., & Paes-de-Carvalho, R. (2011). Developmental regulation of neuronal survival by adenosine in the in vitro and in vivo avian retina depends on a shift of signaling pathways leading to CREB phosphorylation or dephosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, 116(2), 227–39.
- Song, W. J., Tkatch, T., & Surmeier, D. J. (2000). Adenosine receptor expression and modulation of Ca^{2+} channels in rat striatal cholinergic interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 83(1), 322–32.

Bibliografia/Bibliography

- Sorg, O., & Magistretti, P. J. (1991). Characterization of the glycogenolysis elicited by vasoactive intestinal peptide, noradrenaline and adenosine in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Brain Research*, 563(1-2), 227–33.
- Spafford, J. D., Chen, L., Feng, Z.-P., Smit, A. B., & Zamponi, G. W. (2003). Expression and modulation of an invertebrate presynaptic calcium channel alpha1 subunit homolog. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21178–87.
- Spychala, J., Datta, N. S., Takabayashi, K., Datta, M., Fox, I. H., Gribbin, T., & Mitchell, B. S. (1996). Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1232–7.
- Stanley, E. F. (1993). Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron*, 11(6), 1007–11.
- Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Lee, J. J., Weaver, D. R., Deeds, J. D., & Reppert, S. M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A₂-adenosine receptor subtype. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(3), 384–93.
- Stevens, C. F., & Williams, J. H. (2007). Discharge of the readily releasable pool with action potentials at hippocampal synapses. *Journal of Neurophysiology*, 98(6), 3221–9.
- Stoop, R., & Poo, M. M. (1995). Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5198), 695–9.
- Straub, V., & Campbell, K. P. (1997). Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Current Opinion in Neurology*, 10(2), 168–75.
- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533), 645–53.
- Südhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 509–47.
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron*, 75(1), 11–25.
- Südhof, T. C. (2014). The molecular machinery of neurotransmitter release (nobel lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(47), 12696–717.
- Sugiura, Y., Woppmann, A., Miljanich, G. P., & Ko, C. P. (1995). A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 24(1), 15–27.
- Suzuki, T., Namba, K., Mizuno, N., & Nakata, H. (2013). Hetero-oligomerization and specificity changes of G protein-coupled purinergic receptors: novel insight into diversification of signal transduction. *Methods in Enzymology*, 521, 239–57.

- Svensson, A. L., Alafuzoff, I., & Nordberg, A. (1992). Characterization of muscarinic receptor subtypes in Alzheimer and control brain cortices by selective muscarinic antagonists. *Brain Research*, 596(1-2), 142–8.
- Swope, S. L., Moss, S. J., Raymond, L. A., & Haganir, R. L. (1999). Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, 33, 49–78.
- Synowitz, M., Glass, R., Färber, K., Markovic, D., Kronenberg, G., Herrmann, K., Schnermann, J., Nolte, C., van Rooijen, N., Kiwit, J., Kettenmann, H. (2006). A₁ Adenosine Receptors in Microglia Control Glioblastoma-Host Interaction. *Cancer Research*, 66(17), 8550–8557.
- T**
- Takamori, M. (2012). Structure of the neuromuscular junction: function and cooperative mechanisms in the synapse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1274, 14–23.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Kingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., & Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831–46.
- Tanaka, C., & Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 551–67.
- Tan-Allen, K. Y., Sun, X. C., & Bonanno, J. a. (2005). Characterization of adenosine receptors in bovine corneal endothelium. *Experimental Eye Research*, 80(5), 687–96.
- 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.*
- Tata, A. M., Velluto, L., D'Angelo, C., & Reale, M. (2014). Cholinergic system dysfunction and neurodegenerative diseases: cause or effect? *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 13(7), 1294–303.
- Tebano, M. T., Martire, A., Potenza, R. L., Grò, C., Pepponi, R., Armida, M., Domenici, M. R. Schwarzschild, M.A, Chen, J. F., & Popoli, P. (2008). Adenosine A_{2A} receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 104(1), 279–286.
- Tebano, M. T., Martire, A., Chiodi, V., Ferrante, A., & Popoli, P. (2010). Role of adenosine A_{2A} receptors in modulating synaptic functions and brain levels of BDNF: a possible key mechanism in the pathophysiology of Huntington's disease. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1768–82.
- Thakkar, M. M., Winston, S., & Mccarley, R. W. (2002). Short communication Orexin neurons of the hypothalamus

Bibliografia/Bibliography

- express adenosine A₁ receptors, 944, 190–194.
- Thompson, S. M., Haas, H. L., & Gähwiler, B. H. (1992). Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *The Journal of Physiology*, 451, 347–63.
- Tilley, S. L., Wagoner, V. A., Salvatore, C. A., Jacobson, M. A., & Koller, B. H. (2000). Adenosine and inosine increase cutaneous vasopermeability by activating A(3) receptors on mast cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 361–7.
- Timóteo, M. A., Faria, M., & Correia-de-Sá, P. (2003). Endogenous adenosine prevents post-tetanic release facilitation mediated by $\alpha 3\beta 2$ nicotinic autoreceptors. *European Journal of Pharmacology*, 464(2-3), 115–125.
- Titulaer, M. J., Lang, B., & Verschuuren, J. J. (2011). Lambert-Eaton myasthenic syndrome: from clinical characteristics to therapeutic strategies. *The Lancet. Neurology*, 10(12), 1098–107.
- Todd, K. J., & Robitaille, R. (2006a). Neuron-glia interactions at the neuromuscular synapse. *Novartis Foundation Symposium*, 276, 222–9; discussion 229–37, 275–81.
- Todd, K. J., & Robitaille, R. (2006b). Purinergic modulation of synaptic signalling at the neuromuscular junction. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 452(5), 608–14.
- Tokuyasu, K. T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *The Journal of Cell Biology*, 57(2), 551–65.
- Tokuyasu, K. T. (1980). Immunocytochemistry on ultrathin frozen sections. *The Histochemical Journal*, 12(4), 381–403.
- Tomàs, J., Lanuza, M. A., Santafé, M., Fenoll-Brunet, M. R., & Garcia, N. (2000). Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histology and Histopathology*, 15(1), 43–52.
- Tomàs, J., Santafé, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Tomàs, M., Besalduch, N., Obis, T., Priego, M., & Hurtado, E. (2014). Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience Research*, 92(5), 543–554.
- Tomàs, M. (2010). Tesi doctoral. Implicació de les neurotrofines en el desenvolupament i consolidació de les sinapsis neuromusculars. Universitat Rovira i Virgili.
- Trachtenberg, J. T., & Thompson, W. J. (1997). Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(16), 6243–55.
- Trincavelli, M. L., Marroni, M., Tuscano, D., Ceruti, S., Mazzola, A., Mitro, N., Abbracchio, M. P., Martini, C.

