

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martínez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

01409-17160

0103-91460

**CAMBIOS PLASTICOS DE ADAPTACION ULTRAESTRUCTURAL
DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLOGICO DE ACTIVIDAD.**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICAS BASICAS

UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD, REUS

T 18

MANEL SANTAFE I MARTINEZ

TESIS DOCTORAL

1993

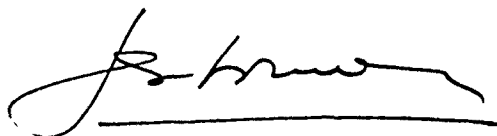
Esta tesis ha sido realizada en la unidad de Histología y Embriología General del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili en Reus, bajo la dirección del Dr. Josep M. TOMAS i FERRE.

Dr Josep M Tomás i Ferré,
Catedrático de Histología, del
Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad Rovira i Virgili, Reus.

CERTIFICA:

Que la tesis Doctoral "Cambios plásticos de adaptación ultraestructural de las conexiones nerviosas motoras en el adulto, en respuesta a un incremento fisiológico de actividad", presentada por M. Santafé Martinez ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su tramitación, presentación y posterior defensa delante del tribunal correspondiente.

Reus, 3 de Mayo de 1993.



Firmado

Profesor Josep M. Tomás i Ferré.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.
Manuel Santafe Martinez
DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

Al meu fill Manelet.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Profesor Dr. Josep M. Tomás i Ferré Catedrático de Histología, amigo, compañero y Director que desde siempre me ha dado apoyo y pupilaje.

A la Dra. María Rosa Fenoll por su ayuda en la adquisición de parámetros y por su colaboración incondicional y desinteresada en todo momento.

A María Angel Lanuza tanto por su enorme colaboración en el procesamiento estadístico de los resultados, como por los mil detalles que la han convertido en una valiosa colaboradora.

A Amparo Aguilar por su inestimable ayuda en el procesado de las muestras para microscopía electrónica, y por la supervisión del entrenamiento del grupo con incremento de actividad.

A la Dirección General de Investigación Científica y Técnica por acogerme en el plan de Formación del Personal Investigador que ha permitido, en parte, el desarrollo del presente estudio.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.
Manuel Santafe Martinez
DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

I. INDICE.

I.1. INDICE GENERAL.

	Páginas
I.INDICE.....	I-XI
II. INTRODUCCION.....	1-58
III.OBJETIVOS.....	59
IV.HIPOTESIS.....	60
V. MATERIAL Y METODOS.....	61-98
VI. RESULTADOS.....	99-186
VII. DISCUSION.....	187-249
VIII. CONCLUSIONES.....	250-252
IX. BIBLIOGRAFIA.....	253-278
ANEXO. ABREVIATURAS.....	279-280

I.2. INDICE.

Páginas

I. INDICE

I.1. INDICE GENERAL.....	I
I.2. INDICE.....	II
I.3. TABLAS.....	VIII
I.4. FIGURAS.....	X

II. INTRODUCCION.

II.1. PREFACIO.....	1
II.2. PLASTICIDAD NEURAL DURANTE EL DESARROLLO.....	4
II.2.1. FORMACION DE UNIONES MIONEURALES EN EL EMBRION.....	5
II.2.2. PRIMONERVACION: FACTORES DE REGULACION.....	11
II.2.2.1. Matriz extracelular	11
II.2.2.2. Factores solubles de crecimiento neural.....	15
II.2.2.3. Otros reguladores de la primoinervación.....	16
II.2.3. MUERTE DE MOTONEURONAS EN EL PERIODO PERINATAL.....	18
II.2.3.1. Competitividad entre motoneuronas.....	18
II.2.3.2. Participación de la actividad eléctrica en la muerte celular.....	20
II.2.4. ELIMINACION SINAPTICA EN EL PERIODO POSTNATAL.....	21
II.2.4.1. Posibles significados del fenómeno de eliminación sináptica.....	22
II.2.4.2. Participación de la actividad neuromuscular en el fenómeno de la eliminación sináptica.....	25
II.2.4.3. Mecanismos de modulación de la eliminación de sinapsis redundantes.....	26
II.3. PLASTICIDAD NEURAL EN EL ADULTO.....	28
II.3.1. COMPONENTE POSTSINAPTICO ABANDONADO POR EL AXON.....	29
II.3.1.1. Retracción axonal en las sinapsis con componente postsináptico abandonado...30	
II.3.1.2. Modificaciones en el componente postsináptico abandonado.....	32
II.3.1.3. Mecanismos responsables del abandono sináptico.....	33
II.3.2. RETOÑAMIENTO SINAPTICO ("SPROUT").....	36
II.3.2.1. Evidencias de retoño axonal en músculos adultos.....	36
II.3.2.2. Origen muscular de la señal inductora de crecimiento axonal.....	41

	Páginas
II.3.2.3. Factores solubles de crecimiento nervioso.....	42
II.3.3. MECANISMO DE REFORMACION SINAPTICA.....	44
II.3.4. CAMBIOS EN LA ARQUITECTURA MIONEURAL EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS.....	47
II.4. HETEROGENEA EFICACIA SINAPTICA PARA UNA MISMA ARBORIZACION:	
VISION MORFOFUNCIONAL.....	53
II.4.1. HETEROGENEA ORGANIZACION DE LA ESTRUCTURA SINAPTICA.....	53
II.4.1.1. Estructura postsináptica.....	53
II.4.1.2. Estructura presináptica.....	54
II.4.2. HETEROGENEA LIBERACION DEL NEUROTRANSMISOR EN TERMINACIONES	
NERVIOSAS MOTORAS.....	56
II.4.2.1. Liberación espontánea del neurotransmisor.....	56
II.4.2.2. Neurotransmisión sináptica no uniforme.....	57
III. OBJETIVOS.	
III.1. OBJETIVO GENERICO.....	59
III.2. OBJETIVOS PARCIALES.....	59
III.2.1. SERIE CONTROL.....	59
III.2.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	59
IV. HIPOTESIS.	
IV.1. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	60
IV.2. HIPOTESIS PARCIALES.....	60
IV.2.1. SERIE CONTROL.....	60
IV.2.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA.....	60
V. MATERIAL Y METODOS.	
V.1. ANIMALES UTILIZADOS.....	61
V.2. MODELO MUSCULAR.....	62
V.2.1. JUSTIFICACION.....	62
V.2.2. DESCRIPCION DEL MODELO MUSCULAR ESTUDIADO: "EXTENSOR DIGITORUM LONGUS".....	62
V.3. SERIES EXPERIMENTALES.....	65

	Páginas
V.4. TECNICAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.....	69
V.4.1. PROCESADO DE LAS MUESTRAS.....	69
V.4.2. PROCESADO DE LAS IMAGENES OBTENIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	71
V.5. ANALISIS MORFOMETRICO.....	72
V.5.1. DESCRIPCION DE LOS PARAMETROS MORFOMETRICOS.....	76
V.5.1.1. Componente presináptico.....	77
V.5.1.2. Componente postsináptico.....	83
V.5.1.3. Otros parámetros.....	90
V.5.1.3.1. Otros parámetros presinápticos.....	90
V.5.1.3.2. Otros parámetros postsinápticos.....	91
V.6. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LOS TIPOS DE SINAPSIS PARA SU ESTUDIO.....	95
V.7. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS.....	98
VI. RESULTADOS.	
VI.1. DESCRIPCION GENERAL DE LAS SINAPSIS.....	99
VI.1.1. TIPOS DE SINAPSIS NEUROMUSCULARES.....	99
VI.1.1.1. Serie control.....	100
VI.1.1.2. Serie de incremento fisiológico de actividad.....	104
VI.1.2. MORFOLOGIA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE ABANDONO.....	114
VI.1.1. Serie control.....	114
VI.1.2. Serie de incremento fisiológico de actividad.....	115
VI.1.3. DISTRIBUCION DE LOS PLIEGUES ABANDONADOS EN LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS (A.A.S.).....	116
VI.1.3.1. Serie control.....	116
VI.1.3.2. Serie de incremento fisiológico de actividad.....	117
VI.2. ESTUDIO DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS POSTSINAPTICAS.....	122
VI.2.1. Serie control.....	126
VI.2.2. Serie de incremento fisiológico de actividad.....	129
VI.3. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS NORMALES (N.S.).....	131
VI.3.1. Componente presináptico.....	133
VI.3.2. Componente postsináptico.....	136

	Páginas
VI.4. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS (A.A.S.).....	138
VI.4.1. SERIE CONTROL.....	138
VI.4.1.1. Componente presináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie control.....	138
VI.4.1.2. Componente postsináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie control.....	144
VI.4.1.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S..	
Serie control.....	146
VI.4.1.2.2. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis A.A.S..	
Serie control.....	147
VI.4.1.2.3. Componente postsináptico subglial. Sinapsis A.A.S..	
Serie control.....	148
VI.4.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD (IFA).....	150
VI.4.2.1. Componente presináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie I.F.A.....	150
VI.4.2.2. Componente postsináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie I.F.A.....	153
VI.4.2.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S..	
Serie I.F.A.....	154
VI.4.2.2.2. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis A.A.S..	
Serie I.F.A.....	155
VI.4.2.2.3. Componente postsináptico subglial. Sinapsis A.A.S..	
Serie I.F.A.....	158
VI.5. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS MINIMAMENTE ABANDONADAS (M.A.S.).....	159
VI.5.1. SERIE CONTROL.....	161
VI.5.1.1. Componente presináptico. Sinapsis M.A.S.. Serie control.....	161
VI.5.1.2. Componente postsináptico. Sinapsis M.A.S.. Serie control.....	167
VI.5.1.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S..	
Serie control.....	167
VI.5.1.2.2. Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S..	
Serie control.....	169
VI.5.1.2.3. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S..	
Serie control.....	170
VI.5.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD (IFA).....	174
VI.5.2.1. Componente presináptico. Sinapsis M.A.S.. Serie I.F.A.....	174
VI.5.2.2. Componente postsináptico. Sinapsis M.A.S.. Serie I.F.A.....	176

	Páginas
VI.5.2.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S..	
Serie I.F.A.....	178
VI.5.2.2.2. Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S..	
Serie I.F.A.....	181
VI.5.2.2.3. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S..	
Serie I.F.A.....	181
VI.6. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS TOTALMENTE ABANDONADAS (T.A.S.).....	183
VI.6.1. Serie control.....	183
VI.6.2. Serie de incremento fisiológico de actividad.....	186
 VII. DISCUSION.	
VII.1. NIVEL FISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD APLICADA.	
DISCUSION DEL PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO.....	187
VII.2. DESCRIPCION GENERAL DE LAS SINAPSIS	
EN MUSCULOS CONTROL Y ENTRENADOS.....	189
VII.2.1. TIPOS DE SINAPSIS NEUROMUSCULARES.....	189
VII.2.2. MORFOLOGIA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE ABANDONO.....	193
VII.2.3. DISTRIBUCION DE LOS PLIEGUES ABANDONADOS EN LAS SINAPSIS A.A.S.....	193
VII.3. ANALISIS DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS POSTSINAPTICAS.....	195
VII.3.1. Morfología de las crestas en músculos control.....	195
VII.3.2. Morfología de las crestas en músculos entrenados.....	197
VII.4. ANALISIS DE LAS SINAPSIS NORMALES	
EN MUSCULOS ENTRENADOS.....	200
VII.4.1. Modificaciones en el componente presináptico.....	200
VII.4.2. Modificaciones en el componente postsináptico.	201
VII.5. ANALISIS DE LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS (A.A.S.).....	204
VII.5.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS A.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.....	204
VII.5.1.1. Componente presináptico.....	204
VII.5.1.2. Componente postsináptico.....	209
VII.5.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS A.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.....	218
VII.5.2.1. Modificaciones en el componente presináptico.....	218
VII.5.2.2. Modificaciones en el componente postsináptico.....	220

	Páginas
VII.6. ANALISIS DE LAS SINAPSIS MINIMAMENTE ABANDONADAS (M.A.S.).....	225
VII.6.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS M.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.....	225
VII.6.1.1. Componente presináptico.....	225
VII.6.1.2. Componente postsináptico.....	236
VII.6.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS M.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.....	241
VII.6.2.1. Modificaciones en el componente presináptico.....	241
VII.6.2.2. Modificaciones en el componente postsináptico.....	242
VII.7. ANALISIS DE LAS SINAPSIS TOTALMENTE ABANDONADAS (T.A.S.).....	246
VII.7.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS T.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.....	246
VII.7.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS T.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.....	248
VIII. CONCLUSIONES.	
VIII.1. CONCLUSIONES. SERIE CONTROL.....	250
VIII.2. CONCLUSIONES. SERIE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.....	251
IX. BIBLIOGRAFIA.....	253
ANEXO. ABREVIATURAS.....	279

I.3. TABLAS.

	Páginas
Tabla I. Protocolo de incremento de uso. Programa de adaptación.....	67
Tabla II. Tipos de sinapsis.....	103
Tabla III. % del número de pliegues totales abandonados en las sinapsis A.A.S.....	119
Tabla IV. Distribución de los pliegues según lateralidad. Sinapsis A.A.S.....	120
Tabla V. Morfología de las crestas.....	123
Tabla VI. Componente presináptico. Sinapsis normales. Serie IFA.....	132
Tabla VII. Componente postsináptico. Sinapsis normales. Serie IFA.....	135
Tabla VIII. Componente presináptico. Sinapsis A.A.S. Serie control.....	140
Tabla IX. Componente postsináptico. Sinapsis A.A.S. Serie control.....	143
Tabla X. Componente presináptico. Sinapsis A.A.S. Serie IFA.....	151
Tabla XI. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S. Serie IFA.....	152

	Páginas
Tabla XII. Componente postsináptico subglial y abandonado. Sinapsis A.A.S. Serie IFA.....	157
Tabla XIII. Componente presináptico. Sinapsis M.A.S. Serie control.....	160
Tabla XIV. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S. Serie control....	165
Tabla XV. Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S. Serie control.....	166
Tabla XVI. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S. Serie control..	172
Tabla XVII. Componente presináptico. Sinapsis M.A.S. Serie IFA.....	173
Tabla XVIII. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S. Serie IFA.....	177
Tabla XIX. Componente postsináptico subglial y abandonado. Sinapsis M.A.S. Serie IFA.....	180
Tabla XX. Sinapsis T.A.S.. Serie control.....	182
Tabla XXI. Sinapsis T.A.S.. Serie IFA.....	185

I.4. FIGURAS.

	Páginas
Figura 1. "Extensor digitorum longus". Area anatómica.....	64
Figura 2. Jaula de entrenamiento.....	68
Figura 3. Equipo de morfometría. Visión esquemática.....	73
Figura 4. Esquema de la ultraestructura de una sinapsis.....	74
Figura 5. Tipos de sinapsis considerados. Representación esquemática.....	94
Figura 6. Morfología de las crestas postsinápticas. Representación esquemática.....	97
Figura 7. Sinapsis normal (S.N.).....	106
Figura 8. Sinapsis mínimamente abandonada (M.A.S.).....	107
Figura 9. Sinapsis ampliamente abandonada (A.A.S.).....	108
Figura 10. Sinapsis totalmente abandonada (T.A.S.).....	109
Figura 11. Morfología de las sinapsis M.A.S.....	110

Páginas

Figura 12. Morfología de las sinapsis A.A.S.....	111
Figura 13. Morfología de las sinapsis T.A.S.....	112
Figura 14. Representación gráfica de la Tabla III.....	119
Figura 15. Representación gráfica de la Tabla IV.....	121
Figura 16. Morfología de las crestas. Representación gráfica de la Tabla V. Serie control.....	124
Figura 17. Morfología de las crestas. Representación gráfica de la Tabla V. Serie IFA.....	125
Figura 18: "Flujo de conversión sináptica"	245

II. INTRODUCCION.

"La ficción nunca supera a la realidad, sólo la precede".

Umberto Eco.

II.1. PREFACIO.

La sinapsis constituye un elemento crucial en toda investigación neurobiológica. Durante más de 50 años, las principales y numerosas investigaciones en este campo se han centrado, fundamentalmente, en la dilucidación de los mecanismos que intervienen en el proceso de neurotransmisión, concebido desde el ángulo de un sistema rápido y completamente reversible de señalización y comunicación entre las células nerviosas. Siguiendo esta línea se han puesto de manifiesto actualmente los fundamentos fisiológicos y también moleculares del proceso de transmisión (neurotransmisores, receptores, canales y flujos de iones, etc.). Sin embargo, esta óptica ofrece, a veces, la falsa imagen de la sinapsis como una estructura anatómica y funcionalmente estable.

A pesar de ello, la idea de una sinapsis como una estructura inestable y sujeta a variaciones de carácter (incluso anatómico), se hace evidente a la luz de recientes descubrimientos (ver Wernig y Herrera, 1986; Wernig y Dorlöchter, 1989; Hall y Sanes, 1993). El concepto de plasticidad hace referencia a esta propiedad en el sentido más amplio, y muchos de sus aspectos fueron ya puestos de manifiesto a principios de siglo por Cajal. Incluso se han relacionado las propiedades plásticas de la sinapsis con fenómenos de naturaleza tan oscura como el aprendizaje y la memoria. Igualmente esta idea fue avanzada por Cajal al proponer que las "expansiones neuronales" eran estructuras modificables con capacidad para orientarse direccionalmente de acuerdo a determinadas corrientes nerviosas o según redes de asociación preferente en respuesta a ordenes reiteradas. Actualmente, estas afirmaciones empiezan a adquirir notable soporte experimental sobretodo a nivel del sistema neuromuscular (Wernig, 1991).

Aunque el sistema nervioso es objeto de cambios plásticos en su sinaptología, no cabe duda de que la plasticidad neuronal adquiere un grado máximo de expresividad durante el desarrollo embrionario o, en el adulto, en la reparación regenerativa de una lesión (Bennett, 1983). Parece ser que en estas dos situaciones operan mecanismos celulares y moleculares similares y que estos también pueden operar como sustrato de los fenómenos plásticos en el organismo adulto intacto (Brown y cols., 1981a; Slack y cols., 1983; ver sin embargo Cotman y cols., 1993).

Durante el desarrollo, el proceso de establecimiento de contactos sinápticos, tanto entre células nerviosas como con las fibras musculares, puede ser separado conceptual y cronológicamente en las siguientes etapas (Bennett, 1983): (1) establecimiento de contactos sinápticos iniciales y redundantes por un proceso de reconocimiento intercelular; (2) eliminación de los contactos redundantes asociado o no a la muerte neuronal fisiológica; (3) estabilización sináptica; (4) remodelación sináptica en el adulto.

En las etapas 2,3, y 4 es donde la plasticidad sináptica adquiere un particular relieve. En los períodos iniciales del desarrollo, la organización de la conectividad entre las células nerviosas y las fibras musculares no adopta una conformación que se pueda considerar como "definitiva". Es característica de las fases iniciales del desarrollo del sistema nervioso y neuromuscular, la redundancia en la producción, tanto de elementos neuronales diferenciados como de conexiones. El nivel de actividad muscular juega un papel esencial en el proceso de remodelación citológica y sináptica que dará lugar al establecimiento del patrón de conectividad con la complejidad y precisión propias del organismo diferenciado (Redfern, 1970). Por ejemplo, el incremento de actividad neuromuscular conlleva a una aceleración del proceso de eliminación de sinapsis redundantes (O'Brien y cols., 1978; Thompson, 1983 a y

b). Así, la actividad de una sinapsis en desarrollo tiene un determinado significado crucial en su posterior determinismo. También es bien manifiesta la importancia de la actividad en la regulación de los cambios plásticos en el sistema adulto (ver por ejemplo, Wernig y Herrera, 1986).

Según Wernig y Dorlöchter (1989), los cambios plásticos de las uniones neuromusculares pueden ser clasificados en: (1) plasticidad inducida experimental o accidentalmente (por ejemplo por denervación o mediante el uso de ciertos agentes paralizantes); (2) plasticidad durante del desarrollo normal, consistente en fenómenos que conducen a la primoinervación de la fibra muscular, muerte de motoneuronas, multiinervación y eliminación sináptica; (3) plasticidad continuada que se produce en el adulto normal y bajo condiciones fisiológicas. En el capítulo de introducción se comentarán tanto el apartado (2) como el (3) y sólo se harán inferencias en la plasticidad inducida para ilustrar algún concepto.

En la presente introducción se dedicará especial interés al período de desarrollo del sistema neuromuscular debido a que muchos de los mecanismos y capacidades neurales que aparecen en este período se observarán también en la edad adulta. En este sentido, Goodman y Shatz (1993) proponen que en el establecimiento de la primoinervación (edad embrionaria y perinatal) concurren dos tipos de procesos: procesos "actividad-independiente" que incluyen a los mecanismos que participan en la progresión del axón hasta su célula diana, y procesos "actividad-dependientes" como son las situaciones que conducen a la muerte de motoneuronas en el período perinatal y a la eliminación sináptica postnatal. Según estos autores, los procesos "actividad-dependientes" no se limitan a los períodos de desarrollo inicial sino que continúan actuando durante toda la vida del organismo.

II.2. PLASTICIDAD NEURAL DURANTE EL DESARROLLO.

En el estudio de la formación y desarrollo de las uniones mioneurales se han de considerar los diferentes papeles que juegan las diferentes células involucradas en la formación de las estructuras y funcionamiento de tan complejo órgano como es la sinapsis neuromuscular. La datación exacta de los períodos de formación y maduración de las uniones neuromusculares varía en función de la especie y modelo muscular considerado. Así por ejemplo, los embriones de pollo ya presentan transmisión neuromuscular a los 4-6 días de incubación (Landmesser y Morris 1975), en los embriones de roedores a los 14-15 días de gestación (Diamond y Miledi, 1962) mientras que en los embriones humanos no es hasta las 8 semanas de vida embrionaria que se puede considerar que las sinapsis son funcionales (Juntunen y Teravainen, 1972).

Por otro lado, la formación y maduración tanto morfológica, fisiológica como molecular de las sinapsis neuromusculares no se reduce al período embrionario si no que persiste varias semanas después del nacimiento (revisado por Betz, 1987 y por Thompson, 1985). Sin embargo, la naturaleza exacta de las influencias hereditarias y/o epigenéticas que operan durante las interacciones iniciales entre axones motores en desarrollo y los miotubos no son bien conocidas hasta la fecha (Miller y Stockdale, 1987; Sanes, 1987). Una vez estas sinapsis han madurado (animales adultos) entran en una fase de remodelamiento sináptico constante, que observa muchos de los mecanismos usados en el período embrionario. Estos fenómenos de remodelación o plasticidad sináptica, habituales en el adulto normal, son menos llamativos que en el período de desarrollo por lo que durante mucho tiempo se sostuvo la hipótesis de que el sistema neural adulto no tenía remodelación alguna, a diferencia de lo que sucede en otros tejidos.

II.2.1. FORMACION DE UNIONES MIONEURALES EN EL EMBRION.

En los roedores se establece la unión mioneural cuando el músculo aún está formado mayoritariamente por miotubos multinucleados, y con muy pocas fibras inmaduras (Diamond y Miledi, 1962). El crecimiento intramuscular del nervio está mediado por múltiples axones que se caracterizan por presentar unas especializaciones distales, de morfología bulbosa, denominados conos de crecimiento. Cada uno de estos axones está inmerso en una masa de células de Schwann, que envuelve además a otros axones (ver Purves y Litchman, 1985 para una amplia revisión).

Los conos de crecimiento de los axones embrionarios son estructuras bulbosas con gran actividad anabólica, por los que recibe un gran aporte de nuevos materiales por flujo axoplásmico anterógrado (Burmeister y cols., 1988). Este aporte masivo es el responsable de que incremente la presión intra-axonal de la porción distal lo que esto se traduce en la típica bulbosidad comentada anteriormente (Dailey y Bridgman, 1991). El cono de crecimiento es el responsable de la elongación axonal (crecimiento) y también del reconocimiento específico de su célula diana. La elongación del axón se produce por incorporación de nueva membrana al axolema del cono (se ha sugerido que para reducir la presión intra-axonal de la bulbosidad), y esto podría inducir la incorporación de nuevo material al citoesqueleto de la terminación nerviosa (ver para revisión Lockerbie, 1987 y Smalheiser, 1990). Los conos de crecimiento están en constante cambio de morfología por continuadas emisiones filopódicas. Los filopodios (constituidos esencialmente por cadenas de actina) exploran el substrato de forma arbitraria hasta que contactan con un substrato propicio para "anclarse" (ver más adelante matriz extracelular; Reichardt y Tomaselli, 1991 para revisión). A partir del momento en que el cono de crecimiento (filopodio) tiene un punto de sujeción se configura el citoesqueleto en esa

dirección por ensamblamiento de miosina, neurotúbulos y neurofilamentos (Lockerbie, 1987; Torigoe, 1988).

Durante el período embrionario los axones en crecimiento están dotados de una elevada capacidad para moverse hacia las células musculares para establecer sinapsis. Sin embargo, el movimiento se detiene cuando el cono de crecimiento axonal ha alcanzado el lugar adecuado para realizar el contacto sináptico. Este cambio, obviamente es consecuencia de la inactivación reversible de los mecanismos que gobiernan el movimiento del terminal; es decir, del ensamblaje local del citoesqueleto (Mitchinson y Kirchner, 1988). En este sentido, la actina y la familia de moléculas derivadas (*actin binding*), son particularmente relevantes en todos los procesos (Smith, 1988). Las proteínas *actin binding* (profilina, fodrina, gelsolina, trompomiosina, fimbrina, espectrina, vinculina, sinapsinas, etc) intervienen directamente en el control dinámico del estado de polimeración de los monómeros de actina y en la interacción de las fibras de actina con estructuras citoplasmáticas y de membrana, siendo, alguna de ellas, modulada por la fluctuación de la concentración de calcio intracelular (Vrbová y cols., 1978). Asimismo se ha demostrado experimentalmente que los niveles de calcio intracelular en los conos de crecimiento se correlacionan con su capacidad para moverse; existiendo una concentración óptima que promueve el crecimiento (por ejemplo 200nM para las neuronas de *Helisoma*), mientras que concentraciones superiores o inferiores producen una detención del mismo (Cohan y cols., 1987). Tomando en consideración estos hechos experimentales, se puede relacionar las fluctuaciones intracelulares de calcio con la actividad eléctrica en los terminales; una mayor actividad sináptica comportaría un mayor acumulo de calcio intracelular por apertura repetitiva de los canales de calcio y la consiguiente inhibición de la motilidad del terminal (Vrbová y cols, 1988). Estudios recientes implican, además, a la composición

lipídica (contenido en ácidos grasos) del cono de crecimiento axonal, ya que esta se modifica antes de establecer contacto sináptico (Martin y Bazan, 1992).

Una vez que las fibras nerviosas se aproximan a las fibras musculares en desarrollo, se establecen frecuentes contactos entre grupos de axones (envueltos por la célula o las células de Schwann) y la fibra muscular (Diamond y Miledi, 1962). La diferenciación de los conos de crecimiento de las terminaciones presinápticas está asociada con los cambios de composición de las organelas axonales. Así, en esta fase de la sinaptogénesis, decrece el volumen de los túbulos del retículo endoplasmático (R.E.), desaparecen las formas multi-vesiculadas, también decrecen los microtúbulos y sin embargo aumentan los neurofilamentos, así como la presencia mitocondrial y de vesículas sinápticas (Burmeister y cols., 1988; Dailey y Bridgman, 1991). Es también en este momento cuando se desarrollan las zonas activas y sus partículas asociadas (Ko, 1985). Pese a que las zonas activas aún no están presentes, dado que no se ha establecido aún contacto mioneural y, por tanto, no hay diferenciación postsináptica de estructuras relacionadas con la neurotransmisión, los conos de crecimiento ya son capaces de liberar neurotransmisor (ACh) de una forma cuántica (Young y Poo, 1983).

En las fases tempranas del contacto mioneural la superficie postsináptica es aún muy inmadura (ver para revisión Salpeter, 1987a). Las dimensiones del pliegue primario y hendidura sináptica son muy variables en esta fase y la lámina basal no está completamente desarrollada. El sarcolema postsináptico presenta intermitentes engrosamientos, cortos y convexos (similares a los habituales en las crestas maduras), sin ninguna de las especificidades del tipo de filamentos estructurales que se suelen ver asociados a estas densificaciones en el adulto normal. Tampoco se pueden apreciar pliegues secundarios. Las partículas de AChR y AChE están presentes de forma muy precoz en el componente postsináptico embrionario

(Noakes y cols., 1993), y se disponen de forma difusa por toda la superficie del miocito por lo que se les detecta en menor densidad que en las formas maduras y precisan de la presencia neural para su completa agregación y distribución (Sohal, 1988).

Una vez establecido el contacto mioneural, el músculo o factores derivados de este, pueden regular la diferenciación del componente presináptico, mientras que los factores neurales continúan la inducción de la diferenciación muscular (demostrado *in vitro* por Bixby y Reichardt, 1985). A nivel sináptico, la lámina basal se ve alterada tanto por la diferenciación del componente pre- como postsináptico, sin embargo no parece jugar ningún papel determinante en las uniones mioneurales en su fase temprana, y si que puede colaborar directamente o dando soporte a la diferenciación sináptica mas tardía. En una reciente publicación, Balicegordon y Litchman (1993), en un estudio *in vivo*, sugieren que la célula muscular embrionaria juega un papel trascendental en la configuración de la sinapsis en el período de desarrollo.

La lámina basal de las fibras musculares embrionarias (miotubos) es una condensación de la matriz extracelular rica en glicoproteínas, especialmente en laminina y fibronectina. Estas glicoproteínas están relacionadas con el crecimiento axonal específico y dirigido hacia las fibras musculares diana (Reichardt y Tomaselli, 1991). Toda la superficie de los miotubos presenta idéntica composición de lámina basal antes del primer contacto sináptico, de manera que toda la superficie de las fibras musculares embrionarias es potencialmente receptiva a los contactos sinápticos (Sanes, 1985).

Al establecerse el contacto neural (sinapsis) se fusiona la lámina basal del miotubo con la del cono de crecimiento, a partir de este momento se pueden diferenciar dos tipos de lámina basal: una lámina basal sináptica y otra extrasináptica. Ambas presentan diferentes características estructurales y funcionales (ver Sanes, 1989).

Por un lado, la lámina basal sináptica constituye el sostén estructural de macromoléculas relacionadas con la neurotransmisión (por ejemplo AChE y AChR), y es rica en moléculas de la familia de las agrinas (muy relacionadas con la distribución de la moléculas de AChR; Lieth y cols., 1992). A nivel ultraestructural, esta lámina basal sináptica consta solamente de una capa electrón-densa (Salpeter, 1987a). Por otro lado, la lámina basal extrasináptica prácticamente no se modifica y sigue siendo rica en glicoproteínas del tipo laminina y fibronectina. A nivel ultraestructural en la lámina basal extrasináptica se distinguen dos capas: una capa electrón-densa separada de la superficie muscular por una capa electrón-lúcida (Salpeter, 1987a).

No es hasta los últimos días del período embrionario y primeros neonatales en que se desarrolla la consolidación y especialización de la lámina basal (Chiu y Sanes, 1984).

Por otro lado, la aparición de las moléculas de acetil-colinesterasa (AChE) viene determinada por la actividad muscular, de manera que de forma muy precoz se pueden detectar agrupaciones de moléculas de colinesterasa en la lámina basal (por ejemplo en anfibios Cohen y cols., 1984).

En el momento del nacimiento, la morfología de la unión mioneural ya está más claramente definida, y sólo algunos aspectos de su maduración aún están por completar (Bennett, 1983 para revisión). Un importante conjunto de axones de pequeño calibre,

cubiertos por procesos de la célula de Schwann, tienen múltiples contactos con la superficie de las células musculares. Esta región en que varios axones, cubiertos de una masa glial común, están en contacto directo con un componente sináptico también común se denomina convencionalmente "complejo de unión mioneural". En este momento se da la circunstancia de que cada fibra muscular está multiinervada y posteriormente (ver apartado II.2.4 en este capítulo) se procederá a la eliminación de las sinapsis redundantes hasta llegar al estado de monoinervación que caracteriza a las células musculares del animal adulto (Betz, 1987).

La hendidura sináptica del "complejo de unión mioneural" es de una amplitud uniforme y contiene una lámina basal que es el resultado de la combinación de distintas láminas basales presentes (muscular, axonal y glial). Las moléculas AChR ya se concentran en esta superficie postsináptica del complejo de unión, apareciendo densificaciones similares a las habituales en las formas maduras (Noakes y cols., 1993) y el sarcoplasma subsináptico se enriquece de vesículas cubiertas (*coated*), en una mayor proporción que en fases más tardías (Bennett, 1983).

Ocasionalmente se pueden observar indentaciones de la superficie postsináptica pero no es habitual que los miocitos de animales recién nacidos presenten pliegues secundarios. La aparición y desarrollo de los pliegues secundarios ocurre entre el nacimiento y las primeras semanas de vida, dependiendo del animal y músculo considerado (ver Salpeter, 1987a). La membrana postsináptica densificada penetra pues por las oberturas de los pliegues secundarios conforme estos se desarrollen (Salpeter, 1987a). Durante el mismo período en que se desarrollan los pliegues secundarios el número de terminaciones motoras por placa motora declina (consistente en la eliminación de la multiinervación).

II.2.2. PRIMOINERVACION: FACTORES DE REGULACION

2.2.1. Matriz extracelular.

Varios factores extracelulares pueden promover el crecimiento neural y ayudar a dirigir a las neuronas motoras dentro del músculo embrionario (ver Bennett, 1983 para revisión). De las múltiples moléculas presentes en la matriz extracelular, la laminina parece ser la más frecuentemente implicada en promover la elongación neural (Manthorpe y cols., 1983). Probablemente los componentes de la matriz extracelular no contienen información específica de los diferentes miocitos diana. Así por ejemplo, la laminina puede promover el crecimiento neural hacia varios miocitos diana (Olwin y Hall, 1985).

Múltiples experiencias apuntan hacia esta importante participación de muchas de las macromoléculas asociadas a la matriz extracelular (M.E.C.) tanto en la migración de las neuronas a nivel de la cresta y tubo neural como en el posterior crecimiento axonal y sinaptogénesis (Sanes, 1983). Las neuronas y sus axones tienen una determinada "capacidad adhesiva" a ciertas moléculas de la matriz extracelular, de tal manera que el crecimiento axonal embrionario sigue unos recorridos preferentes definidos por esta determinada adhesividad (Letourneau, 1975).

Se han aislado múltiples macromoléculas presentes en la M.E.C. de los miotubos que tienen capacidad de promover el crecimiento axonal. De entre estas son destacables la laminina, colágeno II y IV, proteoglicanos y fibronectina (Gundersen, 1987). De todas las macromoléculas presentes en la M.E.C. parece que, como se ha indicado, la laminina (glicoproteína no colagenosa) es la mayor promotora de este crecimiento axonal preferencial.

Se sabe que la laminina de la matriz extracelular (M.E.C.) de estos miocitos está unida

de forma no covalente al proteoglicano heparán-sulfato y, sorprendentemente, anticuerpos anti-laminina no bloquean el crecimiento axonal embrionario (Edgar y cols., 1984). Sólo se ha podido limitar el crecimiento axonal en experimentos en los que se han usado anticuerpos anti-complejo laminin-heparán-sulfato (Matthew y Patterson, 1983). Parece ser que la laminina es determinante para la ramificación de los axones en situación intramuscular y la posible acción del heparán-sulfato se limita a la elongación del cono de crecimiento (Hantz-Ambroise y cols., 1987).

La lámina basal del cono de crecimiento axonal presenta también una serie de macromoléculas que actúan como receptores para las moléculas de la matriz extracelular de los miotubos. Concretamente, la integrina de la M.E.C. axonal actúa como principal receptor para la laminina, aunque no es la única macromolécula presente en el M.E.C. axonal con esta capacidad (Buck y Horwitz, 1987).

Las integrinas activadas por la laminina pueden traducir la señal a través del axolema e inducir la elongación axonal por dos posibles vías: (1) interaccionando directamente con las proteínas del citoesqueleto y/o (2) regulando los niveles axoplasmáticos de mensajeros secundarios relacionados con la elongación (por ejemplo, ión calcio) (ver Reichardt y Tomase-lli, 1991 para revisión).

Una vez se ha establecido el contacto sináptico (primoinervación), la lámina basal muscular sufre una serie de variaciones a este nivel para, como se ha comentado, diferenciarse en lámina basal sináptica mientras que el resto de superficie del miotubo, que prácticamente no se modifica, pasa a ser lámina basal extrasináptica. La lámina basal sináptica se enriquece en macromoléculas con probada capacidad organizativa. De estas la familia de las agrinas es

la más relevante. Las agrinas inducen a la congregación de las moléculas de AChR en el área sináptica y, de forma secundaria, de las moléculas de AChE (Rubin y McMahan, 1982). La presencia del axón no es determinante para la aparición de las moléculas de agrinas ni de AChR ya que aparecen en miotubos que se desarrollan de forma aneural (Sohal, 1988; ver también Reichardt y Tomaselli, 1991).

En la lámina basal sináptica hay también otras macromoléculas con capacidad organizativa. Por ejemplo, diferentes isoformas de la laminina, macromoléculas de la familia de los proteoglicanos y de los colágenos (estos últimos contactan con las macromoléculas de la lámina basal del cono de crecimiento colaborando en la concentración de las moléculas de AChR -Sanes y Chiu, 1983-), y también tienen cierta capacidad organizativa el condroitin sulfato, lectinas, isoformas de las agrinas, etc (Sanes, 1989 para revisión).

Por otro lado, la lámina basal tanto del cono de crecimiento como de las fibras musculares embrionarias presenta unas estructuras filamentosas que pueden interaccionar entre ellas adhiriendo las dos láminas basales por mecanismos homofílicos. Genéricamente a estas estructuras filamentosas se las ha denominado "moléculas de adhesión celular" (CAM). Esta capacidad adhesiva entre láminas basales no es exclusiva del sistema nervioso y, por ejemplo, están descritas CAM en diferentes epitelios (Edelmann, 1990). Las macromoléculas CAM son glicoproteínas con un extremo hidrófobo y otro hidrófilo unido por ácido siálico con función "bisagra" (Edelmann, 1990). Recientemente, se ha propuesto la posible participación del ácido siálico, en forma polimérica (ácido polisialico), de las moléculas CAM como un importante modulador del patrón de ramificación de las terminaciones nerviosas en crecimiento (Rutishauer, 1992 y 1993; ver también Rougon y cols., 1993).

Los mioblastos embrionarios ya presentan moléculas CAM en su superficie por lo que se ha sugerido que estas moléculas puedan mediar en la fusión de los mioblastos para configurar los miotubos (Covault y Sanes, 1986). Se ha sugerido también que las moléculas CAM puedan desarrollar una limitada participación en la primoinervación, ya que anticuerpos anti-CAM pueden alterar en gran medida el contacto mioneural (Covault y Sanes, 1986). Por otro lado, parece haber una estrecha relación entre AChR y CAM ya que presentan una distribución similar en la superficie del miocito. Parece claro que la posible relevancia de las moléculas CAM, tanto del cono de crecimiento como de la superficie del miotubo, esté limitada a actuar a modo de "pegamento" inespecífico. Por otro lado, esta unión es prerequisite indispensable para que se produzca otra unión más específica como es la mediada por las macromoléculas de la matriz extracelular axonal (por ejemplo integrinas) y muscular (por ejemplo laminina) anteriormente comentadas (Rieger y cols., 1985).

Las moléculas de adhesión de superficie neural (N-CAM, Hoffman y cols., 1982) son uno de los posibles agentes que, con mayor especificidad, pueden buscar las terminaciones nerviosas, en lugares específicos de contacto nervio-músculo, y posiblemente promover la formación de las sinapsis (Covault y Sanes, 1985). Es prematuro juzgar el grado de participación tanto de los componentes de la matriz como de las moléculas de adhesión celular, hasta el momento identificados, en los fenómenos de "lazarillo" (guiar) de los axones motores hacia sus fibras musculares diana así como de inducción a la sinaptogénesis. Hasta la fecha, estos agentes han sido claramente demostrados solo como promotores de la supervivencia neural, crecimiento y contacto por adhesión (ver Hall y Sanes, 1993 para amplia revisión)

II.2.2.2. Factores solubles de crecimiento neural.

Desde hace aproximadamente 40 años que está descrito, a nivel somato-sensorial, un conjunto de macromoléculas solubles de naturaleza proteica capaces de promover el crecimiento axonal (Levi-Montalcini y Hamburger, 1951). Estos agentes tróficos se denominan genéricamente factores de crecimiento nervioso (NGF) y pueden ser liberados por los tejidos diana de axones simpáticos y sensitivos (Harper y cols., 1980) así como también por células gliales (Richardson y Ebendal, 1982). En el sistema nervioso central parece claro que cada axón y dendrita presenta una alta especificidad para un determinado NGF, lo cual colabora en el proceso de localización precisa de la célula diana por parte del axón (ver Levi y Alemá, 1991 para revisión)

Se ha sugerido que la acción del NGF sobre el axón está mediada por un mensajero secundario (por ejemplo, el ión calcio, el AMPc o determinados fosfolípidos) que, mediante transporte axoplásmico retrógrado, interferirían en el metabolismo neural estimulando el crecimiento axonal en la dirección en que el cono de crecimiento detecta el factor neuroactivo (NGF; Levi y Alemá, 1991).

A nivel neuromuscular, si bien el NGF no está presente existen también evidencias, aunque fragmentarias, de la existencia de sustancia/s solubles con capacidad promotora del crecimiento del cono axonal (ver Slack y cols., 1983). Sin embargo, estas evidencias son indirectas sin que, por el momento, esté referido ningún experimento determinante. En este sentido, se ha observado que extractos de músculo esquelético de ratones neonatos (Brown y cols., 1980a) o de músculos denervados de animales adultos (Brown y cols. 1981a) tienen capacidad trófica o de supervivencia para neuronas motoras *in vitro* así como capacidad de incrementar la supervivencia y diferenciación en motoneuronas espinales de ratas neonatales

(Smith y Appel, 1981). Estos factores de supervivencia pueden colaborar a guiar a los axones motores intramuscularmente de una forma específica para que un determinado axón contacte con una determinada fibra muscular. Parece claro que la fibra muscular está involucrada en la producción de un factor trófico o de supervivencia afín al axón que atrae. Así, después de tratar con rayos X extremidades de pollo durante el período embrionario se observa como los nervios no se ramifican normalmente en su recorrido intramuscular ya que las radiaciones han afectado el curso de la miogénesis (a nivel de la fase mitótica de los mioblastos), interrumpiendo la formación de los miotubos (Lomo, 1976).