- (2004). Regulation of A_{2B} adenosine receptor functioning by tumour necrosis factor α in human astroglial cells. *Journal of Neurochemistry*, 91(5), 1180–90.
- Tsai, W., Morielli, a D., & Peralta, E. G. (1997). The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *The EMBO Journal*, 16(15), 4597–4605.
- U**
- Uchitel, O. D., Protti, D. A., Sanchez, V., Cherksey, B. D., Sugimori, M., & Llinás, R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3330–3.
- Ugenti, C., De Stefano, M. E., Costantino, M., Loreti, S., Pisano, A., Avallone, B., Talora, C., Magnaghi, V., & Tata, A. M. (2014). M2 muscarinic receptor activation regulates Schwann cell differentiation and myelin organization. *Developmental Neurobiology*, 74(7), 676–91.
- Urbano, F. J., Depetris, R. S., & Uchitel, O. D. (2001). Coupling of L-type calcium channels to neurotransmitter release at mouse motor nerve terminals. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 441(6), 824–31.
- Urbano, F. J., Piedras-Rentería, E. S., Jun, K., Shin, H.-S., Uchitel, O. D., & Tsien, R. W. (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca²⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), 3491–6.
- Urbano, F. J., Pagani, M. R., & Uchitel, O. D. (2008). Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 201-202, 136–44.
- V**
- Van Calker, D., Müller, M., & Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of Neurochemistry*, 33(5), 999–1005.
- Van den Bergen, J. C., Hiller, M., Böhringer, S., Vijfhuizen, L., Ginjaar, H. B., Chaouch, A., Bushby, K., Straub, V., Scoto, M., Cirak, S., Humbertclaude, V., Claustres, M., Scotton, C., Passarelli, C., Lochmüller, H., Muntoni, F., Tuffery-Giraud, S., Ferlini, A., Aartsma-Rus, A. M., Verschuuren, J. J., t Hoen, P. A., & Spitali, P. (2014). Validation of genetic modifiers for Duchenne muscular dystrophy: a multicentre study assessing SPP1 and LTBP4 variants. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*.
- Van der Zee, E. a, & Keijser, J. N. (2011). Localization of pre- and postsynaptic cholinergic markers in rodent forebrain: a brief history and comparison of rat and mouse. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 356–66.

- Vannucchi, M. G., & Pepeu, G. (1995). Muscarinic receptor modulation of acetylcholine release from rat cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience Letters*, *190*(1), 53–6.
- Vargas, G. A., & Von Zastrow, M. (2004). Identification of a novel endocytic recycling signal in the D1 dopamine receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(36), 37461–9.
- Vazquez, J. F., Clement, H.-W., Sommer, O., Schulz, E., & van Calker, D. (2008). Local stimulation of the adenosine A_{2B} receptors induces an increased release of IL-6 in mouse striatum: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, *105*(3), 904–9.
- Veggetti, M., Muchnik, S., & Losavio, A. (2008). Effect of purines on calcium-independent acetylcholine release at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*, *154*(4), 1324–36.
- Vergauwen, L., Hespel, P., & Richter, E. A. (1994). Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulin and by contractions in rat skeletal muscle. *The Journal of Clinical Investigation*, *93*(3), 974–981.
- Vieira, C., Duarte-Araújo, M., Adães, S., Magalhães-Cardoso, T., & Correia-de-Sá, P. (2009). Muscarinic M(3) facilitation of acetylcholine release from rat myenteric neurons depends on adenosine outflow leading to activation of excitatory A(2A) receptors. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *21*(10), 1118–e95.
- Vieira, C., Ferreirinha, F., Silva, I., Duarte-Araújo, M., & Correia-De-Sá, P. (2011). Localization and function of adenosine receptor subtypes at the longitudinal muscle-Myenteric plexus of the rat ileum. *Neurochemistry International*, *59*(7), 1043–1055.
- Villar-Menéndez, I., Porta, S., Buira, S. P., Pereira-Veiga, T., Díaz-Sánchez, S., Albasanz, J. L., Ferrer, I., Martín, M., & Barrachina, M. (2014). Increased striatal adenosine A_{2A} receptor levels is an early event in Parkinson's disease-related pathology and it is potentially regulated by miR-34b. *Neurobiology of Disease*, *69*, 206–14.
- Volkandt, W., & Zimmermann, H. (1986). Acetylcholine, ATP, and proteoglycan are common to synaptic vesicles isolated from the electric organs of electric eel and electric catfish as well as from rat diaphragm. *Journal of Neurochemistry*, *47*(5), 1449–62.
- Volpicelli, L. A., & Levey, A. I. (2004). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Progress in Brain Research*, *145*, 59–66.
- Von Lubitz, D. K. (1997). Adenosine A₃ receptor and brain. A culprit, a hero, or merely yet another receptor? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *825*, 49–67.

- Vrinten, C., van der Zwaag, A. M., Weinreich, S. S., Scholten, R. J. P. M., & Verschuuren, J. J. (2014). Ephedrine for myasthenia gravis, neonatal myasthenia and the congenital myasthenic syndromes. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD010028.
- W**
- Wang, Q., Zhang, B., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2006). MuSK signaling at the neuromuscular junction. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 30(1-2), 223-6.
- Wess, J. (1996). Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10(1), 69-99.
- Wesseling, J. F., & Lo, D. C. (2002). Limit on the role of activity in controlling the release-ready supply of synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(22), 9708-20.
- Wessler, I., Halank, M., Rasbach, J., & Kilbinger, H. (1986). Presynaptic nicotine receptors mediating a positive feed-back on transmitter release from the rat phrenic nerve. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 334(4), 365-72.
- Wessler, I., Eschenbruch, V., Halim, S., & Kilbinger, H. (1987). Presynaptic effects of scopolamine, oxotremorine, noradrenaline and morphine on [3H]acetylcholine release from the myenteric plexus at different stimulation frequencies and calcium concentrations. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 335(6), 597-604.
- West, J. W., Numann, R., Murphy, B. J., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1991). A phosphorylation site in the Na⁺ channel required for modulation by protein kinase C. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5033), 866-8.
- Wiese, S., Jablonka, S., Holtmann, B., Orel, N., Rajagopal, R., Chao, M. V., & Sendtner, M. (2007). Adenosine receptor A_{2A}-R contributes to motoneuron survival by transactivating the tyrosine kinase receptor TrkB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17210-5.
- Williams, M., Braunwalder, A., & Erickson, T. J. (1986). Evaluation of the binding of the A-1 selective adenosine radioligand, cyclopentyladenosine (CPA), to rat brain tissue. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 332(2), 179-83.
- Wilson, D. F., West, A. E., & Lin, Y. (1995). Inhibitory action of nicotinic antagonists on transmitter release at the neuromuscular junction of the rat. *Neuroscience Letters*, 186(1), 29-32.
- Winder, D. G., & Conn, P. J. (1993). Activation of metabotropic glutamate receptors increases cAMP accumulation in hippocampus by potentiating responses to endogenous adenosine. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal*

of the Society for Neuroscience,
13(1), 38–44.

Wittendorp, M. C., Boddeke, H. W. G. M.,
& Biber, K. (2004). Adenosine A3
receptor-induced CCL2 synthesis in
cultured mouse astrocytes. *Glia*,
46(4), 410–8.

Witzemann, V. (2006). Development of
the neuromuscular junction. *Cell
and Tissue Research*, 326(2), 263–
71.

Wright, M. C., Potluri, S., Wang, X.,
Dentcheva, E., Gautam, D., Tessler,
A., Wess, J., Rich, M. M., & Son, Y.-J.
(2009). Distinct muscarinic
acetylcholine receptor subtypes
contribute to stability and growth,
but not compensatory plasticity, of
neuromuscular synapses. *The
Journal of Neuroscience : The Official
Journal of the Society for
Neuroscience*, 29(47), 14942–55.

Wu, L. G., & Betz, W. J. (1998). Kinetics of
synaptic depression and vesicle
recycling after tetanic stimulation of
frog motor nerve terminals.
Biophysical Journal, 74(6), 3003–9.

Wu, P. H., & Phillis, J. W. (1984). Uptake
by central nervous tissues as a
mechanism for the regulation of
extracellular adenosine
concentrations. *Neurochemistry
International*, 6(5), 613–32.

X

Xue, M., Giagtzoglou, N., & Bellen, H. J.
(2011). Dueling Ca²⁺ sensors in
neurotransmitter release. *Cell*,
147(3), 491–3.

Y

Yaar, R., Jones, M. R., Chen, J.-F., & Ravid,
K. (2005). Animal models for the
study of adenosine receptor
function. *Journal of Cellular
Physiology*, 202(1), 9–20.

Yee, V. C., Pestronk, A., Alderson, K., &
Yuan, C. M. (1988). Regional
heterogeneity in the distal motor
axon: three zones with distinctive
intrinsic components. *Journal of
Neurocytology*, 17(5), 649–56.

Yokoyama, C. T., Myers, S. J., Fu, J.,
Mockus, S. M., Scheuer, T., &
Catterall, W. A. (2005). Mechanism
of SNARE protein binding and
regulation of Cav2 channels by
phosphorylation of the synaptic
protein interaction site. *Molecular
and Cellular Neuroscience*, 28(1), 1–
17.

Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y., &
Nakata, H. (2002). Hetero-
oligomerization of adenosine A₁
receptors with P2Y1 receptors in rat
brains. *FEBS Letters*, 531(2), 299–
303.

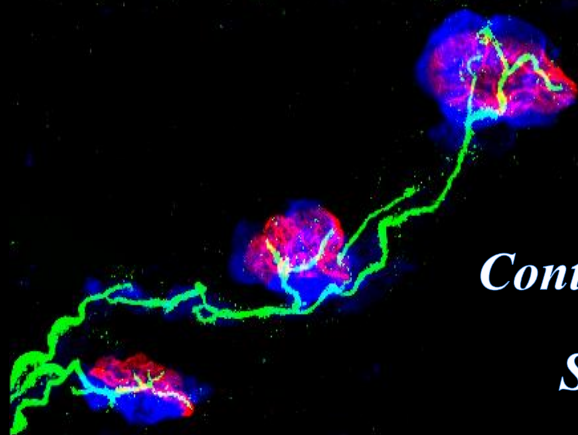
Yu, W., & Miller, R. F. (1995).
Hyperosmotic activation of
transmitter release from presynaptic
terminals onto retinal ganglion cells.
Journal of Neuroscience Methods,
62(1-2), 159–68.