Las proteínas de la matriz extracelular y los factores neurotróficos de origen muscular no son promotores neurales aislados si no que, en determinadas situaciones, pueden estar relacionados. En este sentido, se ha sugerido que la M.E.C. desempeña un papel de reservorio inespecífico de los factores solubles de crecimiento (Reichardt y Tomaselli, 1991). También se ha propuesto que una posible acción secundaria de los agentes solubles neurotróficos es la de regulación de las propiedades de adhesión celular (CAM) de la matriz extracelular que facilitarían el anclaje del cono de crecimiento a la superficie de la fibra muscular (Lockerbie, 1987).

II.2.2.3. Otros reguladores de la primoinervación.

Parece claro que los factores más relevantes que regulan la primoinervación son los relacionados con la matriz extracelular de la superficie de los miotubos y los factores neurotróficos de origen muscular. Sin embargo, están descritas otras alternativas, que se verán en este apartado, que en determinadas circunstancias o de forma habitual pueden colaborar en la primoinervación.

En el músculo embrionario están presentes, aparte de los precursores de los miocitos, otras células del parénquima que pueden colaborar en la formación del primer contacto sináptico. Así por ejemplo, la célula de Schwann está recubierta por una lámina basal rica en moléculas de adhesión celular (Neuron-glia CAM o Ng-CAM) específicas para el cono de crecimiento del axón (Lockerbie, 1987). La presencia de las células de Schwann no es imprescindible para la primoinervación de los músculos embrionarios, sin embargo la célula glial puede guiar al axón por unos recorridos de crecimiento preferentes. Por otro lado, está descrito que los fibroblastos embrionarios tienen una limitada capacidad de producir ciertas moléculas neuroactivas (Covault y cols., 1987), y que esta capacidad de los fibroblastos es independiente de la inespecífica interacción entre las vainas conectivas del tejido muscular con el axón para su conducción intramuscular (ver Sanes, 1989).

Por otro lado, hay ciertas evidencias que apuntan hacia una participación de los campos eléctricos (según dirección e intensidad) en la progresión intramuscular del cono de crecimiento axonal (Patel y cols., 1985). En este sentido, se ha propuesto que el estímulo eléctrico puede variar la localización de las glicoproteínas (CAM) a nivel de la membrana del cono de crecimiento (Patel y Poo, 1982). Otra hipótesis documentada sugiere que campos eléctricos con determinadas características de intensidad pueden modificar los gradientes iónicos extracelulares de iones implicados en la síntesis de las glicoproteínas del tipo CAM (por ejemplo, los iones calcio y potasio; Sussnot y Campenot, 1986; ver también Lockerbie, 1987).

II.2.3. MUERTE DE MOTONEURONAS EN EL PERIODO PERINATAL.

La muerte de motoneuronas espinales ha sido ampliamente estudiada en gran variedad de vertebrados incluyendo aves, anfibios y mamíferos superiores (rata y ratón entre otros) (ver para revisión Jansen y Fladby, 1990, y Oppenheim, 1991). En este período la pérdida de motoneuronas puede llegar a cotas muy altas (por ejemplo el embrión de pollo pierde el 50% de sus motoneuronas en esta época; Hamburger, 1975). Estas motoneuronas degeneran y son fagocitadas por las células gliales acompañantes. Este proceso de muerte seguida de fagocitosis neuronal es muy rápido para cada motoneurona de manera que pueden transcurrir pocas horas desde que aparecen los primeros signos de picnosis hasta que la neurona desaparece totalmente (Chu-Wang y Oppenheim, 1978).

II.2.3.1. Competitividad entre motoneuronas.

Los axones que aparecen en busca de sus células diana, antes de la muerte celular, son guiados de forma muy precisa hasta el músculo apropiado, pero durante la búsqueda de la célula diana un importante porcentaje de motoneuronas no sobreviven. Parece haber una marcada dependencia periférica, es decir, la magnitud de la muerte neuronal está en relación con el número de fibras musculares disponibles para la proyección neuronal. Así, el tamaño del campo periférico de proyección sería un importante determinante del grado de supervivencia de las motoneuronas. Por ejemplo, en los experimentos de ablación precoz de extremidades en embrión de pollo se provoca la muerte de casi la totalidad de las motoneuronas espinales que se proyectan a estas extremidades y, por el contrario, la implantación experimental de un miembro supernumerario en el embrión de pollo produce un reclutamiento

de motoneuronas que normalmente perecerían (Oppenheim, 1981). Por otra parte, en anfibios, la amputación de una extremidad en un período del desarrollo muy temprano, induce a la doble inervación de los músculos de la extremidad restante (Sheard, 1992). La explicación más comúnmente aceptada para interpretar estos fenómenos implica la formulación de un sistema competitivo en las neuronas en desarrollo para la obtención de uno o varios factores derivados del músculo y producidos en cantidades limitadas que son imprescindibles para la supervivencia neuronal y/o para el mantenimiento de sus contactos a partir de un determinado momento "crítico" de su desarrollo (Oppenheim, 1991, para revisión). A nivel del sistema nervioso central, el factor de crecimiento neural (NGF), anteriormente comentado, es el principal factor para la supervivencia neural detectado hasta el momento. Anticuerpos anti-NGF provocan la pérdida completa de neuronas en los ganglios simpáticos (Levi-Montalcini y Brooker, 1960). Por otro lado, el NGF se ha aislado y purificado en varios animales de experimentación y gran parte de sus mecanismos de acción han sido dilucidados, pero de momento no parece claro que el NGF sea producido por neuronas fuera del ámbito somatosensorial. En relación al desarrollo del sistema neuromuscular, como se ha comentado anteriormente, existe un conjunto de hechos verificados por una sólida experimentación, que apuntan hacia la predicción de la existencia de un factor o factores que operan de un modo similar al sistema descrito (Slack y cols., 1983). Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado, de forma convincente, ningún factor de características homólogas al NGF en el sistema neuromuscular.

II.2.3.2. Participación de la actividad eléctrica en la muerte celular.

Los potenciales de acción aparecen precozmente en el período perinatal y tanto la intensidad como el tipo de actividad nerviosa (patrón) puede afectar a muchos procesos importantes, tales como la asimilación de ciertas moléculas por la terminación nerviosa (Heuser, 1989a), la expresión de las proteínas contráctiles de los miotubos (Salmons y Sreter, 1976), y gran parte de la dinámica de las moléculas de AChR de las fibras musculares (Lomo y cols., 1980). Así, parece lógico que el nivel de actividad en forma de potencial de acción y/o la contracción muscular pueda afectar al fenómeno de la muerte de las motoneuronas. Los experimentos con diferentes agentes paralizantes tanto a nivel presináptico (por ejemplo hemicolina) como postsináptico (por ejemplo α -bungarotoxina) en este período demuestran que puede llegar a quedar totalmente abolida la muerte de las motoneuronas de los músculos paralizados (Creazzo y Sohal, 1979; Pittman y Oppenheim, 1979). Al contrario, si un músculo embrionario (por ejemplo de pollo Oppenheim y Nunez, 1982) es experimentalmente estimulado tiene lugar una muerte neuronal masiva. Por otro lado, en estudios con un ratón mutante, que ya en su fase embrionaria presenta parálisis muscular (incluso un paro respiratorio que los hace inviables extraútero), se observa una mínima pérdida de sus motoneuronas (Oppenheim y cols., 1984). Así, parece confirmarse que la competitividad entre motoneuronas puede ser controlada por la actividad eléctrica desde el músculo. En resumen, las neuronas motoras pueden competir por un factor de supervivencia derivado del músculo, y la producción de este agente neurotrófico está regulada por el nivel de actividad muscular (Brown y cols., 1981b; ver también Colman y Lichtman, 1993).

II.2.4. ELIMINACION SINAPTICA EN EL PERIODO POSTNATAL.

Las sinapsis neuromusculares ya son funcionales a los pocos días del primer contacto del axón con la fibra muscular embrionaria (Diamond y Miledi, 1962; Landmesser y Morris, 1975). Inicialmente, en un período transitorio de inervación supernumeraria, varios axones de diferentes motoneuronas inervan la misma placa motora para cada fibra muscular (inervación polineuronal focal), e inversamente, cada motoneurona inerva a un número excesivo de fibras musculares (multiinervación). Posteriormente, aunque todos los contactos sean operativos, se pierden todas menos una de las ramas axonales (eliminación de sinapsis redundantes), y ya en el adulto cada placa motora está inervada, generalmente, por una sola terminación nerviosa (monoinervación). Entre dos tercios y tres cuartos de las sinapsis inicialmente formadas son eliminadas en este período. Uno de los modelos neuromusculares más estudiados, en cuanto a la eliminación sináptica se refiere, es el del músculo soleo de rata (Brown y cols., 1976). En este modelo muscular, la pérdida de sinapsis ocurre durante las dos primeras semanas postnatales. En el nacimiento, cada una de las 25 motoneuronas del músculo soleo inerva un 25% de las 2.800 fibras musculares que este músculo presenta en promedio. En consecuencia, cada miocito del músculo soleo recibe inervación de unas cinco motoneuronas. Posteriormente, hacia finales de la segunda semana postnatal, cada motoneurona del músculo soleo sólo inerva a unas pocas fibras musculares (4-5 % de fibras), y a la inversa, cada fibra muscular está inervada por una sola motoneurona (Brown y cols., 1976). Sin embargo la multiinervación está presente en muchas situaciones en el adulto normal, como por ejemplo en el músculo sartorio de anfibios (Herrera, 1984). En los mamíferos superiores el período en que se produce la eliminación de sinapsis supernumerarias o redundantes puede durar entre 3 semanas y un mes después del nacimiento (Oppenheim, 1991)

Aparentemente, solo dos factores son relevantes en la pérdida de contactos sinápticos por las motoneuronas. (1) Por un lado, las terminaciones nerviosas de los axones motores pueden competir entre ellas por algún substrato para mantener su contacto sináptico. En este sentido, evidencias directas de esta influencia se derivan de múltiples estudios donde se han llevado a cabo denervaciones parciales en modelos musculares de recién nacidos (ver Betz, 1987 para revisión). Como una consecuencia inmediata de estas denervaciones parciales, muchas de las fibras musculares quedan monoinervadas, sin que queden dentro del músculo terminaciones retraídas de la arborización de los axones motores lesionados (como sucedería en condiciones normales). Los resultados de estos experimentos demuestran que la presencia de motoneuronas supernumerarias puede ser determinante del número final de fibras musculares que cada motoneurona debiera inervar. (2) Por otro lado, hay motoneuronas que, no estando afectadas por la denervación y pese a no tener competidores, pierden sus contactos con las fibras musculares. Se ha sugerido que puede estar preprogramado, para cada motoneurona, los contactos que debe eliminar como redundantes (Miller y Stockdale, 1987). Pero la naturaleza exacta de las posibles influencias hereditarias y epigenéticas que puedan operar durante las interacciones iniciales entre los axones motores y las fibras musculares no son claras (Purves y Lichtman, 1985; Sanes, 1987). Se ha sugerido que en el fenómeno de eliminación sináptica únicamente esté implicado el nivel de actividad de la fibra muscular (ver Slack y cols., 1983).

II.2.4.1. Posibles significados del fenómeno de eliminación sináptica.

Una de las primeras propuestas que se han sugerido para interpretar el fenómeno de la eliminación de sinapsis operativas y normales en el período postnatal es que las fibras

musculares estarían inicialmente inervadas por una serie de contactos "erróneos" o inexactos. En el período postnatal, se perderían precisamente estas sinapsis inapropiadas (Redfern, 1970). La eliminación sináptica tendría, pues, una función "correctora" de errores producidos durante el desarrollo embrionario. La pérdida de contactos sinápticos "erróneos" no parece ser el único mecanismo, si no que puede participar, en una proporción reducida, junto con otros mecanismos (Dennis y cols., 1981).

Por otro lado, parece haber ciertas evidencias de que la eliminación sináptica puede jugar un determinado papel en la distribución definitiva de las motoneuronas dentro de los músculos. Por ejemplo, las motoneuronas del músculo glúteo de los ratones adultos distribuyen sus inervaciones con una determinada topografía en concordancia con el origen anterior o posterior, en la médula espinal, de estas motoneuronas. En el glúteo del animal recién nacido esta segmentación topográfica aún no es evidente, ya que solo aparece tras el período de eliminación sináptica (Bennett y Lavidis, 1984). Pese a estar descritos muchos ejemplos como el anterior, la eliminación sináptica no responde en todos los casos a una regulación de la configuración topográfica de la inervación muscular (Thompson, 1983a).

Otra posibilidad en que puede estar involucrado el fenómeno de eliminación sináptica consiste en la precisa inervación de cada tipo de motoneuronas a cada tipo de fibras musculares (tipo I, II y familia de tipos intermedios) para constituir unidades motoras homogéneas (Thompson, 1985 y Reichmann, 1990, para una mayor discusión). Hasta el momento del nacimiento los miocitos están multiinervados por motoneuronas de diferentes tipos y, en el adulto normal, cada tipo de miocito está correctamente inervado por su correspondiente tipo de motoneurona, y, por otro lado, cada "unidad motora" es uniforme (un

determinado tipo de motoneurona inerva a una tipología de miocitos afín). Thompson y colaboradores (1984) han sugerido que la uniformidad de las unidades motoras está íntimamente ligada al período de eliminación sináptica. Sin embargo, están descritos muchos modelos musculares que completan la homogeneidad de sus unidades motoras varias semanas antes de finalizar el período de eliminación sináptica, como por ejemplo en el músculo soleo de rata (Gordon y Van Essen, 1983).

Relacionado con la formación de las unidades motoras, otros autores sugieren que el fenómeno de la eliminación sináptica determina el tamaño de las unidades motoras (número de miocitos inervados por una misma motoneurona). Esta hipótesis argumenta que durante la primoinervación unas motoneuronas "ávidas" por establecer sinapsis establecen contactos con más miocitos de los que les corresponderían. Así, cada unidad motora del período perinatal sería mucho mayor que en la edad adulta, por lo que cabe esperar que la configuración final de las unidades motoras se realice durante el período de eliminación sináptica (Thompson, 1985). Por ejemplo, en el músculo soleo de mamíferos recién nacidos, el tamaño de las unidades motoras disminuye de forma importante hasta que cada motoneurona solo inerva a muy pocos miocitos, tal y como se observa en los animales adultos (Bixby y cols., 1980). Se han detectado otros modelos musculares donde el tamaño de la unidades motoras es diverso (heterogéneo), en estos casos la eliminación sináptica puede también contribuir a que cada motoneurona inerve un "apropiado" número de fibras musculares (Thompson, 1985, para revisión).

II.2.4.2. Participación de la actividad neuromuscular en el fenómeno de la eliminación sináptica.

El nivel de actividad neuromuscular es uno de los principales moduladores del fenómeno de la eliminación de sinapsis redundantes. Inicialmente, este fenómeno se estudió mediante simple tenotomía en el período perinatal: la sección de los tendones del músculo soleo de ratas de 4 días de vida permitió a Benoit y Changeux (1975) observar como los niveles de multiinervación no sólo se mantenían sino que eran muy superiores a los de animales control. Sin embargo, la tenotomía en el animal adulto no altera la capacidad contráctil del músculo, por este motivo no pueden ser extrapolados los resultados obtenidos en adultos a los obtenidos en el período perinatal. Por otro lado, la tenotomía realizada en el período perinatal, puede modificar el crecimiento y maduración del músculo (Thompson, 1985). El hecho de que el músculo tenotomizado en este período no madure correctamente puede ser el responsable del mantenimiento de la multiinervación, más que la inactividad provocada (Thompson, 1985). En otros estudios similares en los que se reduce el nivel de actividad neuromuscular con diferentes agentes paralizantes tanto del componente presináptico (tetradotoxina -Thompson y cols., 1979-; toxina botulínica -Brown y cols., 1982-) como con paralizantes del componente postsináptico (curare y α -bungarotoxina; Duxon, 1982) confirman que la inactividad muscular mantiene y/o aumenta el nivel de multiinervación en el período perinatal.

Por otro lado, la estimulación artificial del nervio ciático de ratas neonatales acelera la eliminación de las sinapsis redundantes, así como la maduración del contacto sináptico (Thompson, 1983b). Se ha sugerido que en el fenómeno de eliminación sináptica únicamente esté implicado el nivel de actividad de la fibra muscular (ver Slack y cols., 1983).

II.2.4.3. Mecanismos de modulación de la eliminación de sinapsis redundantes.

En relación a la eliminación sináptica en el período perinatal, muchos autores apuntan la necesidad de establecer un sistema competitivo, similar al descrito en el apartado de eliminación neuronal, en el cual solo sobreviva, en último extremo, un contacto sináptico por cada fibra muscular. Debe existir un substrato en cada miocito por el que los axones compiten, y este substrato o agente neurotrófico es, con toda probabilidad, de origen muscular (Jansen y cols., 1978; ver también Slack y cols., 1983). En determinadas condiciones, la producción por parte del miocito de esta o estas sustancias se reduce. La fibra muscular puede provocar su monoinervación si la cantidad de agente neurotrófico producido es suficiente únicamente para el mantenimiento de un sólo contacto sináptico (Thompson, 1985). Por otro lado, y como se ha comentado en el apartado anterior, parece evidente que la producción de este factor neurotrófico está íntimamente relacionada con el nivel de actividad muscular perinatal.

Se ha avanzado la hipótesis de que el mecanismo de eliminación sináptica, mediado por determinadas sustancias neurotróficas, permitiría la selección de las terminaciones motoras más operativas con la consiguiente pérdida de los axones motores menos capacitados (ver Thompson, 1985). Ribchester y Tact (1983) estudiaron la reinervación de músculos lumbricoides de rata con algunas de sus ramas paralizadas con tetratoxina y observaron que las terminaciones motoras menos activas (paralizadas) eran reemplazadas por terminaciones motoras activas (no paralizadas). Ridge y Betz (1984), en un experimento similar al anterior, estimularon sólo algunas ramas de las motoneuronas que inervan a los músculos lumbricoides de rata y también observaron como los axones no estimulados eran desplazados por los axones estimulados dentro de una misma fibra muscular. Los resultados tanto de Ribchester y Tact

como de Ridge y Betz indican claramente la existencia de un mecanismo a nivel neuromuscular el cual retiene a las terminaciones más activas.

Después de revisar los aspectos más relevantes de la plasticidad neuromuscular durante las diferentes fases del período del desarrollo, se inicia en el siguiente capítulo una recapitulación de los mecanismos de remodelación en la edad adulta enfatizando en las situaciones de plasticidad sináptica dentro del umbral fisiológico.

II.3. PLASTICIDAD NEURAL EN EL ADULTO.

En el sistema neuromuscular, tanto las motoneuronas como las fibras musculares, retienen ciertas capacidades observadas durante el período de crecimiento que les permite expresar una plasticidad estructural durante toda su existencia (Wernig y Herrera, 1986; Goodman y Shatz, 1993). Esta plasticidad consiste en una continuada formación y eliminación sináptica (remodelación) mediada por fenómenos de crecimiento y retracción de determinadas terminaciones motoras. Los fenómenos que conducen a la retracción axonal en el adulto normal son equiparables a los mecanismos de eliminación sináptica acaecidos en el período perinatal, y los fenómenos que inducen al crecimiento axonal (*sprout*) y a la formación de nuevos contactos sinápticos en el adulto son equiparables a su vez con los mecanismos que modulan y conducen a la primoinervación embrionaria (Herrera y Werle, 1990; ver también Goodman y Shatz, 1993).

En el animal adulto normal parece existir cierto equilibrio entre las "fuerzas" que favorecen el crecimiento neural y las que provocan la retracción axonal. Herrera y Werle (1990) sugieren que este equilibrio puede depender esencialmente del diferente grado de participación de tres factores: (1) el soporte metabólico con que las motoneuronas nutren a sus terminaciones axonales; (2) la competitividad entre los axones motores para establecer contactos sinápticos; y (3) la participación del nivel de actividad mioneural en los mecanismos de interacción entre las terminaciones nerviosas y las fibras musculares que inervan.

Seguidamente se describen las formas básicas de plasticidad morfológica del sistema neuromuscular adulto.

II.3.1. COMPONENTE POSTSINÁPTICO ABANDONADO POR EL AXÓN.

El fenómeno del abandono axonal se puede reconocer, mediante microscopía óptica convencional y con el uso de técnicas combinadas (que evidencian simultáneamente al componente pre- y postsináptico), como porciones del componente postsináptico que no están ocupadas en su totalidad por el correspondiente presináptico en músculos normales (ver por ejemplo Anzil y cols., 1984). Estudios realizados a nivel ultraestructural (Anzil y cols., 1984) revelan que estas zonas postsinápticas corresponden a unos pliegues secundarios normalmente configurados ya que contienen moléculas de acetilcolinesterasa (AChE) y de receptores para la acetilcolina (ACHR) (Courtney y Steinbach, 1981), pero con la salvedad de que no se observa axón que los cubra.

En músculos de animales adultos normales es infrecuente observar un componente postsináptico con ausencia total del axón. Es relativamente más habitual que porciones del componente postsináptico sólo estén parcialmente ocupadas por el axón. En estas situaciones, la terminación nerviosa ocupa únicamente parte del ancho de la hendidura primaria y muchos de los pliegues secundarios se abren fuera del área de contacto mioneural. En anfibios adultos normales existen entre 6 y 15 % de sinapsis neuromusculares parcialmente ocupadas por el axón (Wernig y cols., 1980a y b), siendo estos porcentajes muy superiores a los encontrados habitualmente en músculos de mamíferos adultos normales (ver por ejemplo, Wigston, 1989).