Yu, W., Zacharia, L. C., Jackson, E. K., &
Apodaca, G. (2006). Adenosine
receptor expression and function in
bladder uroepithelium. *American
Journal of Physiology. Cell
Physiology*, 291(2), C254–65.

Z

- Zeitlin, R., Patel, S., Burgess, S., Arendash, G. W., & Echeverria, V. (2011). Caffeine induces beneficial changes in PKA signaling and JNK and ERK activities in the striatum and cortex of Alzheimer's transgenic mice. *Brain Research*, 1417, 127–36.
- Zhan, W.-Z., Mantilla, C. B., & Sieck, G. C. (2003). Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 55(6), 617–24.
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin. *Neuron*, 60(2), 285–297.
- Zhang, W., Coldefy, A.-S., Hubbard, S. R., & Burden, S. J. (2011). Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK). *The Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 40624–30.
- Zhou, A.-M., Li, W.-B., Li, Q.-J., Liu, H.-Q., Feng, R.-F., & Zhao, H.-G. (2004). A short cerebral ischemic preconditioning up-regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats. *Neuroscience Research*, 48(4), 397–404.
- Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L., & Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7432–6.
- Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A., & Song, W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Research Bulletin*, 37(4), 417–29.
- Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., & Heine, P. (1998). New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry International*, 32(5-6), 421–5.
- Zink, A., Scherübl, H., Höflich, M., Hescheler, J., & Raue, F. (1995). Adenosine A₁-receptors inhibit cAMP and Ca²⁺ mediated calcitonin secretion in C-cells. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme*, 27(9), 408–14.
- Zou, A. P., Wu, F., Li, P. L., & Cowley, A. W. (1999). Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension*, 33(1 Pt 2), 511–6.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Contribucions científiques/

Scientific contributions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

Publications:

- Santafé, M. M., **Priego, M.**, Obis, T., Garcia, N., Tomàs, M., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2015). Adenosine receptors and muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *The European Journal of Neuroscience*, 42(2), 1775–87. doi:10.1111/ejn.12922.
- Obis, T., Besalduch, N., Hurtado, E., Nadal, L., Santafé, M. M., Garcia, N., Tomàs, M., **Priego, M.**, Lanuza, MA., & Tomàs, J. (2015). The novel protein kinase C epsilon isoform at the adult neuromuscular synapse: location, regulation by synaptic activity-dependent muscle contraction through TrkB signaling and coupling to ACh release. *Molecular Brain*, 8, 8. doi:10.1186/s13041-015-0098-x
- Garcia, N., **Priego, M.**, Hurtado, E., Obis, T., Santafé, M. M., Tomàs, M., Lanuza, MA., & Tomàs, J. (2014). Adenosine A_{2B} and A₃ receptor location at the mouse neuromuscular junction. *Journal of Anatomy*, 225(1), 109–117. doi:10.1111/joa.12188
- Tomàs, J., Santafé, M. M., Garcia, N., Lanuza, M. A., Tomàs, M., Besalduch, N., Obis, T., **Priego, M.**, & Hurtado, E. (2014). Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation in the neuromuscular synapse. *Journal of Neuroscience Research*, 00. doi:10.1002/jnr.23346
- Lanuza, MA., Santafé, MM, Garcia, N., Besalduch, N., Tomàs, M., Obis, T., Priego, M., Nelson, PG., & Tomàs J. (2014) Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: localization and specific roles in neurotransmission and development. *Journal of Anatomy*, 224(1):61-73. doi: 10.1111/joa.12106. Review.
- Besalduch, N., Lanuza, M. A., Garcia, N., Obis, T., Santafé, M. M., Tomàs, M., **Priego, M.**, & Tomàs, J. (2013). Cellular localization of the atypical isoforms of protein kinase C (αPKCζ/PKMζ and αPKCλ1) on the neuromuscular synapse. *Neuroscience Letters*, 556, 166–9. doi:10.1016/j.neulet.2013.10.006
- Garcia, N., **Priego, M.**, Obis, T., Santafé, M. M., Tomàs, M., Besalduch, N., Lanuza, M. A., & Tomàs, J. (2013). Adenosine A₁ and A_{2A} receptor-mediated modulation of acetylcholine

release in the mice neuromuscular junction. *The European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2229–41. doi:10.1111/ejn.12220

Garcia, N., Santafé, M. M., Tomàs, M., **Priego, M.**, Obis, T., Lanuza, M. A., Besalduch, N. & Tomàs, J. (2012). Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 17(3), 312–323. doi:10.1111/j.1529-8027.2012.00419.x

Garcia, N., Santafé, M. M., Tomàs, M., Lanuza, M. A., 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. *Neuroscience Letters*, 480(2), 127–31. doi:10.1016/j.neulet.2010.06.022

Conferences, posters and oral presentations:

- Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Manuel Santafé, Neus Garcia, Teresa Obis, Marta Tomàs, Mercedes Priego, Nicolau Ortiz, Philip G. Nelson and Josep Tomàs. "Protein kinase C signalling at the neuromuscular junction: A role in synaptic activity and synapse maturation". 125th Anatomical Society meeting-Symposium Motor Neurons and Disease of Motor Neurons, Edinburgh, Scotland, UK. 10-12th July 2012. Paper.
- R. Margalef, M. Sisquella, M. Bosque, C. Romeu, O. Mayoral, S. Monteverde, M. Priego, N. Ortiz, J. Tomàs, M.M. Santafé. "Experimental myofascial trigger points creation in mice". 16 National Congress of Spanish Society of Neuroscience. Granada, Spain 23-25 September 2015. Communication.
- Ramón Margalef, Marc Sisquella, Marc Bosque, Clara Romeu, Orlando Mayoral, Sonia Monterde, Mercedes Priego, Nicolau Ortiz, Josep Tomàs y Manel M. Santafé. "Creación experimental de puntos gatillo miofasciales en ratones". II Jornada de Dolor Miofascial. Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Spain. May 22nd, 2015.
- M. Santafé, M. Priego, T. Obis, N. Garcia, M. Tomàs, M.A. Lanuza, N. Ortiz, E. Hurtado, L. Nadal, J. Tomàs. "Purinergic adenosine receptors and cholinergic muscarinic receptors cooperate in acetylcholine release modulation on neuromuscular synapse". 9th Federation European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- E. Hurtado Caballero, T. Obis, M. Priego, L. Nadal, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Ortiz, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Colocalization of protein kinase A (PKA) subunits and the A kinase anchoring proteins (AKAPs, 9 and 150) in the neuromuscular synapse". 9th Federation European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.
- L. Nadal, E. Hurtado, T. Obis, N. Garcia, M. Priego, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Ortiz, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Blockade of tyrosine kinase receptor B prevents muscle contraction-induced presynaptic nPKC epsilon, cPKC beta I and cPKC alpha increases". 9th

Federation European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.

R. Margalef, O. Mayoral, M. Sisquella, M. Bosque, S. Monterde, M. Priego, N. Ortiz, J.M. Tomàs, M.M. Santafé. "Pathophysiological approach to myofascial pain syndrome in mice". 9th Federation European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.

T. Obis, N. Besalduch, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, E. Hurtado, L. Nadal, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Activity-dependent changes of novel protein kinase C epsilon isoform in the neuromuscular synapse and its coupling to ACh release". 9th Federation European Neuroscience Societies Forum of Neuroscience, Milan, Italy, July 5-9, 2014. Poster.

Margalef, Ramón; Sisquella, Marc; Mayoral, Orlando; Bosque, Marc; Monterde, Sonia; Priego, Mercedes; Ortiz, Nicolau; Tomàs Josep; Santafé, Manel. "Aproximación a la fisiopatología del síndrome del dolor miofascial. I estudio morfológico. I Congreso Multidisciplinar de Ciencias de la Salud. Hospital Universitario de Reus, Spain. April 25-26, 2014. Poster.

Sisquella, Marc; Margalef, Ramón; Mayoral, Orlando; Bosque, Marc; Monterde, Sonia; Priego, Mercedes; Ortiz, Nicolau; Tomàs, Josep; Santafé, Manel. "Aproximación a la fisiopatología del síndrome del dolor miofascial. II estudio morfológico. I Congreso Multidisciplinar de Ciencias de la Salud. Hospital Universitario de Reus, Spain. April 25-26, 2014. Poster

Ortiz, Nicolau; Garcia, Neus; Santafé, Manel M.; Priego, Mercedes; Obis, Teresa; Lanuza, Maria A; Tomàs, Marta; Besalduch, Núria; Tomàs, Josep. "Efecto del Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF) sobre la depresión sináptica provocada por estimulación repetitiva". LXV Annual meeting Spanish Society of Neurology (SEN). Barcelona, Spain. Nov. 19-23, 2013. Poster.

Mercedes Priego, Teresa Obis, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Maria A. Lanuza, Marta Tomàs, Núria Besalduch, Erica Hurtado, Josep Tomàs. "Presynaptic membrane receptors in acetylcholine release modulation on neuromuscular synapse". XV National

Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013.
Poster.

Teresa Obis, Mercedes Priego, Manel M. Santafé, Neus Garcia, Maria A. Lanuza, Marta Tomàs, Núria Besalduch, Erica Hurtado, Josep Tomàs. "Involvement of serine kinases in the modulation of ACh release in the neuromuscular synapse". XV National Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013.
Poster.

E. Hurtado, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Priego, T. Obis, M. Tomàs, N. Besalduch, M.A. Lanuza and J. Tomàs. "Adenosine A_{2B} and A₃ receptors in the mice neuromuscular junction". XV National Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC), Oviedo, Spain. Sept. 25-27, 2013. Poster.

N. Garcia, M. Priego, T. Obis, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Besalduch, M.A. Lanuza, N. Ortiz, J. Tomàs. "Purinerbic modulation of ACh release in the neuromuscular junction, reevaluated". 42nd Meeting of the Society Neuroscience (SfN). New Orleans, LA. Oct.13-17, 2012. Poster.

M.A Lanuza, N. Besalduch, T. Obis, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, N. Ortiz, J. Tomàs. "Exclusive presynaptic location and coupling to ACh release of novel protein kinase C epsilon isoform in the adult rat neuromuscular synapse". 42nd Meeting of the Society Neuroscience (SfN). New Orleans, LA. Oct.13-17, 2012. Poster.

N. Ortiz, T. Obis, N. Besalduch, N. Olguin, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Exclusive presynaptic location and couplint to ACh relase of the novel protein kinase C epsilon isoform in the adult rat neuromuscular synapse". European Journal of Neurology. Volume 19, Supplement1. 16th Congress the European Federation of Neurological Societies (EFNS). Stockholm, Sweden. Sept. 2012. Poster.

Mercedes Priego, Neus Garcia, Teresa Obis, Marta Tomàs, Maria A. Lanuza, Núria Besalduch, Manel M. Santafé and Josep Tomàs. "Exogenous Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Reduces Synaptic Depression During Repetitive Stimulation". VIII Federation of

European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012.
Poster.