II.3.1.1. Retracción axonal en las sinapsis con componente postsináptico abandonado.

Barker e Ip (1966) describieron la existencia de fenómenos de "degeneración" de ramas de terminaciones nerviosas motoras mediante microscopía óptica utilizando impregnaciones argénticas. Imágenes similares se pueden obtener en los primeros estadios de la degeneración sináptica neuromuscular y durante la eliminación de sinapsis redundantes en el período perinatal.

Posteriormente, tras realizarse estudios a nivel ultraestructural, fueron descritas evidencias de degeneración sináptica a nivel del sistema nervioso central en la rata adulta normal (Sotelo y Palay, 1971) y, a nivel del sistema nervioso periférico, en el músculo ciliar de primates adultos normales (Townes-Anderson y Raviola, 1978). Sin embargo, hasta el momento no se han observado signos de degeneración presináptica a nivel neuromuscular (ni fragmentación, ni fagocitosis de los restos axonales, etc) en músculos normales (Fugisawa, 1976) por lo que parece probable que las configuraciones anormales descritas en terminaciones motoras de anfibios y mamíferos adultos normales representen fenómenos de retracción axonal más que un verdadero fenómeno degenerativo (ver Wernig y Herrera, 1986).

A nivel ultraestructural, se ha podido comprobar que las sinapsis parcialmente abandonadas por el axón presentan una evidente discrepancia entre el diámetro axonal y las dimensiones del pliegue primario, y esta discrepancia puede ser debida a dos únicas posibilidades: (1) por reducción del perfil axonal o (2) por aumento del ancho del pliegue primario. (1) El perfil axonal puede disminuir durante el proceso que conduce a la retracción o bien por la reocupación del pliegue primario abandonado por un *sprout* (se caracterizan por su bajo calibre). (2) El pliegue primario puede implementar su longitud en los casos en que los axones abandonen completamente la hendidura para formar una nueva sinapsis situada adyacentemente al pliegue abandonado. Estudios morfométricos llevados a cabo en sinapsis

neuromusculares de anfibios indican que ambos mecanismos pueden coexistir en un mismo músculo pero en diferentes sinapsis (Wernig y cols., 1980b).

El fenómeno de la retracción axonal ha sido ampliamente estudiado en condiciones fisiológicas en anfibios. Los anfibios presentan una remodelación sináptica habitual mucho más llamativa que en los mamíferos. Por ejemplo, las uniones mioneurales en diferentes momentos del ciclo anual de los anfibios muestran una marcada retracción axonal durante el período estival que conlleva al patrón de ramificación a su mínima expresión, mientras que la misma terminación estudiada en el período de letargo invernal multiplica sus ramificaciones por importantes fenómenos de crecimiento axonal (*sprout*) (Wernig y Herrera, 1986, para revisión; ver también Herrera y cols., 1990).

En los músculos de mamíferos adultos normales es más frecuente observar una continua redistribución interna del patrón de ramificación de las terminaciones nerviosas ("*pequeñas deleciones y adiciones en partes de la configuración inicial*", Wigston, 1989) que detectar extensas retracciones axonales o múltiples retoños nerviosos (*sprout*). En los mamíferos adultos normales es comúnmente aceptado que el abandono sináptico se produce por retracción axonal. En el período perinatal, la eliminación de sinapsis redundantes en músculos de mamíferos presenta, a nivel ultraestructural, muchos puntos en común con las retracciones axonales de la edad adulta. En este sentido, los estadios iniciales de la denervación parcial de músculos de mamíferos muestran gran similitud ultraestructural con las imágenes de retracciones axonales en músculos normales (Birks y cols., 1960). Parece evidente la intervención del citoesqueleto axonal en las diferentes formas de pérdida del axón (eliminación sináptica, denervación, remodelación). Gerta Vrbová propone la participación de ciertas proteasas calcio-dependientes (CANP), presentes normalmente en todos los axones, en la

pérdida axonal en las sinapsis normalmente constituidas. Estas proteasas digieren parte del citoesqueleto axonal en el proceso de eliminación sináptica perinatal (Vrbová y cols., 1988) y en la edad adulta (Vrbová y Fisher, 1989). Por ejemplo, Vrbová y Fisher demuestran que el uso de leupeptina (inhibidor de la CANP) en músculos denervados de animales adultos retarda en gran medida la pérdida del axón denervado.

Así, consideradas en su conjunto, todas estas observaciones proporcionan soporte al concepto de retracción parcial de las terminaciones nerviosas neuromusculares en el contexto más amplio de reformación sináptica en el adulto normal.

II.3.1.2. Modificaciones en el componente postsináptico abandonado.

La pérdida de la acción trófica axonal de forma prolongada implica la desdiferenciación de las estructuras postsinápticas. Miriam Salpeter (1987b) describe signos de degradación postsináptica (balonización de los pliegues secundarios y colapso de las oberturas de estos) a las cuatro semanas de abandono total del axón por denervación. A nivel molecular, también se observan ciertas alteraciones como por ejemplo dispersión de moléculas de AChR sinápticas por la superficie de los miocitos denervados (Lomo y Rosenthal, 1972).

Parece haber cierta relación entre el comportamiento de las moléculas de AChR y los cambios estructurales observados en las sinapsis totalmente abandonadas. En el período perinatal (Reichardt y Tomaselli, 1991) y en la edad adulta (Reist y cols., 1987) están descritas unas moléculas de la matriz extracelular sináptica (familia de las agrinas) que pueden estar íntimamente relacionadas con estos cambios (ver para revisión Ferns y Hall, 1992; y Lieth y cols., 1992). Por otro lado, las moléculas de AChR están ancladas por filamentos transmembranosos al sarcolema sináptico (Froehner, 1986).

La desdiferenciación del componente postsináptico abandonado puede revertir si, eventualmente, es reinervado por un *sprout*. En este sentido, la célula de Schwann también influye en el grado de diferenciación postsináptica. Birks y colaboradores (1960) describen que la presencia glial puede mantener hasta 130 días al componente postsináptico con un aspecto cualitativamente similar al observado en la segunda semana de denervación. La célula glial puede también mantener agregadas a las moléculas de AChR en el área sináptica de músculos denervados durante prolongados períodos de tiempo evitando la habitual dispersión de estas moléculas (Krause y Wernig, 1985).

Independientemente de la participación glial, el componente postsináptico totalmente abandonado puede subsistir, en estado de progresiva degradación, prolongados períodos de tiempo (están descritos hasta 500 días, -Krause y Wernig, 1985-). Se ha sugerido que esta circunstancia responde a facilitar la reinervación de las zonas abandonadas. En este sentido, está ampliamente documentado que la reinervación en músculos denervados suele ir dirigida a las áreas sinápticas abandonadas preexistentes (Letinsky y cols., 1976; Sanes y cols., 1984; Sanes y Covault, 1985; ver para revisión Wernig y Herrera, 1986). Sin embargo, pasado un período de tiempo extremadamente largo las porciones postsinápticas abandonadas pierden capacidad de atracción neural y pueden desaparecer definitivamente (Jans y cols., 1986).

II.3.1.3. Mecanismos responsables del abandono sináptico.

Los mecanismos responsables de la retracción puntual de una rama axonal son todavía de naturaleza oscura. Conceptualmente, se puede asumir que la interrupción de un mecanismo de retroalimentación local, responsable del mantenimiento del contacto sináptico, puede

originar la retracción puntual de una rama axonal; de forma más global, pueden existir ciertos mecanismos que conduzcan a una redistribución del volumen axonal en el patrón de ramificación de las terminaciones nerviosas motoras mediado por cambios locales en el transporte axoplásmico (ver Wernig y Dorlöchter, 1989, para una mayor discusión).

En este contexto, Herrera y Werle (1990), basados en estudios realizados en músculos de anfibios, proponen la existencia de fenómenos que conllevan a una continuada elongación o crecimiento de las ramas axonales hasta cierto límite en que ya no son efectivas. Estos mismos autores sugieren que determinadas dimensiones de las arborizaciones nerviosas hacen ineficaz el soporte metabólico hacia ellas desde el soma neural y, por tanto, disminuye su eficacia sináptica. Desde esta perspectiva, la retracción axonal sería la consecuencia de la disminución en la eficacia sináptica de la rama que se retrae.

Jans y colaboradores (1986) observan, de entre las sinapsis parcialmente abandonadas, que un 27% de estas presentan retracciones en situación "central" (entre dos puntos de ramificación o entre un punto de ramificación y el extremo libre). Además, estos mismos autores describen que en estas retracciones "centrales" suelen estar implicados filopodios y lamelipodios de la célula glial. Wernig y Dorlöchter (1989) sospechan que a nivel de estas retracciones "centrales" puede existir un fallo local en los mecanismos de retroalimentación donde ramas de las terminaciones nerviosas motoras se retiran o son desplazadas por procesos de la célula de Schwann. Para otros autores, la célula de Schwann juega un papel determinante en la retracción axonal. En este sentido, se ha sugerido que la célula glial tiene una continuada tendencia a cubrir por completo al axón, tendencia que estaría contenida por factores locales relacionados con la neurotransmisión (ver Wernig y Dorlöchter, 1989, para revisión).

En este contexto, Fontaine y cols. (1986) han propuesto que un fracaso en los mecanismos de regulación y mantenimiento de las moléculas de AChR puede ser un factor determinante del fallo en el mantenimiento del contacto sináptico, circunstancia que conduciría al abandono axonal. Otros candidatos propuestos para justificar el fracaso del contacto sináptico son los factores reguladores del mantenimiento de las moléculas de AChR como por ejemplo las agrinas (Reist y cols., 1987).

Otros autores (por ejemplo Vrbová y cols., 1988) relacionan el fenómeno de la retracción de las terminaciones nerviosas con la digestión parcial del citoesqueleto axonal por ciertas proteasas calcio-dependientes (por ejemplo las CANP comentadas anteriormente). Según Gerta Vrbová y colaboradores (1988), un aumento discreto en el nivel de neurotransmisión en una terminación nerviosa conlleva a un incremento de la concentración del ión calcio intra-axonal, este calcio acrecenta la capacidad lítica de las CANP.

II.3.2. RETOÑAMIENTO AXONAL (*SPROUT*).

II.3.2.1. Evidencias de retoño axonal en músculos adultos.

Existe una amplia variedad de situaciones en las que puede obtenerse experimentalmente el crecimiento por retoñamiento de la porción terminal de los axones motores en el sistema neuromuscular adulto (ver Brown y cols., 1981b). Independientemente del mecanismo inductor utilizado (pre- o postsináptico) para la interrupción de la neurotransmisión, las células musculares paralizadas son capaces de generar una señal inductora del crecimiento de las terminaciones nerviosas (Wernig y cols., 1981; Slack y cols., 1983; Bennett, 1983). Este crecimiento "inducido" puede manifestarse, por ejemplo, en los axones que restan intactos después de una denervación muscular parcial (Hoffman, 1950), o como respuesta a la acción de toxinas que bloquean la secreción de neurotransmisor, como la toxina botulínica (Duchen y Strich, 1968; Holland y Brown, 1981), la toxina tetánica (Duchen y Tonge, 1973) y la tetradotoxina (Brown y Ironton, 1977). El crecimiento axonal también puede ser inducido por la acción de agentes bloqueantes de los receptores postsinápticos, por ejemplo α -Bungarotoxina (Holland y Brown, 1980) o por espinalización (Brown y cols., 1980b). De forma inversa, la actividad inducida experimentalmente en células musculares previamente paralizadas puede suprimir el crecimiento axonal en la mayor parte de las condiciones experimentales consideradas (Brown y cols., 1981b).

Por otra parte, la parálisis de las células musculares, también retarda el desarrollo del fenómeno de muerte celular de motoneuronas que tiene lugar normalmente en el curso del desarrollo en embriones (Pittman i Oppenheim, 1978), y retarda el proceso fisiológico de eliminación de la multiinervación polineuronal supernumeraria que tiene lugar, tanto en condiciones normales durante la maduración sináptica en el período peri-neonatal (Duxon,

1982), como en el decurso de la reinervación en animales adultos (Benoit y Changeaux, 1978). Contrariamente, el aumento inducido experimentalmente en la actividad muscular acelera la pérdida normal de motoneuronas durante el desarrollo así como la velocidad de eliminación de la multiinervación supernumeraria (Duxon y Vrbová, 1985).

Como se ha comentado anteriormente, las células musculares inactivas podrían liberar un agente trófico para el crecimiento y mantenimiento de las motoneuronas y sus prolongaciones (Slack y cols., 1983).

En este contexto, algunos datos morfológicos indican que en músculos no tratados de vertebrados y en condiciones normales fisiológicas, las terminaciones nerviosas motoras también podrían crecer, teniendo lugar eventualmente, como consecuencia, la formación de nuevos contactos sinápticos funcionales. Así, se han observado fenómenos de retoñamiento axonal y en terminaciones nerviosas de músculos adultos normales de anfibios (Wernig y cols., 1980a; Haimann y cols., 1981; Anzil y cols., 1984) y de mamíferos (Barker y Ip, 1966; Tuffery, 1971; Cardasis y Padykula, 1981; Tomás i Ferré y cols., 1987). Los fenómenos de retoñamiento axonales, se han descrito también desde el punto de vista electrofisiológico, como sinapsis neuromusculares poco desarrolladas que solo pueden liberar una cantidad suficiente de neurotransmisor para desencadenar un potencial de acción en la célula muscular cuando se facilita a los potenciales sinápticos evocados por una salva de estímulos de alta frecuencia, de manera análoga a como puede observarse durante el período de sinaptogénesis (Haimann y cols., 1981).

En realidad, por analogía con los retoñamientos axonales que se desarrollan tanto en las sinapsis intactas después de realizar una denervación muscular parcial, así como en las restantes situaciones experimentales que inducen el crecimiento de los axones terminales, se asume que algunas ramas sinápticas delgadas y muy poco desarrolladas de la arborización

terminal pueden constituir retoños neoformados en el adulto normal (Barker y Ip, 1966; Brown y cols. 1981b).

Se ha demostrado con metodología ultraestructural y citoquímica que en muchos puntos de la zona de contacto entre el retoño axonal y la célula muscular, tanto las diferenciaciones postsinápticas, como los pliegues secundarios o la actividad acetilcolinesterásica de la lámina basal, están muy poco desarrolladas, pudiendo incluso estar ausentes, lo que indica, probablemente, la nueva y reciente formación de contactos sinápticos en el adulto (Anzil y cols., 1984; Wernig y cols., 1984). Así, en efecto, en músculos de anfibios en los que se ha realizado la demostración doble y simultánea de las terminaciones nerviosas y del componente postsináptico - delineado mediante el producto de la reacción citoquímica para la actividad acetilcolinesterásica -, es posible observar en algunas placas motoras, pequeñas zonas de contacto sináptico en las que los pliegues secundarios están completamente ausentes en secciones seriadas. Es conocido que algunas diferenciaciones estructurales sinápticas (por ejemplo, los pliegues secundarios que incrementan la superficie de la membrana de la célula muscular) se desarrollan en un breve tiempo después de que el contacto sináptico inicial ha comenzado a funcionar (Koenig, 1973); dado que en estas sinapsis que se están considerando, están presentes otros elementos sinápticos (por ejemplo, vesículas sinápticas en el componente presináptico, íntima aposición de membranas pre- y postsinápticas, actividad acetilcolinesterásica y agregados moleculares de receptor colinérgico) se ha sugerido que estas zonas puntuales de contacto pueden ser de nueva formación (Anzil y cols., 1984).

En cualquier caso, mientras que es posible la precisa identificación de fenómenos de crecimiento del axón terminal en músculos de anfibios (Wernig y cols., 1980 a,b; Anzil y cols., 1984), esta identificación es más difícil en mamíferos (Cardasis y Padykula, 1981;

Wernig y cols., 1984), dado que uno de los mejores marcadores morfológicos de crecimiento axonal como los conos de crecimiento pueden llegar a no formarse en las terminaciones nerviosas motoras de los músculos esqueléticos de mamífero (Duchen, 1973; ver también Letinsky y cols., 1976). En este contexto, los candidatos más idóneos para ser considerados retoños axonales en proceso de sinaptogénesis, son únicamente las inusuales y muy finas pequeñas ramas terminales de escaso diámetro. Cuando se reconstruye a estas ramas terminales a partir de microfotografías electrónicas de secciones seriadas (Wernig y cols., 1984), se observa que el número de pliegues secundarios por unidad de longitud de contacto pre-postsináptico es menor que en otras zonas de contacto, aparentemente normales, de la misma sinapsis. Estas finas ramas terminales o retoños, contactan también, sobre la superficie de la célula muscular, en algunos sitios discretos donde no se observa la diferenciación de pliegues.

Tomadas en su conjunto, estas observaciones morfológicas indican la formación de nuevos sitios de contacto sináptico por crecimiento axonal en el adulto normal (Wernig y cols., 1984).

Algunos trabajos han observado y seguido *in vivo* en el curso de algunos meses, a un pequeño número de sinapsis neuromusculares individuales bien identificadas en músculos de ratón adulto vivo y normal, mediante la aplicación de colorantes fluorescentes no tóxicos, realizando tinciones repetidas y observación de las mismas terminaciones nerviosas motoras (Lichtman y cols., 1987). Estas observaciones en un determinado período de tiempo de componentes presinápticos funcionales, han demostrado que existe un considerable crecimiento de la mayor parte de arborizaciones axonales sinápticas en función del tiempo. En cualquier caso, una importante observación realizada a pesar de las dificultades técnicas de este planteamiento experimental, también ha sido que parece existir únicamente un pequeño porcentaje

de sinapsis que muestran signos de reformación o remodelación (crecimiento y retracción) de la conexión, en el decurso de un tiempo de observación relativamente largo en relación con la vida del animal experimental (Lichtman y cols., 1987). Quizás en algunos mamíferos, el retoñamiento axonal que ocurre normalmente, no sea un proceso que influya de forma significativa en la morfología de las terminaciones nerviosas. Una explicación alternativa podría ser que el fenómeno de reformación sináptica - que por otro lado es real y bien demostrado en diversos modelos experimentales -, fuera una respuesta plástica a variaciones en el nivel de utilización sináptica, y que en el ratón adulto normalmente estabulado estas eventuales variaciones no fueran significativas. En este sentido, es interesante tener en cuenta que, en anfibios adultos, existe un aumento importante del número medio de retoños o formas de crecimiento por sinapsis en los animales observados en el invierno - durante la época de menor actividad del animal -, en comparación con animales del mismo tamaño estudiados durante el verano. Durante el período de hibernación, se observa además una disminución concomitante en la incidencia de componentes postsinápticos abandonados y aneurales (Wernig y cols., 1980 a). Por otra parte y en este contexto, se ha observado - también en sinapsis neuromusculares de mamífero adulto- que las conexiones nerviosas, pueden adaptarse desde el punto de vista morfológico (patrón de arborización y complejidad), en respuesta a variaciones fisiológicas, mínimas y de corta duración en su nivel de utilización (Tomás y cols., 1989a). En el sistema nervioso central han sido objetivadas, además, otras formas de adaptación o plasticidad funcional como pueden ser los fenómenos de depresión y potenciación post-tetánica (Zucker, 1989; Matthies, 1989).

II.3.2.2. Origen muscular de la señal inductora de crecimiento axonal.

Reduciendo la actividad muscular con agentes paralizantes (toxina botulínica -Duchen y Strich, 1968- ; tetradotoxina -Brown e Ironton, 1977-) o por axotomía espinal (Brown y cols., 1980b) se induce la formación de *sprouts* y paralelamente queda bloqueado el transporte axoplásmico y/o la liberación de sustancias químicas que puedan intervenir en el control de los fenómenos de retoño axonal (Diamond y cols., 1976). Trabajos con nervios motores intactos demuestran que solo provocando cambios degenerativos en la fibra muscular se provoca la aparición de *sprouts*. Esta circunstancia da soporte a la idea de que el único responsable del retoñamiento axonal es el músculo (Brown y cols., 1980a). Por otro lado, impregnando con extractos de degeneración nerviosa a músculos inicialmente intactos se pueden provocar alteraciones miofibrilares en estos músculos (Jones y Vrbová, 1974). Se ha sugerido que en este tipo de experimentos puede desencadenarse cierta reacción inflamatoria y que es esta la responsable de los cambios axonales y musculares observados (Lomo, 1976). Analizadas en conjunto estas experiencias, es inequívoco el pensar en la existencia de algún tipo de influencia de origen neuromuscular que actúe como señal inductora para el crecimiento axonal. En este sentido, se ha hablado de la posible existencia de un factor de crecimiento neural (*motor neuron growth factor* o MNGF, ver Slack y cols., para revisión).

Así pues, una de las propuestas más comunmente aceptadas es que los cambios musculares que siguen a la denervación parcial pueden provocar un "estímulo" del retoñamiento axonal (*sprout*). Las propiedades de la normo-inervación muscular son mantenidas por la actividad muscular (Lomo y Rosenthal, 1972). Así, es posible inducir cambios degenerativos en el músculo bloqueando la actividad nerviosa y, por el contrario, se pueden prevenir estos cambios con la estimulación eléctrica directa del músculo (Lomo y Westgaard, 1976).

II.3.2.3. Factores solubles de crecimiento nervioso.

A nivel somato-sensorial, está ampliamente documentada la existencia de un factor de crecimiento neural (NGF; Levi-Montalcini y Hamburger, 1951). Esta sustancia proteica es liberada por los tejidos diana inervados por axones simpáticos y sensitivos (Harper y cols., 1980) y por las células gliales relacionadas con estos axones (Richardson y Ebendal 1982). Se ha demostrado la existencia de unos receptores localizados en las membranas nerviosas que son altamente específicos para el NGF (Dumas y cols. 1979) que captan el factor neurotrófico y lo transportan hasta el soma neural donde tiene efectos anabolizantes (Thoene y cols., 1971).

Este factor de crecimiento nervioso (NGF) interviene en todos los mecanismos neurales. Por ejemplo, inyectando NGF se pueden prevenir los cambios cromatólíticos inducidos por axotomía (Oppenheim y Nunez, 1982), y se puede guiar *in vitro* al cono de crecimiento axonal con gradientes de concentración de NGF (Gundersen y Barrett, 1980). Por el contrario el uso de anticuerpos anti-NGF altera completamente el metabolismo supervivencia y desarrollo de las neuronas simpáticas y sensitivas en animales adultos (Levi-Montalcini y Booker, 1960).

Existen evidencias, en conjunto menos compactas, de la existencia de factores de crecimiento neural en el sistema neuromuscular. Las neuronas motoras responden a un estímulo producido por el músculo inactivado, incrementando el crecimiento axonal y el número de ramificaciones nerviosas de las arborizaciones intramusculares (Rieger y Raymond-Pincon, 1981). Se ha hablado de la posible existencia de un factor de rebrotamiento nervioso motor (MNGF comentado anteriormente) liberado por músculos inactivos, factor del que se desconoce su naturaleza y composición pero que puede presentar una gran analogía con el

NGF (ver para revisión Brown y cols., 1981b; y Slack y cols., 1983).

El estímulo de crecimiento axonal podría ser originado por algún producto de la degeneración nerviosa, pero se han observado *sprouts* en ausencia de lesión axonal, en estudios con músculos paralizados por bloqueantes de la conducción nerviosa (Brown e Ironson, 1977) o de la transmisión sináptica (Holland y Brown, 1980).

Las fibras musculares inactivas presentan alteraciones en sus propiedades morfológicas, contráctiles y bioquímicas por lo que se ha propuesto que estos cambios puedan inducir un estímulo de crecimiento nervioso (Lewis y cols., 1981). Muestra de ello es que la estimulación eléctrica de un músculo paralizado con toxinas inhibe la aparición de *sprouts* (Brown y cols., 1981b).

Si bien en el período de desarrollo las moléculas neuroactivas de la matriz extracelular sináptica juegan un papel determinante en muchos de los aspectos de la plasticidad sináptica, se ha demostrado (Pockett y Slack, 1982) que el estímulo de crecimiento axonal debe ser difusible ya que una fibra muscular puede provocar la llegada de un *sprout* originado en terminaciones relativamente alejadas. Pockett y Slack (1982) han propuesto que la capacidad de difusión efectiva de un estímulo de crecimiento neural puede ser del orden del diámetro de la fibra muscular que lo produce. Pese a todo no queda descartada la relación de un estímulo de crecimiento neural con componentes de la matriz extracelular sináptica (Slack y cols., 1983).

II.3.3. MECANISMO DE REFORMACION SINAPTICA.

El crecimiento y la regresión de las terminaciones axonales motoras pueden tener lugar simultáneamente en un músculo dado de anfibio adulto normal, e incluso simultáneamente en sinapsis individuales, mientras que otras porciones de la misma sinapsis mantienen una configuración normal (Wernig y cols., 1980b). Este hecho sugiere que las conexiones neuromusculares pueden estar en una situación permanente de reformación, aunque se conoce muy poco respecto de sus causas, mecanismo celular y regulación. En cualquier caso, sí se sabe que en los fenómenos de plasticidad sináptica estructural (crecimiento y retracción axonal) están implicados una serie de cambios a nivel del citoesqueleto presináptico y la participación de un agente trófico neural de origen muscular. Ambos mecanismos serán tratados en este capítulo.

Por un lado, en músculos de anfibios, los componentes postsinápticos total o parcialmente abandonados se observan en mayor proporción en los animales activos en verano (Jans y cols., 1986), y se detecta un aumento significativo en el número de configuraciones de crecimiento axonal en los animales en período de hibernación; y por otro lado existe una plasticidad sináptica estructural dependiente de la actividad en mamíferos, justamente en el sentido de una relación inversa entre la complejidad estructural finalmente alcanzada por las arborizaciones nerviosas y el nivel de utilización de la conexión (Tomás y cols., 1989a). Estos hechos parecen indicar que el nivel de actividad sináptica puede ser realmente un factor de importancia en la regulación de la remodelación sináptica en el adulto normal, determinando la complejidad que puede ser alcanzada por una conexión neural en un momento particular de su historia funcional. Dicho en términos más coloquiales, que la conectividad neural puede

ser en parte, en el adulto, el resultado de la experiencia fisiológica inmediata y particular.

En este sentido, es bien conocido que la actividad sináptica controlada experimentalmente puede limitar las respuestas de crecimiento axonal inducido en la mayor parte de modelos musculares estudiados (revisado por Brown y cols., 1981b; ver también Wernig y Dorlöchter, 1989), lo que posibilita la formulación hipotética de que el crecimiento sería inherente a las prolongaciones axonales y terminaciones nerviosas, aunque sería contraequilibrado o incluso invertido (retracción axonal) por un mecanismo dependiente de la actividad sináptica (Wernig y Herrera, 1986). Así, se ha sugerido que la formación de neurofilamentos y neurotúbulos - elementos que, por otro lado, son regularmente reciclados a nivel de las terminaciones nerviosas por una proteasa dependiente del ión calcio -, es la fuerza motriz que impulsa el crecimiento axonal (Schlaepfer y Micko, 1979). En este contexto, las diferencias estacionales encontradas en anfibios, o las adaptaciones plásticas estructurales actividad-dependientes observadas en mamíferos, podrían ser debidas a una incrementada entrada de iones calcio en las terminaciones más activas, con la consecuencia de un estímulo positivo para la rotura o reciclaje del citoesqueleto terminal con la consiguiente retracción neural o freno en el crecimiento. Cambios opuestos podrían tener lugar en los músculos menos activos (Wernig y Herrera, 1986; Tomás y cols. 1989a; ver también Wernig, 1991).

También se ha considerado alternativamente la hipótesis de la liberación por parte de la membrana de la célula muscular normalmente activada, de un factor difusible limitador del crecimiento, que actuara frenando la tendencia intrínseca al crecimiento de las terminaciones nerviosas (O'Brien y cols., 1978; Vrbová y cols., 1978).

Es conocido que algunas sustancias derivadas de la adenosina pueden realizar importantes funciones reguladoras a nivel sináptico (Stone, 1981). Así por ejemplo, el bloqueo de la entrada de iones calcio en las terminaciones nerviosas, afecta el acoplamiento depolariza-

ción-secreción y la liberación de neurotransmisor calcio-dependiente (Marsal y cols., 1980; ver sin embargo Silinsky y cols., 1987). Algunas observaciones indican también que la disponibilidad del ión calcio es necesaria para la diferenciación y desarrollo adecuado de neuronas en cultivo (Walicke y Patterson, 1981), y que los agentes bloqueantes de la permeabilidad cálcica inhiben la extensión de neuritas así como la formación de sinapsis neuromusculares (Suarez-Isla y cols., 1984). Aunque son necesarios más estudios, es posible especular en este contexto con la hipótesis de que los nucleótidos de origen pre- y postsináptico liberados en el espacio sináptico puedan regular de forma actividad-dependiente, algunos aspectos del mantenimiento, patrón de ramificación, complejidad y capacidad de reformación de las conexiones neuromusculares (ver también Stone, 1981).

En cualquier caso, muchas neuronas requieren también la presencia de un factor trófico, liberado por los tejidos a los cuales inervan, para su correcto desarrollo y mantenimiento de las conexiones (Levi y Alemá, 1991). En este sentido, es también creciente la evidencia de que existe un factor trófico de crecimiento neural, de origen muscular, para las motoneuronas (MNGF) (Brown y cols., 1981b; Bennett, 1983; Slack y cols., 1983). Este factor, cuya liberación podría estar ligada al nivel de actividad de la sinapsis neuromuscular -sería liberado por la célula muscular en menor cantidad cuanto más activa se mantuviera- y tendría una difusión limitada en la vecindad de las células musculares (Slack y cols., 1983). Este factor podría ser la base del control del patrón de ramificación y de la capacidad de remodelación de las terminaciones nerviosas. Se especula que su liberación no es uniforme, siendo posible que diferentes niveles en la secreción de neurotransmisor entre las porciones proximales y distales de las terminaciones nerviosas (Bennett y Lavidis, 1982; Bennett y cols., 1986 a y b), den lugar a la aparición, en la hendidura sináptica primaria, de un gradiente de MNGF, lo que conllevaría la aparición de un nuevo retoñamiento axonal cuando los extremos

distales menos secretores de la arborización sináptica fueran insuficientes para frenar la liberación de MNGF en su vecindad (ver sin embargo, Tomás i Ferré y cols., 1989b). Por el contrario, una terminación nerviosa muy ramificada y efectiva en la neurotransmisión cuántica podría disminuir la liberación por parte de la célula muscular del factor de crecimiento hasta un nivel insuficiente para soportar el mantenimiento de los extremos distales de las ramas terminales que dejarían de crecer o incluso podrían retraerse (Angaut-Petit y Mallart, 1979; Grinnell y Herrera, 1980; Nudell y Grinnell, 1982; ver también Tomás i Ferré y cols., 1987).

II.3.4. CAMBIOS EN LA ARQUITECTURA MIONEURAL EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS.

Están descritos cambios en el tamaño y arquitectura de las uniones mioneurales durante el crecimiento (Oppenheim y Nunez, 1982), envejecimiento (Rosenheimer, 1985) y con diferentes niveles fisiológicos de actividad locomotora (Tomás y cols, 1989b).

Cuando la fibra muscular crece por hipertrofia en el adulto es necesario que el tamaño de la placa motora aumente también ya que se precisa más cantidad de neurotransmisor para provocar la contracción del miocito. Con el aumento de volumen de la fibra muscular cae la impedancia y la transmisión sináptica puede eventualmente fallar. Así por ejemplo, el umbral del potencial de acción sináptico disminuye en estos casos precisando de una mayor efectividad para producirse (Wernig y Dorlöchter, 1989 para mayor discusión). Una forma de aumentar la efectividad sináptica es la de aumentar el volumen de las sinapsis y así se incrementará la cantidad de neurotransmisor que se libere. También puede ser actividad-

dependiente la expresión de un factor de retoñamiento producido por la fibra muscular de forma similar a lo que puede ocurrir en condiciones experimentales con las denervaciones parciales (Hoffman, 1950) o por bloqueo sináptico con agentes paralizantes (Holland y Brown, 1981).

El desuso, la inactividad o la disminución de la actividad sináptica induce la aparición de formas de crecimiento y retoñamiento axonal (*sprout*) en una gran variedad de situaciones (Wernig y cols., 1980a y b; Brown y cols., 1980b; Pachter y Eberstein, 1984) que por otra parte pueden ser revertidos incrementando de nuevo la actividad muscular. Se ha podido comprobar además, que incluso mínimas reducciones de actividad locomotora, como puede ser por ejemplo la estabulación en jaulas metabólicas, conducen a cambios significativos de la morfología sináptica (Tomás y cols., 1989b). Una observación habitual en músculos inactivos común a los músculos denervados o paralizados, es un importante incremento de las formas de crecimiento (*sprout*) (Wernig y Herrera, 1986; Wernig y Dorlöchter, 1989). A nivel ultraestructural, los cambios en los músculos inactivos no son muy importantes, siendo habitual observar acúmulos pseudomembranosos (*myelin-like*) en el citoplasma de las células de Schwann y es más frecuente observar que el axolema que no participa en el contacto sináptico esté completamente cubierto por la célula glial (Pachter y Eberstein, 1984).

En otro tipo de protocolos experimentales que inducen a la inactividad muscular de una forma no agresiva y no fisiológica (por ejemplo, inmovilización de una extremidad) ya se provoca atrofia muscular en cortos períodos de inactividad (Fahim y Robbins, 1986). A nivel óptico, en este tipo de protocolos se puede observar, con α -bungarotoxina marcada, una dispersión de las moléculas de AChR por la superficie del miocito, similar a la habitual en

los casos de denervación (Pestronk y cols., 1976), y una reducción de la actividad colinesterasa (Guth, 1969). A nivel ultraestructural, el componente postsináptico en estos músculos con signos de atrofia sufre importantes modificaciones: los pliegues secundarios se hacen irregulares y ramificados y en el sarcoplasma subsináptico se pueden observar abundantes lisosomas (Pachter y Eberstein, 1984).

La retracción axonal en condiciones incrementadas del nivel de actividad neuromuscular es una observación común documentada en diferentes modelos experimentales (ver Wernig y Herrera, 1986). Pero si el incremento de actividad es abusivo se pueden producir lesiones miolíticas y, en consecuencia, se pueden observar fenómenos de retoñamiento (*sprouts*) en lugar de retracciones axonales (ver por ejemplo Wernig y cols., 1991). Los estudios que introducen niveles elevados y fisiológicos de actividad locomotora en sus protocolos experimentales suelen observar importantes inferencias en la arquitectura sináptica. En este sentido, Tomás y colaboradores (1989a) sometieron a ratas de laboratorio a un ligero entrenamiento durante un mes en una "cinta sin fin" y obtuvieron impregnaciones argénticas de terminaciones nerviosas motoras con una marcada reducción en su complejidad de ramificación (pérdida de ramas) y acortamiento en su longitud total. En músculos de roedor microestimulados a niveles fisiológicos se ha observado que el componente postsináptico no sufre reducción en su longitud total pero se observa una marcada pérdida en su área y amplitud del pliegue primario (Mussini y Carraro, 1991).

A nivel ultraestructural, en los músculos entrenados son evidentes los efectos del incremento de actividad neurotransmisora. Por ejemplo, Pocock y colaboradores (1990) observan en axones motores de músculos de insectos estimulados (*Schistocerca gregaria*) una

menor densidad de vesículas sinápticas, mayor perímetro y área axonal, así como muchas imágenes cisternales, de mitocondrias y de vesículas cubiertas (*coated*); estos autores interpretan estos datos morfométricos como un incremento en la liberación y reciclaje del neurotransmisor (ver también Mussini y Carraro, 1991). Otros autores demuestran que la cantidad de acetilcolina contenida en un cuanto está incrementada en músculos de rana entrenados, pese a que en sus axones motores se observe una menor presencia de vesículas sinápticas (Van der Kloot y Van der Kloot, 1985). Las características ultraestructurales del componente postsináptico en los músculos entrenados están pobremente documentadas. Está descrita una reducción de la ocupación del pliegue primario por el axón (Wernig y Dorlöchter, 1989), una mayor separación entre oberturas (crestas) de los pliegues secundarios (Mussini y Carraro, 1991). En este sentido, la mayoría de los trabajos ultraestructurales centran su interés en las modificaciones estructurales de los componentes postsinápticos de las sinapsis con retracción axonal (ver apartado II.3.1.2.).

Está ampliamente documentado que las conexiones sinápticas de músculos de animales adultos se modifican con el paso del tiempo, además de los efectos derivados de la plasticidad habitual en un adulto normal, por el "envejecimiento" del animal (ver Peretz, 1992, para una amplia y reciente revisión). En estudios morfométricos comparativos entre arborizaciones nerviosas motoras de animales ancianos y jóvenes se ha observado un incremento de la presencia de sinapsis con algún grado de abandono axonal (sinapsis parcial o totalmente abandonadas), así como una sistemática mayor complejidad de los patrones de ramificación (aparecen ramas nuevas) con incremento de longitud total de las terminaciones nerviosas motoras (Smith y Rosenheimer, 1982; Cardasis, 1983; Fahim y cols. 1983; Wernig y cols.,

1984; Herrera y cols. 1990). Según Cardasis y LaFontaine (1987), en los roedores extremadamente viejos (3 años) se produce una disrupción del balance entre el crecimiento y la retracción axonal a favor de pérdida progresiva del área de contacto sináptico, como consecuencia de esto, pese a haber crecimiento axonal, aparece una importante población de sinapsis totalmente abandonadas. Para Robbins y Fahim (1985) el aumento de sarcolemas sinápticos abandonados es producto de la adición de nuevas sinapsis totalmente abandonadas durante el transcurso de una vida (los componentes postsinápticos totalmente abandonados presentan una prolongada permanencia en condiciones normales).

El efecto del transcurso del tiempo en sinapsis neuromusculares también es evidente entre animales jóvenes (aún no han completado su desarrollo corporal) y adultos. Por ejemplo, Arizono y colaboradores (1984) en un estudio con músculos humanos de niños y de personas en edad adulta describen, a nivel ultraestructural, un incremento significativo de la longitud del sarcolema sináptico así como un incremento del número de pliegues secundarios en la edad adulta.

La ultraestructura sináptica se ve muy afectada por la senilidad. Fahim y Robbins (1982; ver también Smith y Rosenheimer, 1982) describen en músculos de ratones viejos una menor densidad de vesículas sinápticas, mitocondrias y área del axón, así como un mayor número de secciones del retículo axoplasmático liso y del número de vesículas *coated*; en el componente postsináptico de estos músculos se observa una gran complejidad en los pliegues secundarios. En este contexto, Arizono y colaboradores (1984) cuantifican una longitud de densificaciones de membrana postsináptica significativamente menor en animales seniles que en jóvenes.

Todas estas observaciones relacionadas con el envejecimiento indican la existencia de una remodelación normalmente continuada. Alternativamente, muchos de estos resultados son

compatibles con imágenes de sinapsis de músculos denervados o paralizados. Por esta razón se ha propuesto que las modificaciones de la arquitectura sináptica en animales por la edad responden a una disminución en la actividad locomotora inherente al envejecimiento y senilidad. En la última década se han publicado abundantes trabajos que refuerzan la dependencia edad-inactividad a nivel neuromuscular. Por ejemplo, Andonian y Fahim (1987) observaron, en músculos de ratones seniles (2 años) físicamente entrenados, una amortiguación de los efectos del envejecimiento. Otros autores, por ejemplo Julie Rosenheimer (1985), atribuyen a determinados factores (intrínsecos o extrínsecos) las modificaciones en las sinapsis de animales seniles; en este sentido, se han propuesto como factores de senilidad: variaciones hormonales (por ejemplo glucocorticoides, Rosenheimer, 1985), agotamiento y bajo recambio de las proteínas reguladoras del Ca^{2+} axoplásmico (Smith, 1988) o enlentecimiento del metabolismo sináptico en general (Robbins y Fahim, 1985).

II.4. HETEROGENEA EFICACIA SINAPTICA PARA UNA MISMA

ARBORIZACION: VISION MORFOFUNCIONAL.

La integración de la información en el sistema nervioso se hace a partir de complejos mecanismos presinápticos y postsinápticos. De cada motoneurona parten varios axones, y cada uno de estos axones puede producir arborizaciones más o menos complejas sobre una o varias fibras musculares. Está ampliamente documentado que los contactos sinápticos presentes en una misma arborización liberan diferente proporción de neurotransmisor. Por ejemplo, después de un estímulo nervioso se observa que la densidad de vesículas sinápticas no se reduce uniformemente en todos los contactos sinápticos de un mismo axón (Laurie y Tremblay, 1982). Incluso está ampliamente documentado que la liberación del neurotransmisor a lo largo de una arborización es más frecuente en unas regiones que en otras (Bennett y Lavidis, 1979 y 1982). El modelo experimental usado habitualmente en este tipo de estudios son las sinapsis neuromusculares de anfibios por que las arborizaciones motoras de los anfibios son extremadamente alargadas, lo que facilita la discriminación de la actividad sináptica entre unas porciones y otras en una misma terminación.

II.4.1. HETEROGENEA ORGANIZACION DE LA ESTRUCTURA SINAPTICA.

II.4.1.1. Estructura postsináptica.

El estudio del componente postsináptico a lo largo de la terminación nerviosa se ha evidenciado clásicamente mediante la detección de actividad acetilcolinesterasa (Karnovsky y Roots, 1964). Mediante esta técnica Wernig y colaboradores (1980 a y b) detectaron menor actividad colinesterasa únicamente en las regiones en que las terminaciones nerviosas están en

fase de remodelación. La detección de moléculas de AChE es un buen marcador de la actividad sináptica, sin esta actividad las moléculas de AChE se degradan rápidamente (Brimijoin y cols., 1986). La detección de moléculas de receptor de la acetilcolina (AChR) con α -bungarotoxina marcada indica únicamente la existencia de un componente postsináptico (Salpeter y Marchaterre, 1992). Las zonas postsinápticas en regresión registran una importante disminución en la densidad de AChR (Wernig y cols., 1980a), en el resto del mismo componente postsináptico se observa una distribución uniforme de estos receptores sin preferencias marcadas. Pese a existir muchos estudios ultraestructurales (ver por ejemplo Robitaille y Tremblay, 1987), hasta la fecha, no se ha estudiado la ultraestructura del componente postsináptico para observar posibles diferencias morfométricas proximo-distales en una misma terminación (sin embargo y en este contexto, está ampliamente documentado a nivel presináptico -ver siguiente apartado-)

En resumen, hay una heterogénea distribución de moléculas de AChE y AChR únicamente en las zonas del componente postsináptico en fase de remodelación.

II.4.1.2. Estructura presináptica.