Teresa Obis, Neus Garcia, Manel M. Santafé, Mercedes Priego, Marta Tomàs, Núria Besalduch, Maria A. Lanuza and Josep Tomàs. "A₁ and A₂ Adenosine Receptors in the Adult Neuromuscular Junction". VIII Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012. Poster.

Núria Besalduch, Teresa Obis, Manel M. Santafé, Marta Tomàs, Neus Garcia, Mercedes Priego, Nicolau Ortiz, Maria A. Lanuza and Josep Tomàs. "Location, Phosphorylation and Coupling to ACh Release of the Novel Protein Kinase C Epsilon isoform in the Adult Neuromuscular Synapse". VIII Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. Barcelona, Spain. July 14-18, 2012. Poster.

N. Ortiz, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Tomàs, M.A. Lanuza, N. Besalduch, M. Priego, J. Tomàs. "Study of the Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) on acetylcholine release in developing and adult Neuromuscular Junction". 15th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS). Budapest, Hungary. Sept. 11, 2011. Poster.

M. Priego, N. Garcia, M.M. Santafé, M. Tomàs, M.A. Lanuza, N. Besalduch, T. Obis, J. Tomàs. "The Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and the Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) does not acutely change Acetylcholine release in developing and adult rodent Neuromuscular Junction". XIV National Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept 28-30, 2011. Poster.

N. Besalduch, M.A. Lanuza, M. Priego, N. Garcia, M. Tomàs, M.M. Santafé, T. Obis, N. Ortiz, J. Tomàs. "PKA and A-Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) localization in the developing and adult neuromuscular junction". XIV National Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept 28-30, 2011. Poster.

T. Obis, N. Besalduch, N. Termis, M.M. Santafé, M. Tomàs, N. Garcia, M. Priego, M.A. Lanuza, J. Tomàs. "Exclusive presynaptic location and coupling to ACh release of the novel protein kinase C epsilon isoform in adult rat neuromuscular synapse". XIV

National Congress Spanish Society of Neuroscience (SENC). Salamanca, Spain. Sept 28-30, 2011. Poster.

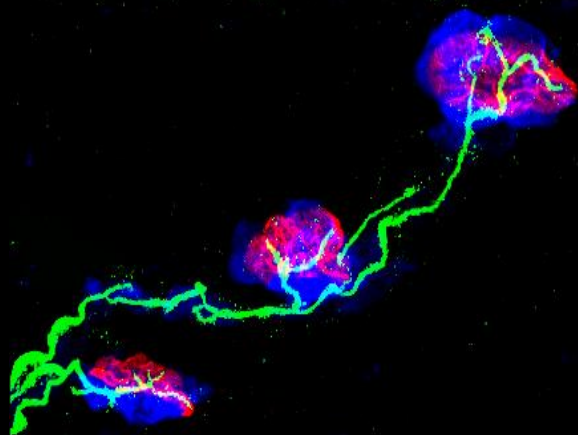
“Transactivation of TrkB through purinergic receptors”. Journal Club. Cardiff School of Biosciences. Cardiff University. Cardiff, UK. August 29, 2014. Coordinator: Professor Yves Barde, MD. Oral presentation.

“Adenosine A₁ and A_{2A} receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction”. Training activities: Neurosciences for Young Researchers. Faculty of Medicine and Health Sciences (URV), Reus, Spain. Oct. 16, 2013. Coordinator: Dr. Manuel Santafé, MD, PhD. Oral presentation.

“Localització dels Receptors d'Adenosina A₁ i A_{2A} en la Unió Neuromuscular durant el Desenvolupament i en l'Etapa Adulta”. Training activities: Neurosciences for Young Researchers. Faculty of Medicine and Health Sciences (URV), Reus, Spain. Mar. 17, 2012. Coordinator: Dr. Manuel Santafé, MD, PhD. Oral presentation.

“Localització dels factors neurotròfics (GDNF i CNTF) i els seus receptors (GFR-alfa i CNTF-Ralfa) en la sinapsi neuromuscular Durant el procés del desenvolupament i en l'adult”. Training activities: Neurosciences for Young Researchers. Faculty of Medicine and Health Sciences (URV), Reus, Spain. Apr. 29, 2011. Coordinator: Dr. Manuel Santafé, MD, PhD. Oral presentation.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016



Annex

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

Agents moduladors utilitzats en els experiments funcionals

A continuació es detalla la nomenclatura completa i el tipus de modulador que s'han utilitzat en els experiments funcionals d'aquesta tesi.

Abbreviation	Nomenclature and kind of modulator
ADO	<i>Adenosine. Unselective adenosine receptors agonist.</i>
ADA	<i>Adenosine deaminase. Enzyme that converts adenosine into inosine.</i>
AT	<i>Atropine. Unselective muscarinic receptors antagonist.</i>
CaC	<i>Calphostin C. PKC inhibitor.</i>
CADO	<i>2-chloroadenosine. Adenosine analogue.</i>
CCPA	<i>2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine. Selective adenosine A₁ receptor agonist.</i>
CGS-21680	<i>2-p-(2-carboxyethyl) phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine. Selective adenosine A_{2A} receptor agonist.</i>
DPCPX	<i>8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. Selective adenosine A₁ receptor antagonist.</i>
H-89	<i>N-[2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide, 2HCl. PKA inhibitor.</i>
MET	<i>Methoctramine. Selective muscarinic M₂ receptor antagonist.</i>
MRS1706	<i>(N-(4-acetylphenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl) phenoxy] acetamide. Selective antagonist of adenosine A_{2B} receptor.</i>
MRS1334	<i>1,4-Dihydro-2-methyl-6-phenyl-4-(phenylethynyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid 3-ethyl-5-[(3nitrophenyl)methyl] ester. Selective antagonist of adenosine A₃ receptor.</i>
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate. PKC activator.</i>
PIR	<i>Pirenzepine. Selective muscarinic M₁ receptor antagonist.</i>
Sp-8-BrcAMP	<i>Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphorothioate, 8-Bromo-, Rp-Isomer, Sodium Salt. PKA activator.</i>
SCH-58261	<i>2-(2-Furanyl)-7-(2-phenylethyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine. Selective adenosine A₁ receptor antagonist.</i>
ω-Aga IVA	<i>ω-Agatoxin IVA. Selective blocker P/Q calcium channel.</i>
8-SPT	<i>8-(p-Sulfophenyl) theophylline hydrate). Unselective adenosine receptors antagonist.</i>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

Agents moduladors addicionals

A continuació es detalla la nomenclatura completa i el tipus de moduladors que no s'han utilitzat en els experiments funcionals d'aquesta tesi però que es mencionen en l'escrit d'aquest treball.