Las zonas activas del axolema sináptico han sido ampliamente analizadas en relación a la exocitosis de las vesículas sinápticas. La criofractura es la técnica más habitual en este tipo de estudios. Mediante esta técnica, Pumplin (1983) observó variaciones en la morfología de las zonas activas (disposición de las partículas de membrana) entre localizaciones proximo-distales de las arborizaciones nerviosas. En este sentido, Herrera y colaboradores (1985) en un estudio comparativo ultraestructural entre las motoneuronas de dos músculos muy similares en anfibios (*Cutaneous pectoris* y *Cutaneous dorsi*) hallaron una gran correlación entre el contenido cuántico y la longitud de las zonas activas. La criofractura del axolema sináptico

también revela que las zonas activas de los músculos tónicos son irregulares en forma y espaciado de sus partículas de membrana mientras que en los músculos fásicos las partículas de membrana de las zonas activas están regularmente espaciadas y configuradas (Verma, 1984). Por otro lado, la densidad de las vesículas sinápticas entre zonas activas no varía a lo largo de la terminación en músculos de anfibios normales (Werle y cols., 1984).

El resto de componentes del axón se distribuyen de forma heterogénea en una misma terminación nerviosa. Por ejemplo, la densidad mitocondrial crece progresivamente en dirección centrífuga hasta alcanzar la máxima presencia mitocondrial en las regiones distales, además, el diámetro del axón y cantidad de axolema en contacto con el componente postsináptico decrece también de forma centrífuga (Werle y cols., 1984).

Se ha propuesto que los fenómenos de retracción axonal y regresión postsináptica son factores que contribuyen a crear un patrón de neurotransmisión heterogéneo a lo largo de una misma arborización nerviosa (Robitaille y Tremblay, 1987). Y en este contexto, se ha sugerido que los fenómenos de retoñamiento nervioso (*sprout*) pueden ser el resultado de un fracaso en la eficacia sináptica de una determinada zona de la arborización nerviosa (Wernig y cols., 1984). Avala esta propuesta el hecho de que son más frecuentes los fenómenos de *sprout* de origen distal que los de origen proximal (Wernig y cols., 1984). Por otro lado, la formación de nuevos contactos sinápticos (inmaduros) mediante la generación de *sprouts* también puede ser un factor que influye en la heterogeneidad en la neurotransmisión de una arborización nerviosa (ver Robitaille y Tremblay, 1987 para discusión).

En términos generales, Robitaille y Tremblay (1987) proponen que la plasticidad de las uniones neuromusculares es el principal responsable de la heterogénea distribución próximo-distal, tanto de la organización estructural sináptica como de la liberación del neurotransmisor a lo largo de las arborizaciones nerviosas.

II.4.2. HETEROGENEA LIBERACION DEL NEUROTRANSMISOR EN TERMINACIONES NERVIOSAS MOTORAS.

II.4.2.1. Liberación espontánea del neurotransmisor.

En la década de los 50 Del Castillo y Katz (1956) observaron en primicia una gran variación en la frecuencia de aparición de potenciales espontáneos en miniatura (MEPP) en diferentes zonas de una misma arborización (ver también Van der Kloot y cols., 1975 y Tremblay y cols., 1984). Posteriormente, se ha visto que también la amplitud del potencial espontáneo (Tremblay y cols., 1984) y el tamaño de los cuantos liberados (Bieser y cols., 1984) es mayor en las porciones proximales que en las distales de una arborización. En términos generales, las porciones proximales tienen una mayor probabilidad para producir un potencial en miniatura (*mini end plate potential* o MEPP) y también una gran probabilidad de que este MEPP sea de mayor amplitud que en las porciones distales.

En la interpretación de este conjunto de datos electrofisiológicos se ha propuesto que pueden estar relacionados, en los extremos de las terminaciones, con unas características estructurales presinápticas inmaduras (contacto recién formado) o en degeneración (retracción axonal) o por una insuficiente organización axonal (ver Anzil y cols., 1984).

La participación del ión Ca^{2+} es otro importante factor documentado en relación a la desigual liberación espontánea del neurotransmisor a lo largo de las arborizaciones nerviosas (Hubbard y cols., 1968; Mathews y Wickelgren, 1977; Erulkar y Rahaminof, 1978). Las variaciones de las concentraciones axoplasmáticas de Ca^{2+} pueden ser debidas, en parte, a una heterogénea distribución de canales de calcio o una diversa capacidad para tamponar (quelar) el ión Ca^{2+} en diferentes regiones nerviosas. Por ejemplo, Werle y colaboradores (1984)

observan una mayor densidad mitocondrial en las porciones distales de las terminaciones nerviosas en anfibios (las mitocondrias son importantes captadoras de calcio). En este sentido, Herrera y colaboradores (1985) descubrieron, también en músculos de anfibios y a nivel ultraestructural, una fuerte relación entre el número de mitocondrias axonales presentes en un contacto sináptico y la eficacia sináptica de este. Estos autores sugirieron que la baja frecuencia en la producción de MEPPs en las regiones distales está íntimamente relacionada con la importante dotación mitocondrial de estas zonas.

II.4.2.2. Neurotransmisión sináptica no uniforme.

El potencial de acción presináptico (PNAP) se propaga de forma más lenta en los segmentos proximales que en los distales de una misma terminación, paralelamente, conforme avanza el potencial PNAP en dirección centrífuga, decrece su tamaño y el de los potenciales sinápticos que genera (Braun y Schmidt, 1966). Barton y Cohen (1982) sugieren que este fenómeno de pérdida de intensidad a lo largo de la arborización nerviosa puede ser debido a la ramificación centrífugamente mayor del tronco axonal. En este contexto, Mallart (1984) observa una gran densidad de canales de Na^+ a nivel proximal y, en una misma arborización, la ausencia total de estos a nivel distal. Sin embargo, los canales para K^+ están uniformemente distribuidos (Zefirov y Khalilov, 1985). Mallart sugiere que en las porciones proximales los PNAP son de naturaleza activa mientras que en las regiones distales (sin canales para el Na^+) de una misma arborización el potencial de acción presináptico puede ser pasivo (Brigant y Mallart, 1982).

Por otro lado, está ampliamente documentada una gradación centrífuga en la capacidad de liberar neurotransmisor en una arborización nerviosa (ver para revisión Robitaille y Tremblay, 1987). En este sentido, Bennett y colaboradores (1986 a y b) observan además esta gradación próximo-distal en el contenido cuantal en terminaciones nerviosas no ramificadas. En este sentido, Bennett y Lavidis (1982) describe que un 50% de los potenciales sinápticos que tiene una terminación nerviosa durante un PNAP son de origen proximal, cuando suelen existir un mayor número y longitud total de segmentos distales que proximales.

En términos generales, no solo se observa una heterogénea distribución estructural a lo largo de la arborización nerviosa sino que se observa una traducción funcional de este fenómeno. Uno de los mecanismos más comúnmente aceptado para explicar estas diferencias próximo-distales en anfibios implica a la existencia de fenómenos de plasticidad morfológica que suelen presentar los extremos distales de las terminaciones nerviosas (crecimiento o retracción) que puede afectar en gran medida al grado de madurez morfo-funcional de estos segmentos (ver Robitaille y Tremblay, 1987, para revisión).

III. OBJETIVOS.

III.1. OBJETIVO GENERICO.

El objetivo general de este trabajo es el conocimiento cuantitativo preciso por morfometría de la ultraestructura sináptica (en el modelo de los contactos neuromusculares del animal adulto normal), de sus tendencias generales de expresión y de sus eventuales modificaciones en relación con el nivel de utilización fisiológica de las conexiones mioneurales implicadas.

La pretensión final de este objetivo es la de conocer de forma clara la capacidad de adaptación plástica de las conexiones neuromusculares en el adulto normal.

Cada una de las dos series experimentales de este trabajo tiene su propio objetivo parcial.

III.2. OBJETIVOS PARCIALES.

III.2.1. SERIE CONTROL.

El objetivo del estudio morfométrico ultraestructural de los contactos neuromusculares de la serie control es conocer y evaluar la existencia de posibles diferencias en la ultraestructura de los diferentes tipos de sinapsis neuromusculares clasificados en función del grado de inervación o abandono axonal, que en el adulto normal es el signo relevante de la existencia de capacidad plástica de remodelación fisiológica.

III.2.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

El objetivo de la serie de incremento de actividad consiste en conocer la existencia, y evaluar la magnitud y características, de cambios eventuales en la ultraestructura de las conexiones neuromusculares sometidas a un incremento de uso fisiológico.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

IV. HIPOTESIS.

IV.1. HIPOTESIS DE TRABAJO.

En el presente estudio se ha tratado de confirmar o rebatir la siguiente hipótesis de trabajo:

"Las terminaciones nerviosas motoras y las conexiones que generan no son estructuras rígidas en el adulto normal sino que manifiestan fenómenos cuantificables de remodelación en condiciones normales y en respuesta a incrementos controlados y fisiológicos en su nivel de uso".

De esta hipótesis genérica se deriva una hipótesis parcial para cada serie considerada:

IV.2. HIPOTESIS PARCIALES.

IV.2.1. SERIE CONTROL.

"Las formas de contacto sináptico de las terminaciones nerviosas motoras presentan diferencias morfométricas ultraestructurales en la maquinaria de la neurotransmisión en función del grado de abandono axonal".

IV.2.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

"El incremento de uso de las conexiones sinápticas neuromusculares conlleva a una modificación de su patrón morfológico por la retracción de los axones terminales. Este fenómeno se traduce, a nivel ultraestructural, en importantes modificaciones pre- y postsinápticas de adaptación a la nueva situación".

V. MATERIAL Y METODOS.

"Aunque tus ojos no lleguen a penetrar con tanta agudeza como los del famoso Linceo, no rehuses tampoco el unguento que fortalezca tu vista cansada".

Horacio.

V.1. ANIMALES UTILIZADOS.

Para realizar el presente trabajo se han utilizado ratas albinas cepa Sprague-Dawley macho, de 2 a 3 meses de edad y un peso que oscila entre 225 y 250 gr. Los animales fueron suministrados por Charles Rivers.

Todos los animales se han mantenido en las mismas condiciones de estabulación, estas se detallan a continuación: jaulas estándar de MAKROLON[®] (52x28x15 cm); dos animales por jaula; temperatura ambiental, regulada con termostato electrónico, entre 20-22°C y humedad ambiental relativa del 60-70%; ciclos de 12 horas de luz artificial, con neón de luz blanca, y ciclos de 12 horas de oscuridad. Y finalmente, han sido alimentados con pienso de mantenimiento de tipo A.04 PANLAB[®] y agua clorada *ad libitum*. Antes del inicio del estudio los animales fueron estabulados en las condiciones descritas durante un período de 7 días de acomodación después de la fecha en que fueron suministrados.

El cuidado y manipulación de los animales se ha realizado siguiendo las recomendaciones de Helsinki (Villar, 1988).

La selección de animales para su distribución en las diferentes series de estudio ha sido aleatoria.

V.2. MODELO MUSCULAR.

V.2.1. JUSTIFICACION.

El tipo de sinapsis que se ha escogido para realizar este estudio ha sido el neuromuscular. Las ventajas que las uniones neuromusculares ofrecen para el estudio sináptico respecto a las del sistema nervioso central (SNC) entre otras son:

A. El reconocimiento, manipulación y aislamiento de las sinapsis en el músculo es más sencilla que en el SNC.

B. Las fibras musculares acostumbran a estar mono-inervadas, evitándose así la compleja conectividad característica del SNC.

C. Los principios de la regulación del crecimiento y reconocimiento de vecindad pueden extrapolarse, con ligeros cambios, a otros sistemas.

Por estos motivos y dado que uno de los objetivos planteados es conocer posibles modificaciones sinápticas en respuesta a incrementos de actividad locomotora se ha escogido como modelo experimental la sinapsis neuromuscular de un músculo de tipo funcional fásico, cuyo nivel de actividad está directamente relacionado con la marcha, como es el *Extensor digitorum longus* (EDL).

V.2.2. DESCRIPCION DEL MODELO MUSCULAR ESTUDIADO:

EXTENSOR DIGITORUM LONGUS.

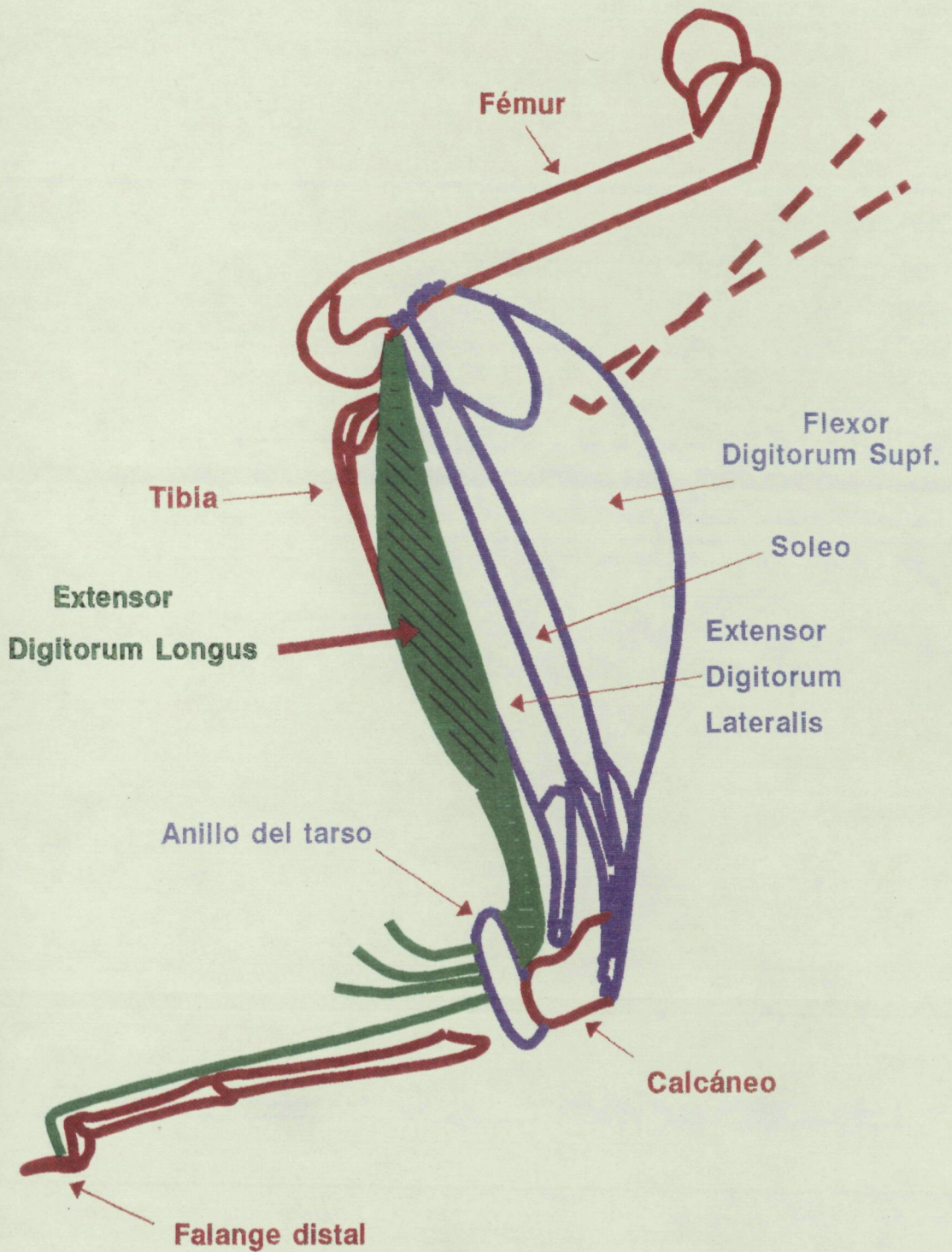
El músculo *Extensor digitorum longus* (EDL) es un modelo experimental ampliamente difundido entre los autores que en sus estudios relacionan el nivel de actividad neuromuscular con variaciones de los contactos sinápticos en ratas (por ejemplo Rosenheimer, 1985; Mussini y Carraro, 1991) y otros animales de experimentación (por ejemplo ratones, Robbins y Fahim, 1985).

En las ratas Sprague-Dawley el músculo EDL es un músculo de contracción rápida y fásica (100 Hz), situado en la porción anteroexterna del segmento distal de la extremidad posterior (Figura 1) y ubicado en el plano medio (Greene, 1963; Hebel y Stromberg, 1986): (1) cubierto básicamente por el bíceps femoral anterior y, en parte, por el tibial anterior; (2)

por su cara posterior se relaciona con el paquete de músculos peroneos. Se origina en el epicóndilo lateral externo del fémur y se inserta distalmente, mediante cuatro tendones, en las falanges distales de los cuatro últimos dedos de la extremidad posterior. En su recorrido pasa bajo el anillo del tarso. Su función es la de extensión de los cuatro últimos dedos de la extremidad posterior, colaborando en la deambulaci3n. Este m3sculo est3 vascularizado b3asicamente por ramas de la arteria tibial anterior. Y su inervaci3n depende de nervio tibial anterior.

El m3sculo EDL esta compuesto por un $3 \pm 1\%$ de fibras musculares del tipo I, $19 \pm 5\%$ de fibras tipo IIa y $77 \pm 5\%$ de tipo IIc (Edstr3m y Larsson, 1987; Sanes, 1987).

Figura 1: *Extensor digitorum longus*. Area anatómica.



V.3. SERIES EXPERIMENTALES.

Para llevar a cabo el presente trabajo y conseguir alcanzar los objetivos propuestos (ver apartado III) se han diseñado dos series experimentales:

Serie 1 o grupo control: formado por 12 ratas mantenidas en condiciones estándar de estabulación ya descritas (ver apartado V.1) hasta los 3 meses de edad. El peso corporal de los animales de este grupo fue, al final del período de observación, de $253,66 \pm 0,50$ gr. De cada animal se estudiaron sus dos músculos EDL, así el total de músculos estudiados en esta serie fue de 24.

Serie 2 o grupo experimental de incremento de actividad: formado por 12 ratas sometidas durante un período de 28 días, de los 2 a los 3 meses, a un incremento fisiológico de actividad según un patrón de entrenamiento locomotor previamente establecido (ver Tabla I; Tomás y cols., 1989a). El peso corporal de los animales de este grupo adquirió un peso medio al final del período de entrenamiento de $380,66 \pm 20,43$ gr. De cada animal se estudiaron sus dos músculos EDL, así el total de músculos estudiados en esta serie fue de 24.

El protocolo de entrenamiento utilizado se detalla a continuación:

El primer día se sometió a los animales a una marcha a baja velocidad (inicialmente 17 m/min. aumentando hasta 19 m/min. al final del día) para su adaptación, y posteriormente esta velocidad se incrementó en 2 m/min. cada día, llegando a una velocidad de 27 m/min. al 5º día. Esta velocidad se mantuvo las tres semanas restantes.

Los animales se entrenaron durante 5 días cada semana a razón de 11 sesiones de 5 minutos de actividad separados de 8 minutos de descanso, lo que totaliza un tiempo de 135 min./día de entrenamiento (55 min. de actividad, 80 min. de descanso).

Al final del período de incremento de actividad los animales habían recorrido una distancia total de 28.545 m.

Para el entrenamiento de los animales con incremento de actividad locomotora, se construyó una jaula al efecto (ver Figura 2) montada sobre una mesa de madera (129 x 65 cm) que soporta un tren de arrastre para una cinta sin fin. La inclinación del conjunto siempre permaneció a 0°. La velocidad de la cinta sin fin puede ser regulada desde 15 a 30 m/min. Los animales se agruparon por parejas tanto para el entrenamiento, debidamente separados por una mampara opaca (ver Figura 2), como para su estabulación. Cada pareja de ratas se entrenó con el mismo horario cada día de trabajo.

Para el control de los períodos de trabajo se ha utilizado un temporizador de corriente, con una relación ciclo conexión/desconexión regulable, ajustado a 5 minutos activo y 8 minutos inactivo.

En los extremos anterior y posterior de la jaula de entrenamiento locomotor se dispuso una varilla metálica que, el primer día de entrenamiento-adaptación, se conectó a un pastor eléctrico que liberaba unas descargas de 5000 voltios en 220 μ s, a una intensidad de 3,6 mAmp. Estas descargas, de características no lesivas, fueron suficientemente desagradables para que los animales aprendieran a alejarse de estas zonas y así mantener un ritmo constante de ejercicio. La fuente de alimentación para este segundo circuito era independiente de la del motor de arrastre de la cinta y del temporizador, siendo el pastor eléctrico efectivo también en los períodos de reposo.

Originariamente se entrenaron un total de 17 animales, pero ya en el primer día 5 de ellos no se adaptaron a la marcha y fueron retirados del estudio. A partir del segundo día, los 12 animales restantes continuaron el entrenamiento plenamente adaptadas y con el pastor eléctrico desconectado.

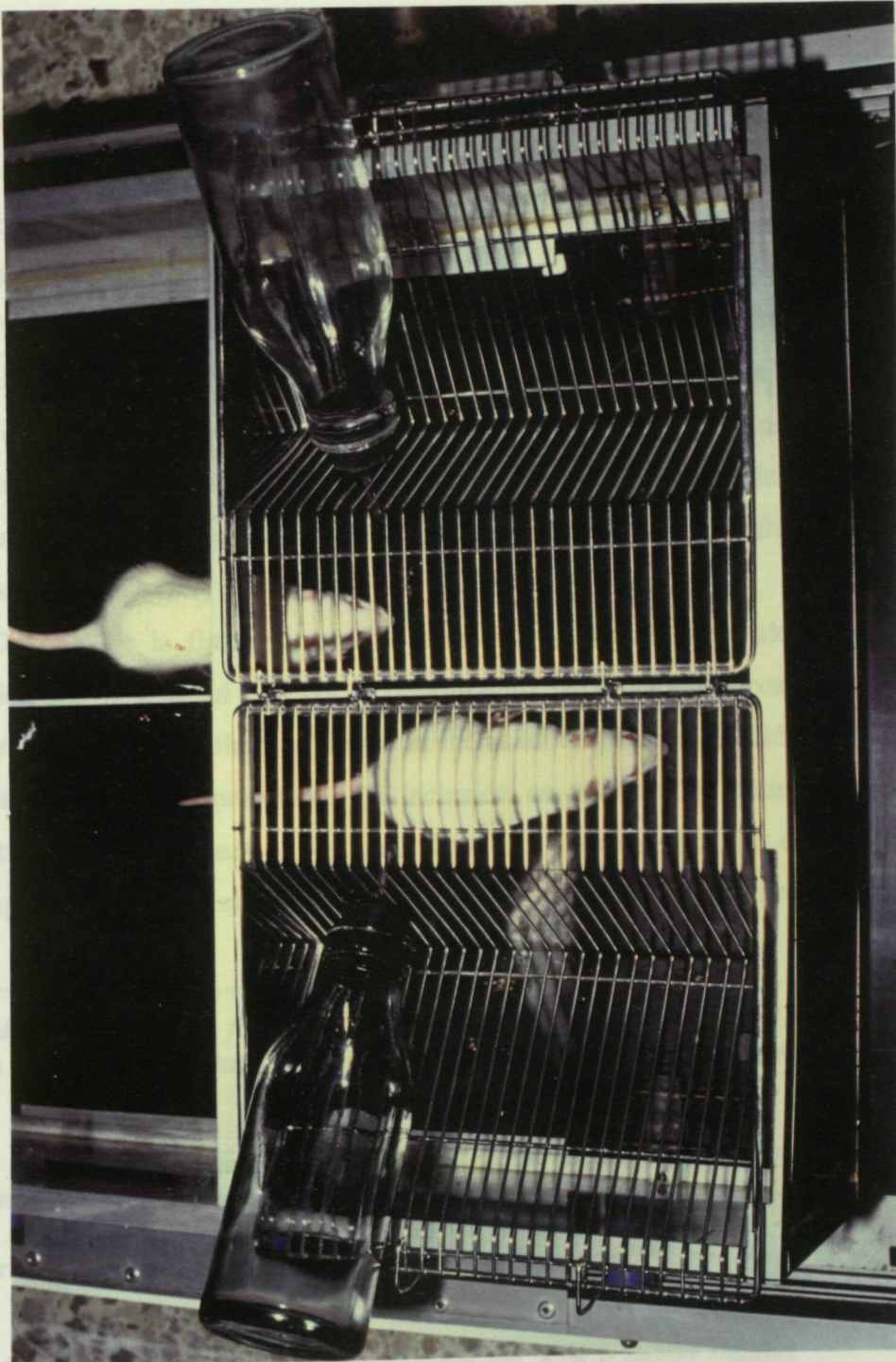
Tabla I: Protocolo de incremento de uso.

Programa de adaptación (Semana 1)

Duración	5 días
Velocidad día 1	17-19 m/min.
Velocidad día 5	27 m/min.
Incremento / día	2 m/min.
Tiempo total entrenamiento / día	135 min.
Tiempo total de actividad incrementada / día	55 min.
Duración períodos de actividad incrementada	5 min.
Número períodos de actividad incrementada / día	11.
Duración períodos de reposo entre períodos de actividad..	8 min.

En el programa de entrenamiento (Semanas 2,3,4), se ha seguido el mismo protocolo que en el día 5 de adaptación, 5 días /semana.

Figura 2: Jaula de entrenamiento.



V.4. TECNICAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION.

V.4.1 PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

Ambos músculos *Extensor digitorum longus* (EDL) fueron disecados, procedentes de ratas sacrificadas por inhalación letal de cloroformo, y posteriormente fueron troceados hasta ser de 1mm³ aproximadamente, y sumergidos en solución fijadora. El tiempo de fijación fue de 3 horas a temperatura ambiente en una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato pH 7,4¹.

Pasadas las tres horas se procedió a la postfijación con tetróxido de osmio al 2% (según el método Dalton²) durante 90 min. En este paso las muestras se oscurecen y ya se pueden observar terminaciones nerviosas en la masa muscular. Este fenómeno permite seleccionar, con lupa binocular, las porciones de las muestras ricas en terminaciones nerviosas, facilitándose así la posterior búsqueda de uniones neuromusculares a nivel ultraestructural.

Después de la fijación, se deshidrataron las muestras con alcoholes de creciente graduación que incluían un paso por alcohol-uranilo³ para mejorar el contraste de la muestra. Al llegar a alcoholes absolutos se inició la inclusión en plásticos (araldita, FLUKA) previo paso por 1-2 óxido de propileno. La inclusión en plásticos se obtuvo realizando pasos consecutivos de disoluciones de óxido de propileno y resinas epóxicas de progresiva pureza hasta llegar al 100% de resina (compuesto I⁴). Las muestras se colocaron en moldes con la

¹ Solución tampón de fosfato potásico 0,1M con fosfato sódico 0,1M a pH 7,4, a esta solución se le añadió glutaraldehído al 25% guardando una relación volumétrica de 1/10.

² El tetróxido de osmio de Dalton se obtiene de la adición de tampón potásico pH 7,5 (solución acuosa de dicromato potásico al 5% y hidróxido potásico), solución acuosa de cloruro sódico al 3,4% y solución acuosa de tetróxido de osmio al 4%, en una relación volumétrica de los tres reactivos de 1/1/2 respectivamente.

³ Solución de acetato de uranilo y alcohol del 70% a partes iguales.

⁴ Relación a/a de resina epóxida y resina endurecedora con 0,1 ml de compuesto plastificante.

solución de resinas polimerizables (compuesto II¹). Antes de pasar a la polimerización se orientaron las muestras con lupa estereoscópica de manera que las fibras musculares fuesen perpendiculares a la superficie prevista para el corte. La polimerización se llevó a cabo mediante una temperatura sostenida de 60°C durante 48h.

La inclusión en araldita permite una dureza suficiente para efectuar cortes extremadamente delgados (cortes semifinos: 0,55µm; cortes ultrafinos: 0.70nm).

Para optimizar los resultados a nivel ultraestructural se seleccionaron las muestras en las que se habían evidenciado terminaciones nerviosas tras la osmificación mediante la visualización de los cortes semifinos obtenidos. Para la obtención de los semifinos (0,55µm) se utilizó un ultramicrotomo (Ultracut E REICHERT-JUNG) y cuchillas de cristal convencionales. Los cortes, recogidos en agua bidestilada, fueron secados a 90°C y posteriormente se colorearon con una solución de azul de metileno al 2% en tetraborato de sodio, a esa misma temperatura. Por último, previa limpieza del exceso de colorante, se montaron las muestras con D.P.X.

Los cortes ultrafinos (0,70nm), depositados en agua bidestilada se recogieron mediante rejillas metálicas (aleación de cobre y níquel). Y el contraste de los tejidos para microscopía electrónica se realizó con citrato de plomo al 0,2% en hidróxido sódico del 0,7%.

¹ *Compuesto I al que se añade 0,1 ml de catalizador -un derivado fenólico con un grupo amino libre-.*

V.4.2. PROCESADO DE LAS IMAGENES OBTENIDAS POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Las muestras visualizadas con un microscopio electrónico de transmisión (MET) de alta resolución (Zeiss EM/10A) fueron captadas directamente por una cámara (Bosch de alta sensibilidad) conectada al transductor del equipo. El seguimiento de las imágenes se realizó mediante un monitor de TV de alta definición (Sony, Trinitron). Mediante un magnetoscopio (Sharp VC-685 sistema VHS) conectado al monitor de TV se grabaron las imágenes seleccionadas en cintas de video de alta sensibilidad (Sony ES-60). Las grabaciones se realizaron en imágenes estáticas de sinapsis neuromusculares tanto a 5.000X como a 10.000X. Las grabaciones a bajo aumento (5.000X) permitieron visualizar tanto el componente pre- como postsináptico en el mismo campo. En los casos en que la sinapsis neuromuscular fue mayor que el campo de visión, la filmación se realizó de forma secuencial, tomando determinados puntos de referencia, precediéndose posteriormente a su reconstrucción (ver siguiente apartado). Las filmaciones a mayor aumento (10.000X) permitieron captar detalles morfológicos (organelas, membranas densificadas, etc) tanto a nivel pre- como postsináptico para su posterior análisis morfométrico.

V.5. ANALISIS MORFOMETRICO.

Las grabaciones de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica se analizaron posteriormente mediante un sistema de análisis de imágenes semiautomático MOP-VIDEOPLAN 2000 (KONTRON) al que se acopló el magnetoscopio y monitor de TV antes mencionados. Las imágenes se introdujeron en el ordenador una vez reproducidas en una tabla de planimetría y con el uso de un puntero óptico (ambos elementos conectados al morfómetro; ver Figura 3). Además, cada una de las imágenes captadas a 5.000X fue reconstruida en papel mediante el lápiz óptico y la tabla de planimetría, así se pudieron estudiar las sinapsis que, por sus dimensiones, ocupaban más de una pantalla o campo de visión. Estas reproducciones sobre papel fueron a su vez introducidas en el sistema. Cabe resaltar que el sistema (pantalla del monitor, magnetoscopio y tabla de planimetría) introduce un factor de aumento final de las imágenes de 1.93X, sobre el que ya tenían (5.000 o 10.000) de manera que la magnificación real en que se ha cuantificado ha sido de 9.650X y 19.300X. Sin embargo, en la descripción de los parámetros se ha usado una nomenclatura que hace referencia al aumento de la captación en MET más que al aumento final. Así, "5X" indica que el parámetro se ha cuantificado a un aumento de 9.650 y "10X" para el aumento de 19.300.

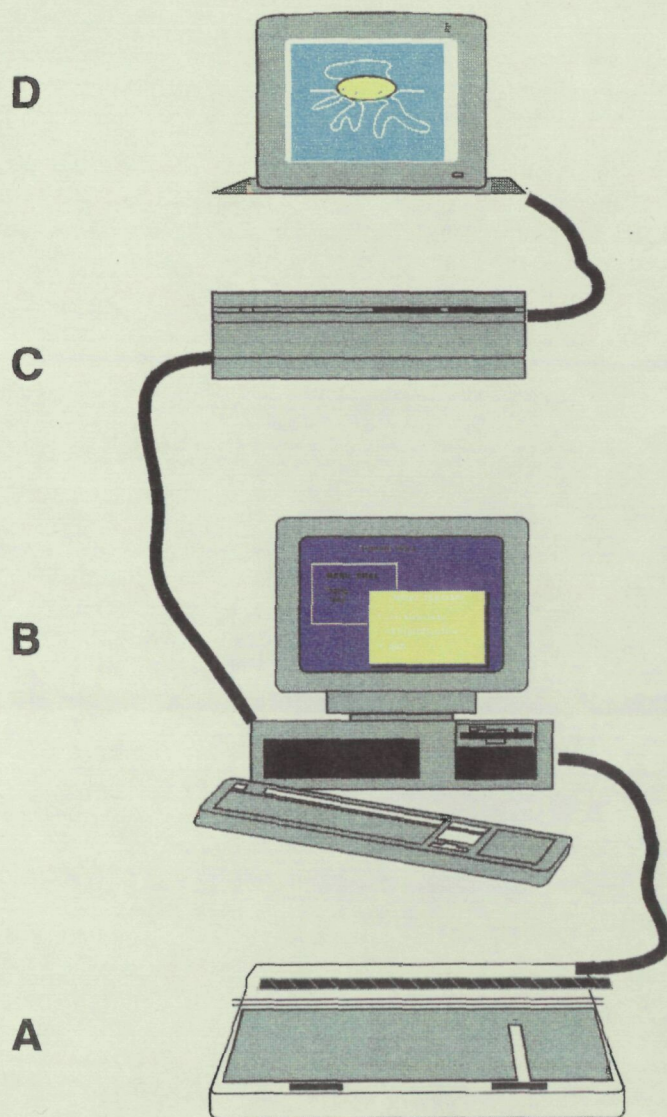
Los resultados obtenidos, una vez transferidos a un ordenador PC-AT, fueron procesados mediante el paquete estadístico SPSS-PC+ y se procedió a la generación de variables estadísticas calculándose la siguientes:

- media, desviación y error estándar, rango, máximos y mínimos.

Para estudiar las diferencias obtenidas entre los datos procedentes de distintos grupos se ha seguido el siguiente procedimiento estadístico, se ha aplicado en todo momento el test más adecuado según las condiciones de normalidad, homogeneidad y número de casos de los parámetros estudiados y se ha fijado el grado de significación para valores $P < 0.05$.

- para los valores cualitativos se ha utilizado el test X^2 o la prueba exacta de Fisher.
- para valores cuantitativos se aplicó el test de Kolgomoroff-Smirnoff y según las normalidades obtenidas se aplicó el test de Student-Fisher (t-test), o test de Wilcoxon (U-test).

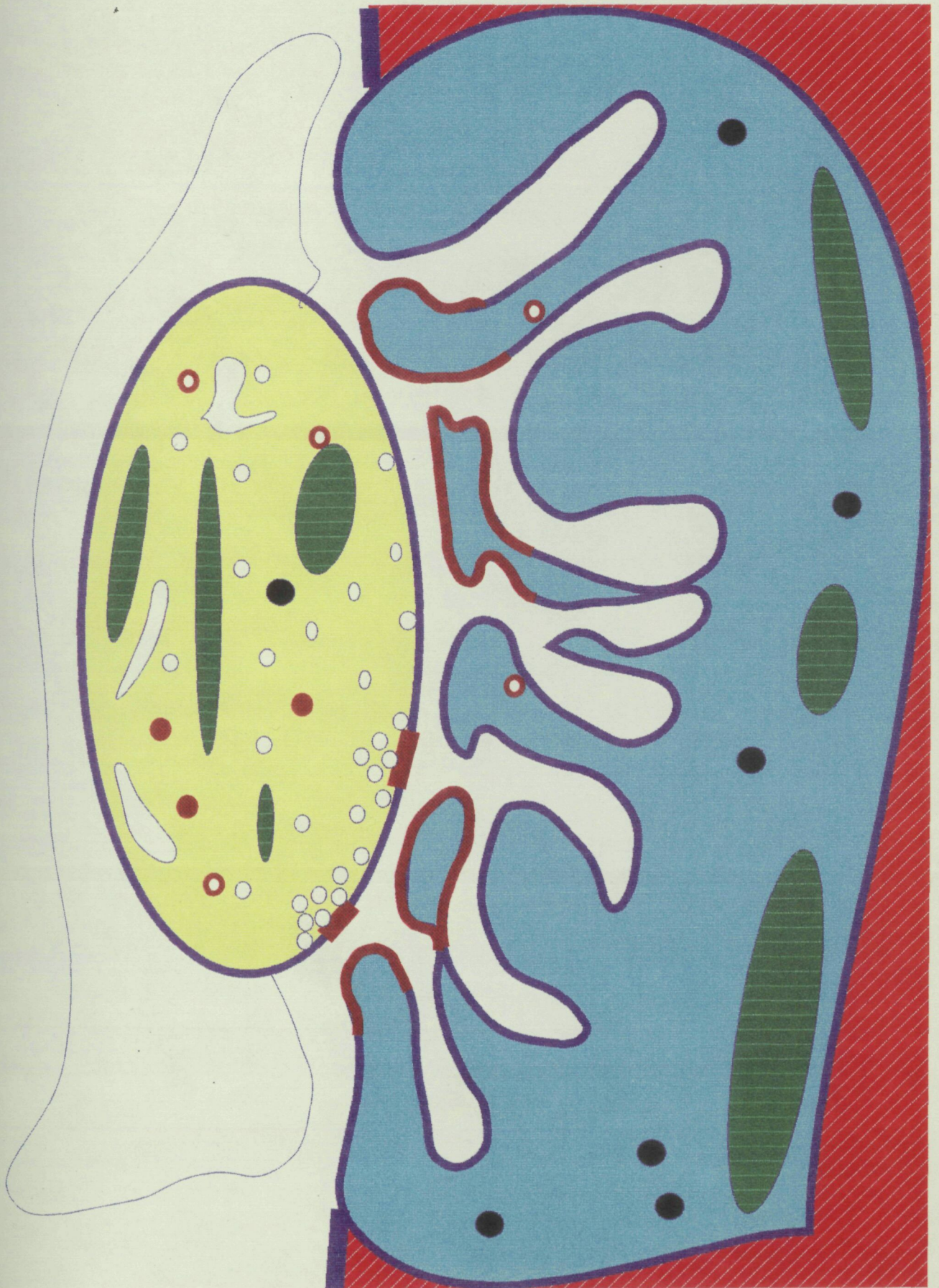
Figura 3: Equipo de morfometría. Visión esquemática.



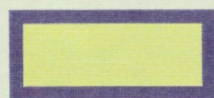
(A): Tabla de planimetría. (B): MOP-VIDEOPLAN 2000. (C): Magnetoscopio.
(D): Monitor de TV.

El proceso para cuantificar las imágenes es el siguiente: Las imágenes de microscopía electrónica captadas en video de alta sensibilidad se reproducen mediante el magnetoscopio (C) y se pueden visualizar en el monitor de TV (D). En la pantalla del MOP (B) aparece un listado de parámetros, personalizados para el presente estudio, para seleccionar el que se pretende valorar. Por otro lado, la tabla de planimetría (A) incluye un puntero óptico cuya posición consta en la pantalla de TV (D) y se superpone con la imagen de microscopía electrónica. De este modo se puede reseguir la estructura a cuantificar, que se visualiza en el monitor de TV (D), sobre la tabla de planimetría (A). Una vez cuantificada la estructura, el MOP (B) aplica los factores de conversión correspondientes al parámetro en concreto y almacena el dato.

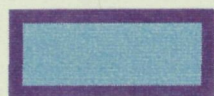
Figura 4: Esquema de la ultraestructura de una sinapsis.



Leyenda de la figura 4



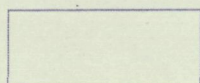
axoplasma



sarcoplasma



miofibrillas musculares



célula de Schwann



**densificaciones de membranas
presinápticas (Z.A.) y de las crestas.**



vesículas sinápticas (V.S.)



vesículas cubiertas



vesículas "core"



mitocondrias



imágenes cisternales/tubulares del R.E.L.



lisosomas

V.5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS

Uno de los objetivos que se pretende cumplir en el presente trabajo es conocer con precisión la ultraestructura sináptica neuromuscular en el adulto normal y constatar sus potencialidades de cambio desde el punto de vista morfológico ante niveles de actividad locomotora fisiológicos. Para cumplir con este objetivo se ha diseñado un protocolo de parámetros morfométricos que incluye el análisis de todos los elementos (ver Figura 4) que constituyen la sinapsis neuromuscular visualizables a los aumentos usados.

La magnificación final en que han sido cuantificados los diferentes parámetros que a continuación se refieren, consta entre paréntesis como "5X" para el aumento de 9.650X, y "10X" para el de 19.300X. Los parámetros cuantificados a bajo aumento (5X), en muchos casos, se han obtenido por reconstrucción (sobre papel) como se ha comentado anteriormente. Para conocer el valor real de los parámetros cuantificados (nm, μm) se ha considerado siempre el aumento final con el que se ha trabajado. Por otro lado, al valorar un parámetro que es el resultado de combinaciones matemáticas de dos parámetros obtenidos directamente de las imágenes de microscopía electrónica pero cuantificados a diferente magnitud siempre se ha aplicado un factor corrector del desnivel de aumento, de manera que el aumento que consta en la descripción de este tipo de parámetros es solo ilustrativo de la cuantificación original.

Tanto en el capítulo de resultados como en el de discusión, siempre que se hace referencia a un parámetro concreto consta en **negrilla**.

A continuación se hace una descripción de todos los parámetros morfométricos estudiados, si bien es importante tener presente que a veces no todos ellos se encuentran en una sinapsis. Con el fin de clarificar los conceptos morfométricos que se detallan a continuación, puede ser de utilidad consultar la Figura 4, donde se esquematizan todas las estructuras sinápticas que se han analizado.

V.5.1.1. Componente presináptico.

1. Area del axón, expresado en μm^2 . Se considera como área del axón a la totalidad de la sección del axón. Independientemente de la importancia intrínseca de este parámetro se considera que el área del axón hace referencia a la totalidad del axoplasma presente en la sección. (5X).

2. Perímetro del axón, expresado en μm . Se considera este perímetro como la longitud de la línea que delimita al axón en la sección de este. Independientemente de la importancia intrínseca de este parámetro se considera que el perímetro del axón hace referencia a la totalidad del axolema presente en la sección. (5X).