Modulator	Nomenclature and kind of modulator
BAY606583	<i>[2-({6-amino-3,5-dicyano-4-[4-(cyclopropylmethoxy)phenyl]pyridin-2-yl)sulfanyl}acetamide]. Selective adenosine A_{2B} receptor agonist.</i>
CGS-21680C	<i>2-[4-(2-p-carboxyethyl)phenylamino]-5'-N-ethylcarboxamide adenosine. Selective A_{2A} adenosine receptor agonist.</i>
CI-IB-MECA	<i>2-chloro-N(6)-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide. Selective adenosine A₃ receptor agonist.</i>
CPA	<i>6-cyclopentyladenosine. Selective adenosine A₁ receptor agonist</i>
DMPX	<i>3,7-dimethyl-1-propargylxanthine. Selective adenosine A_{2A} receptor antagonist.</i>
DPMA	<i>N6-(2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl)adenosine). Selective adenosine A_{2A} receptor agonist.</i>
EHNA	<i>erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. Adenosine deaminase inhibitor.</i>
H7	<i>1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine. Protein kinase inhibitor. It has ability to inhibit cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent protein kinases (PKA and PKG) protein kinase C (PKC) at roughly equal concentrations.</i>
IB-MECA	<i>N6-(3-Iodobenzyl) adenosine-5'-N-methyluronamide. Selective adenosine A₃ receptor agonist.</i>
L-PIA	<i>N6-(L-Phenylisopropyl)adenosine. Adenosine analogue.</i>
MRS1191	<i>3 Ethyl-5-benzyl-2-methyl-4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-(6)-dihydropyridine-3,5 dicarboxylate. Selective adenosine A₃ receptor antagonist.</i>
MRS1754	<i>[N-(4-cyanophenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1H-purin-8-yl)-phenoxy]acetamide]. Selective adenosine A_{2B} receptor antagonist.</i>

- NECA** *5'-(N-Ethylcarboxamido) adenosin. Selective adenosine A_{2B} receptor agonist.*
- OAG** *1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol. Protein kinase activator.*
- OXO-M** *(oxotremorine-M).N,N,N-Trimethyl-4-(2-oxo-1-pyrolidinyl)-2-butyn-1-ammonium iodide Muscarinic receptor agonist.*
- PDAc** *Phorbol diacetate. Protein kinase activator.*
- PIA** *Phenylisopropyladenosine. Adenosine analogue.*
- R-PIA** *R-N6-phenylisopropyl adenosine. Selective adenosine A₁ receptor agonist.*
- ZM241385** *4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino] ethyl) phenol. Selective adenosine A_{2A} receptor antagonist.*
- 4-DAMP** *1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium iodide. Selective M₃ receptor antagonist.*

Subtypes	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Alternative Names	R _i	A _{2a} , R _a	A _{2b}	
Structural information	326 aa (human)	412 aa (human)	332 aa (human)	318 aa (human)
Receptor selective agonist	Adenosine amine congener (A111) CPA (C8031) CHA (C9901) CCPA (C7938) R-PIA (P4532) CVT-510 S(-)-ENBA (E111)	CGS21680 (C141) DPMA HE-NECA ^a ATL-146e CVT-3146	NECA (E2387)	IB MECA (I146) CI-IB-MECA (C277)
Receptor selective agonist	CPX (C101) CPT (C102) N-0840 WRC-0571	KW 6002 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (C197) SCH-58261 (S4568) ZM241385	XAC ^b (X103) Alloxazine (A28651) MRS 1754 (M6316) MRE 2029-F20	I-ABOPX ^c MRS1191 (M227) MRS1220 (M228) MRS1523 (M1809) VUF5574 (V5888) MRS1292 MRE 3008F20
Signal Transduction Mechanisms	G _{i/o} (cAMP modulation) increased K ⁺ , decreased Ca ²⁺	G _s /G _{oif} (increase cAMP)	G _s /G _q (increase cAMP) increased Ca ²⁺	G _i /G _q (cAMP modulation) increased Ca ²⁺
Radioligands of Choice	[³ H]-CHA [³ H]-CPX [³ H]-R-PIA	[³ H]-CGS21680 [¹²⁵ I]-PAPA-APEC [³ H]-SCH-58261 [³ H]-ZM241385	[³ H]-MRS1754 [³ H]-CPX [³ H]-MRE 2029-F20	[¹²⁵ I]-APNEA [¹²⁵ I]-AB-MECA [³ H]-PSB-11
Tissue distribution	Cortex, hippocampus, kidneys, dorsal horn of spinal cord, eye, adrenal gland, liver, pancreas, adipose tissue, salivary glands, lung esophagus,	Platelets, endothelial cells, striatum, neutrophils spleen, thymus, leukocytes, striatopallidal GABAergic neurons (in caudate-putamen, nucleus accumbens, tuberculum olfactorium), olfactory bulb, heart, lung, blood vessels	Fibroblasts, colon, aorta, mast cells, cecum, bladder, lung, blood vessels, eye, median eminence, adipose tissue, adrenal gland, brain, kidney, liver, ovary, pituitary gland	Eosinophils, heart, lung, pineal, testis, mast cells, lung, spleen (sheep), Thyroid, adrenal gland, spleen (human), liver, kidney, heart, intestine,
Distribució	Cervell, medul·la espinal, cor, testicles i nervis terminals	Cervell, cor, pulmó i melsa	Intestí llarg i vesícula biliar	Pulmó, fetge, cor, testicles i cervell
Physiological Function	Inhibition of neurotransmitter release, bradycardia, ischemic preconditioning	Vasodilatation, inhibition of platelet aggregation, sensorimotor integration	Smooth muscle relaxation, release from mast cells	Ischemic preconditioning
Disease Relevance	Cardiac arrhythmia, diabetes, stroke	Parkinson's disease, inflammation, arthritis, neurodegeneration	Asthma, diabetes	Cardiac ischemia, cancer, arthritis, glaucoma

Taula. Resum dels receptors d'adenosina. Taula adaptada de **Fredholm i cols. (2001)** i de la casa comercial Sigma.

Footnotes:

a) HE-NECA is also a potent agonist at A₃ receptors.

b) NECA and XAC are among the most potent agents at this adenosine receptor subtype. However, these compounds are not subtype selective.

c) Rat A₃ receptor is relatively insensitive to xanthine blockade.

Abbreviations

AB-MECA: N⁶-(4-Aminobenzyl)-9-[5-(methylcarbamoyl)-β-D-ribofuranosyl]adenine
ATL-146e: 4-[3-[6-Amino-9-(5-ethylcarbamoyl-3,4-dihydroxy-tetrahydro-furan-2-yl)-9H-purin-2-yl]-prop-2-ynyl]-cyclohexanecarboxylic acid methyl ester
CCPA: 2-Chloro CPA
CGS21680: 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
CHA: N⁶-Cyclohexyladenosine
CI-IB-MECA: 2-Chloro-N⁶-(3-iodobenzyl)-9-[5-(methylcarbamoyl)-β-D-ribofuranosyl]adenine
CPA: N⁶-Cyclopentyladenosine
CPT: 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine
CPX: 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
CVT-510: N-(3(R)-Tetrahydrofuran-2-yl)-6-aminopurine riboside
CVT-3146: 1-(6-Amino-9-β-D-ribofuranosyl-9H-purin-2-yl)-N-methyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (regadenosine)
DBXRM: 1,3-Dibutylxanthine 7-riboside 5'-N-methylcarboxamide
DPMA: N⁶-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl]adenosine
S(-)-ENBA: (2S)-N⁶-[2-endo-Norbornyl]adenosine
HE-NECA: 2-Hexynyl-adenosine-5'-N-ethyluronamide
I-ABOPX: 3-(3-Iodo-4-aminobenzyl)-8-(4-oxyacetate)-phenyl-1-propyl xanthine
IB-MECA: N⁶-(3-Iodobenzyl)-9-[5-(methylcarbamoyl)-β-D-ribofuranosyl]adenine
KW 6002: (E)-1,3-Diethyl-8-(3,4-dimethoxyphenylethyl)-7-methyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione
MRE 2029-F20: N-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-2-[5-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl]oxy]-acetamide
MRE 3008F20: 5N-(4-methoxyphenylcarbamoyl)amino-8-propyl-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine
MRS 1191: 3-Ethyl 5-benzyl 2-methyl-6-phenyl-4-phenylethynyl-1,4-(±)-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
MRS 1220: 9-Chloro-2-(2-furyl)-5-phenylacetyl amino[1,2,4]-triazolo[1,5-c]quinazoline
MRS 1292: (2R,3R,4S,5S)-2-[N⁶-3-Iodobenzyl)adenos-9'-yl]-7-aza-1-oxa-6-oxospiro[4.4]-nonan-4,5-diol
MRS 1523: 2,3-Diethyl-4,5-dipropyl-6-phenylpyridine-3-thiocarboxylate-5-carboxylate
MRS 1754: 8-[4-[[[(4-Cyano)phenylcarbamoylmethyl]oxy]phenyl]-1,3-di-(n-propyl)xanthine
N-0840: N⁶-Cyclopentyl-9-methyladenine
NECA: N-Ethylcarboxamidoadenosine
PAPA-APEC: 1-[6-Amino-2-[[2-[4-[3-[[2-[[[(4-aminophenyl)acetyl]amino]ethyl]amino]-3-oxopropyl]phenyl]ethyl]amino]-9H-purin-9-yl]-1-deoxy-N-ethyl-β-D-ribofuranuronamide
PIA: R(-)-N⁶-(2-Phenylisopropyl)adenosine
SCH-58261: 5-Amino-7-(β-phenylethyl)-2-(8-furyl)pyrazolo(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidine
VUF 5574: N-(2-Methoxyphenyl)-N'-(2-(3-pyridyl)quinazolin-4-yl)urea
WRC-0571: 8-(N-Methylisopropyl)amino-N-(5'-endohydroxy-endonorbornyl)-9-methyladenine
XAC: 8-[4-[[[(2-Aminoethyl)amino]carbonyl]methyl]oxy]phenyl]-1,3-dipropylxanthine; Xanthine amine congener
ZM241,385: 4-[2-(7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4-triazolo[2,3-a] [1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl phenol

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
RECEPTORS D'ADENOSINA I SINAPSI NEUROMUSCULAR: LOCALITZACIÓ I RELACIÓ AMB L'ALLIBERAMENT DE L'ACETILCOLINA.
Denise Fischer Hubert
Dipòsit Legal: T 65-2016