3. % de axolema sináptico, hace referencia a la porción del perímetro del axón que está en "contacto" con la fibra muscular y que contribuye a configurar la hendidura sináptica. (ver concepto de "Longitud del axolema sináptico" en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 1). Este parámetro dará información acerca de la proporción de membrana que el axón dedica a contactar con su componente postsináptico y se obtiene:

$$(\text{Longitud axolema sináptico (5X)} / \text{Perímetro del axón (5X)}) * 100$$

4. % de axolema glial, hace referencia a la porción del perímetro axonal que está "cubierto" por célula glial (ver concepto de "Longitud del axolema glial" en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 2). Este parámetro dará información acerca de la capacidad glial para cubrir al axón y se obtiene:

$$(\text{Longitud axolema glial (5X)} / \text{Perímetro del axón (5X)}) * 100.$$

5. % de axolema libre, hace referencia al segmento del perímetro axonal que no está en

contacto ni con la membrana glial ni con la membrana postsináptica (ver concepto de "Longitud del axolema libre" en el apartado V.5.1.3.1. parámetro 3). Este parámetro se obtiene:

$$\text{(Longitud del axolema libre (5X) / Perímetro del axón (5X)) * 100.}$$

6. Ratio área pre- / área postsináptica, relación entre el área del axón y el área postsináptica. Se considera como área postsináptica la que abarca el conjunto de pliegues secundarios estrictamente, desde el pliegue primario hasta la línea imaginaria que une los fondos de saco de los pliegues secundarios más profundos (ver apartado V.5.1.3.2. parámetro 1). Este parámetro dará información, de forma global, acerca de posibles influencias tróficas entre los dos componentes sinápticos y se obtiene:

$$\text{Área del axón (5X) / Área postsináptica (5X)}$$

7. Ratio perímetro / área, relación entre el perímetro axonal y el área axonal, expresado en $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$. Este parámetro dará información acerca de la anfractuosidad de la superficie axonal y se obtiene:

$$\text{Perímetro del axón (5X) / Área del axón (5X).}$$

8. Número de V.S. / μm^2 , número medio de vesículas sinápticas (V.S.) por μm^2 de axoplasma, considerando el área del axón como la totalidad del axoplasma presente en la sección. Este parámetro contabiliza todas las vesículas delimitadas por membrana simple (sin densificar) y de contenido electrón-lúcido (ver concepto de "número de vesículas sinápticas" en apartado V.5.1.3.1 parámetro 4). Este parámetro dará información acerca de la dotación de vesículas sinápticas de que dispone el axón en la sección y se obtiene:

$$\text{Número de vesículas sinápticas (10X) / Área del axón (5X).}$$

9. Diámetro medio de las V.S. por sección axonal, expresado en nm. Este parámetro se ha obtenido realizando dos determinaciones (perpendiculares entre ellas) del diámetro de 30 vesículas sinápticas (V.S.) por cada sección axonal. Este parámetro dará información acerca de la capacidad potencial de las vesículas sinápticas para contener acetilcolina (10X).

10. % de axoplasma ocupado por V.S. (vesículas sinápticas), se considera el área del axón como la totalidad del axoplasma presente en la sección (ver concepto de "Área total de las vesículas sinápticas" en apartado V.5.1.3.1 parámetro 5). Este parámetro dará información acerca de la dotación potencial de acetilcolina presente en el axón y se obtiene:

$$(\text{Área total de las V.S. (10X)} / \text{Área del axón (5X)}) * 100.$$

11. Número de V.S. por μm de axolema sináptico, número de vesículas sinápticas en contacto con el axolema sináptico por μm de esta membrana (concepto de "axolema sináptico" comentado en el parámetro 3 de esta sección; ver concepto de "número de vesículas sinápticas en contacto" en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 6). Este parámetro dará información acerca de la "disponibilidad" potencial de vesículas sinápticas dispuestas a entrar en exocitosis y se obtiene:

$$\text{Número de V.S. en contacto (10X)} / \text{Longitud axolema sináptico (5X)}.$$

12. Número de vesículas *coated* / μm^2 , número medio de vesículas cubiertas o *coated* por μm^2 de axoplasma (área del axón). Se han considerado como vesículas cubiertas aquellas que, presentando unas características (tanto en volumen como en contenido) similares a las vesículas sinápticas, su membrana es considerablemente más electrón-densa (ver parámetro 7 del apartado V.5.1.3.1). Este parámetro dará información acerca del grado de recambio del axolema sináptico y del grado de reciclaje de las vesículas sinápticas que han sufrido exocitosis (las vesículas *coated* están implicadas en estos procesos -ver por ejemplo Heuser, 1989 a y b-).

El Número de vesículas *coated* / μm^2 se obtiene:

Número de vesículas "coated" (10X) / Area del axón (5X).

13. Número de vesículas *core* / μm^2 , número medio de vesículas *core* por μm^2 de axoplasma (área del axón). Se han considerado como vesículas *core* aquellas que presentando unas dimensiones similares a las vesículas sinápticas y *coated*, contienen, en cambio, una partícula electrón-densa (ver parámetro 8 del apartado V.5.1.3.1). Este parámetro dará información acerca del grado de aporte desde el soma neural de organelas y material relacionado con la neurotransmisión (las vesículas *core* están implicadas en estos procesos -ver por ejemplo Bonzelius y Zimmerman, 1990-) y se obtiene:

Número de vesículas "core" (10X) / Area del axón (5X).

14. Número de lisosomas / μm^2 , número de lisosomas contenidos en el axón por μm^2 de axoplasma (área del axón; ver concepto de "Número de lisosomas" en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 9). Este parámetro dará información acerca de la dotación lisosomal de los axones y se obtiene:

Número de lisosomas (10X) / Area del axón (5X).

15. % de axoplasma ocupado por mitocondrias: porcentaje del área del axón que está ocupado por mitocondrias presinápticas. Se ha considerado el área del axón como la totalidad del axoplasma en la sección (ver concepto de "Area total de las mitocondrias" en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 10). Este parámetro dará información acerca de la proporción de axoplasma que el axón dedica al metabolismo oxidativo mitocondrial y se obtiene:

(Area total de las mitocondrias (10X) / Area del axón (5X)) * 100.

16. Número de cisternas del R.E.L. / μm^2 : número de perfiles del retículo endoplasmático liso (R.E.L.) por μm^2 de axoplasma (área del axón). Este parámetro incluye tanto el número de las imágenes tubulares como cisternales que representan al R.E.L. en la sección axonal (ver concepto de "Número de cisternas del R.E.L." en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 11). Este parámetro dará información acerca del grado de desarrollo del retículo endoplasmático liso del axón y se obtiene:

Número de cisternas del R.E.L. (10X) / Área del axón (5X).

17. Número de Z.A. por sección axonal, se han considerado como zonas activas (Z.A.) todas aquellas porciones del axolema (generalmente, axolema sináptico) que aparecen más electrón-densas y que bajo las cuales suelen abrirse los pliegues secundarios postsinápticos. Los parámetros referentes a las zonas activas (parámetros 17, 18, 19, 20, 21 y 22 de esta sección) darán información acerca de la capacidad potencial de los axones de liberar neurotransmisor a través de estas especificidades de membrana. (10X).

18. Longitud media de las Z.A. (zonas activas), expresado en nm (ver concepto de "Longitud total de Z.A." en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 12). Este parámetro dará información acerca del grado de desarrollo de las zonas activas presentes en el axolema y se obtiene:

Longitud total de las Z.A (10X) / Número total de Z.A (10X).

19. % de Z.A. que están encaradas con las oberturas postsinápticas de los pliegues secundarios. El concepto de encaramiento (número de Z.A. encaradas) excluye a aquellas zonas activas que no están orientadas sobre una abertura de los pliegues (por ejemplo sobre alguna cresta, en contacto con la célula glial o fuera de la hendidura sináptica; ver parámetro 13 en el apartado V.5.1.3.1). La orientación común de las Z.A. suele ser sobre alguna abertura de los pliegues secundarios, así, este parámetro dará información acerca de las zonas

activas que están en su ubicación correcta. Este parámetro se obtiene:

$$(\text{Número de Z.A. encaradas (10X)} / \text{Número total de Z.A. (10X)}) * 100$$

20. % de axolema ocupado por Z.A., proporción de perímetro axonal (axolema) que ocupan la totalidad de las zonas activas de la sección (ver concepto de "Longitud de las Z.A." en el apartado V.5.1.3.1 parámetro 12). Este parámetro dará información acerca de la proporción de membrana que el axón dedica a zonas activas y se obtiene:

$$(\text{Longitud total de las Z.A.} / \text{Perímetro del axón (5X)}) * 100$$

21. % del axolema sináptico ocupado por Z.A. (zonas activas), proporción del segmento del perímetro axonal propiamente sináptico (ver parámetro 3 de este apartado) que está ocupado por la totalidad de las zonas activas presentes en la sección. Este parámetro, siendo similar al anterior, dará información más específica acerca del grado de desarrollo de las zonas activas de la membrana axonal y se obtiene:

$$(\text{Longitud total de las Z.A. (10X)} / \text{Longitud axolema sináptico (5X)}) * 100.$$

22. Número de Z.A. por μm de axolema (perímetro del axón), independientemente del "encaramiento" o características métricas de las zonas activas. Este parámetro nos dará información de la cantidad de axolema que se precisa para que aparezca una zona activa y se obtiene:

$$\text{Número total de zonas activas (10X)} / \text{Perímetro del axón (5X)}.$$

23. Separación axón-postsináptico, anchura media de la separación entre el axón y el componente postsináptico (hendidura sináptica), expresado en nm. Se ha cuantificado este

parámetro por la determinación, perpendicular al pliegue primario, desde la porción central de la superficie de cada cresta hasta el axolema sináptico. Este parámetro nos dará información acerca de la distancia media que deben recorrer las moléculas de acetilcolina liberada en las zonas activas para contactar con sus receptores postsinápticos. (10X).

24. Separación célula glial-postsináptico, anchura media de la separación entre la célula de Schwann y el componente postsináptico, expresado en nm. Este parámetro se ha cuantificado de forma similar al anterior, y ha sido obtenido en las sinapsis que presentaban alguna forma de abandono axonal con participación glial. También se ha cuantificado este parámetro en algunas sinapsis de aspecto normal que presentaban prolongaciones gliales sobre la fibra muscular, en las inmediaciones de la placa motriz, es decir que no participan directamente en la sinapsis). El interés de este parámetro radica en que la célula glial puede, en muchos casos, ofrecer ciertos beneficios de características tróficas a las porciones del componente postsináptico que cubre (ver por ejemplo Krause y Wernig, 1985). (10X).

V.5.1.2 Componente postsináptico.

Para simplificar la descripción de los parámetros postsinápticos, se ha usado una notación, que consta entre paréntesis, y que sólo se usará en este subapartado por lo que no consta en los capítulos de resultados ni discusión así como tampoco en las tablas de resultados.

En la mayoría de los parámetros diseñados existen estas tres posibles categorías de componente postsináptico: (1) componente postsináptico "subaxonal" es la porción cubierta y en íntima relación con el axón, (2) "subglial" si es la célula de Schwann la que cubre íntimamente una porción del componente postsináptico y (3) componente postsináptico "abandonado" cuando no está cubierto ni por el axón ni por la glía.

1. Longitud del sarcolema, expresado en μm (10X), en sus variantes:

- a. sarcolema subaxonal. (APL).
- b. sarcolema subglial, en las sinapsis con abandono. (GPL).
- c. sarcolema abandonado, en las sinapsis con abandono. (NPL).

2. Longitud del sarcolema total, longitud de todo el sarcolema del componente postsináptico para cada sección, expresado en μm . (PTL).

$$\text{PTL} = \text{APL} + \text{GPL} + \text{NPL}.$$

3. % de sarcolema opuesto a..., porcentaje de la longitud total del sarcolema que está ocupado por cada tipo de sarcolema considerado:

- a. **opuesto a axón o subaxonal. (APR)** = $(\text{APL} / \text{PTL}) * 100$.
- b. **opuesto a la célula glial o subglial. (GPR)** = $(\text{GPL} / \text{PTL}) * 100$.
- c. **abandonado. (NPR)** = $(\text{NPL} / \text{PTL}) * 100$.

En los casos en que no todo el componente postsináptico esté cubierto por el axón, este parámetro dará información acerca de como queda distribuido el sarcolema postsináptico.

4. Amplitud de las oberturas, amplitud media de las oberturas de los pliegues secundarios, expresado en nm (10X). Se ha cuantificado este parámetro mediante la determinación de la línea imaginaria que une las bulbosidades apicales de las dos crestas que conforman la obertura del pliegue primario. Además, esta línea imaginaria es paralela al pliegue primario.

Según el sarcolema considerado se pueden tener tres categorías de oberturas:

- a. **subaxonales. (APO)**.
- b. **subgliales. (GPO)**.
- c. **abandonadas. (NPO)**.

5. Amplitud de las crestas: Amplitud media de las crestas inter-pliegues secundarios, expresado en nm (10X). Para la cuantificación de este parámetro, se han tomado varias determinaciones del diámetro máximo apical y en la dirección del pliegue primario, de las bulbosidades apicales que suelen presentar las crestas. Además, la línea imaginaria que conforma esta amplitud se continua con la de las oberturas, y al igual que esta, es paralela al pliegue primario.

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías de cresta:

- a. subaxonales. (APC).
- b. subgliales. (GPC).
- c. abandonadas. (NPC).

6. **Ratio amplitud cresta/obertura**, relación entre la amplitud media de las crestas y la amplitud media de las oberturas de los pliegues secundarios. (PC/PO).

$$(PC/PO) = \text{Amplitud de crestas (10X)} / \text{Amplitud de oberturas (10X)}.$$

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías de *ratios*:

- a. subaxonal. (APC/APO).
- b. subglial. (GPC/GPO).
- c. abandonado. (NPC/GPO).

Este parámetro dará información acerca de la proporcionalidad de las posibles modificaciones en la amplitud de las crestas y en la amplitud de las oberturas.

7. **% de pliegue primario ocupado por crestas de los pliegues secundarios. (CR)**. Se ha considerado como pliegue primario a la línea imaginaria que une la porción más apical de las crestas postsinápticas (los pliegues secundarios se presentan como unas digitaciones de membrana en dirección radial o perpendicular al pliegue primario; ver concepto de "amplitud total de las crestas" y "Longitud del pliegue primario" en el apartado V.5.1.3.2 parámetros 2 y 3).

$$CR = (\text{Amplitud total de las crestas (10X)} / \text{Longitud pliegue primario (5X)}) * 100$$

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. (ACR).
- b. subglial. (GCR).
- c. abandonado. (NCR).

Este parámetro (**% de pliegue primario ocupado por crestas**) dará información acerca de las dimensiones de las crestas, vistas en conjunto, complementando la información obtenida con los parámetros: **amplitud de las crestas** y **Ratio amplitud cresta/obertura**.

8. Longitud del pliegue secundario, longitud media de los pliegues secundarios con abertura presente en la sección. Se ha cuantificado esta longitud por determinaciones de todo el recorrido sarcoplasmático, con solución de continuidad, de cada pliegue secundario desde su abertura hasta el fondo de saco presente en la sección. (10X).

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. (**APP**).
- b. subglial. (**GPP**).
- c. abandonado. (**NPP**).

9. Número de secciones por abertura, en este parámetro se incluyen, indistintamente, el número medio de fondos de saco y el número medio de imágenes de cisternas observadas. Estas cisternas son debidas a la sección de las tortuosidades de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático (ver apartado V.5.1.3.2 parámetro 4). (**PR**).

$$\text{PR} = \text{Número de secciones (10X)} / \text{Número de aberturas (10X)}.$$

Por tanto, este parámetro es indicativo del grado de tortuosidad-complejidad de los pliegues secundarios.

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. (**APR**).
- b. subglial. (**GPR**).
- c. abandonado. (**NPR**).

10. Número de secciones por abertura, totales: Número medio de fondos de saco y de secciones de los pliegues secundarios por abertura, en todo el componente postsináptico.

(PRT). El parámetro **Número de secciones por obertura, totales** se obtiene:

$$\text{PTR} = (\text{APR} + \text{GPR} + \text{NPR}) / 3.$$

11. Penetración de las densificaciones del sarcolema apical de las crestas por los pliegues secundarios, expresado en nm (10X). Este parámetro hace referencia a la porción del sarcolema densificado (más electrón-denso que el resto del sarcolema) que va desde el punto que delimita la obertura (línea imaginaria que se ha considerado en el parámetro 4 de esta sección para determinar la "Amplitud de las oberturas") hasta el punto en que el sarcolema deja de estar densificado. **(DP).**

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. **(ADP).**
- b. subglial. **(GDP).**
- c. abandonado. **(NDP)**

Este parámetro dará información acerca de la magnitud y grado de desarrollo del sarcolema densificado (estas porciones electrón-densas o densificadas del sarcolema tienen un papel fundamental en la neurotransmisión en el componente postsináptico -ver por ejemplo Ellisman y cols., 1976-).

12. % de crestas densificadas, para la determinación de este parámetro, se ha considerado que una cresta está densificada cuando presenta, en su porción apical, una o varias densificaciones de membrana, independientemente de la longitud de éstas (ver apartado V.5.1.3.2 parámetros 5 y 6). **(DR).**

$$\text{DR} = (\text{Número de crestas densificadas (10X)} / \text{Número total de crestas (10X)}) * 100.$$

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. **(ADR).**
- b. subglial. **(GDR).**
- c. abandonado. **(NDR)**

Este parámetro (**% de crestas densificadas**) dará información acerca del "grado de densificación" de las crestas de una determinada porción de componente postsináptico.

13. Longitud media de las densificaciones de las crestas, expresado en nm (10X).(DL).

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. (ADL).
- b. subglial. (GDL).
- c. abandonado. (NDL).

Este parámetro, conjuntamente con el parámetro "Penetración de las densificaciones", dará información acerca del grado de desarrollo y magnitud de las densificaciones del sarcolema postsináptico.

14. Ratio entre la longitud de las densificaciones pre-/ postsinápticas, relación entre la longitud total de las zonas activas del axolema (ver apartado V.5.1.3.1 parámetro 12) y la longitud total de las densificaciones de las crestas de los pliegues secundarios (ver apartado V.5.1.3.2 parámetro 7). (ZA/D).

$$(ZA/D) = \text{Longitud total Z.A. (10X)} / \text{Longitud total densificaciones (10X)}.$$

Este parámetro dará información acerca de la proporcionalidad de las posibles variaciones en las características métricas de las zonas activas (elemento presináptico esencial para la neurotransmisión) y las posibles variaciones en las características métricas de las densificaciones del sarcolema (elemento postsináptico esencial en la neurotransmisión).

15. Número de vesículas *coated* por obertura, número medio de vesículas cubiertas o *coated* postsinápticas en contacto con la membrana de los pliegues secundarios, en su recorrido sarcoplasmático, por cada pliegue secundario identificado por su obertura (identificación de vesículas *coated* comentada en el parámetro 12 del apartado anterior; ver apartado V.5.1.3.2 parámetro 8 para concepto de "Número de vesículas *coated*" y parámetro

9 para concepto de "Número de oberturas"). (VC/O).

$$(VC/O) = \text{Número de vesículas "coated" (10X)} / \text{Número de oberturas (10X)}.$$

Según el sarcolema considerado se pueden obtener tres categorías:

- a. subaxonal. (AVC/O).
- b. subglial. (GVC/O).
- c. abandonado. (NVC/O).

Este parámetro dará información acerca del número de vesículas *coated* asociadas a los posibles cambios en las características métricas del sarcolema postsináptico y de las membranas densificadas postsinápticas (las vesículas *coated* están relacionadas con el recambio del sarcolema -ver por ejemplo Pearse y Bretscher, 1981- y de la membrana densificada -ver por ejemplo Pumplín y Bloch, 1990-).

16. Número de mitocondrias por μm^2 de postsináptico, Número total de mitocondrias contabilizadas en todo sarcoplasma sináptico presente en la sección por μm^2 de área que ocupan todos los pliegues secundarios (concepto comentado en el parámetro 6 del apartado anterior; ver concepto de "Numero de mitocondrias postsinápticas" en al apartado V.5.1.3.2 parámetro 10). (PMD).

$$\text{PMD} = \text{Número de mitocondrias postsinápticas (10X)} / \text{Area postsináptica (5X)}$$

Este parámetro dará información acerca del soporte metabólico mitocondrial que precisan el conjunto de pliegues secundarios postsinápticos de una sinapsis.

17. Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico, número de lisosomas contabilizados en todo sarcoplasma subsináptico presente en la sección, por área que ocupan todos los pliegues secundarios postsinápticos (concepto comentado en el parámetro 6 del apartado anterior; ver concepto de "Numero de lisosomas postsinápticos en al apartado V.5.1.3.2 parámetro 11) (PLD).

El Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico se obtiene:

$$\text{PLD} = \text{Número de lisosomas postsinápticos (10X)} / \text{Area postsináptica (5X)}.$$

V.5.1.3.- Otros parámetros.

Los parámetros referidos en este apartado forman parte de determinadas combinaciones matemáticas que permiten obtener un importante grupo de parámetros acabados de detallar en los dos apartados anteriores (V.5.1.1. y V.5.1.2.). Los valores de estos parámetros (de tipo operativo) son menos representativos que los parámetros matemáticos que alimentan, por ese motivo no constan en las tablas del capítulo de resultados.

V.5.1.3.1- Otros parámetros presinápticos.

- 1. Longitud del axolema sináptico:** Porción del perímetro axonal que está en contacto con la fibra muscular, expresado en μm . (5X).
- 2. Longitud del axolema glial:** Porción del perímetro axonal que está en contacto con las prolongaciones de la célula de Schwann, expresado en μm . (5X).
- 3. Longitud del axolema libre:** Porción del perímetro axonal que no está en contacto ni con la célula glial ni con la célula muscular, expresado en μm . (5X).
- 4. Número de vesículas sinápticas presentes en la sección axonal.** Este parámetro contabiliza todas las vesículas ovoides o circulares, cuya membrana vesicular es simple (sin densificar), de contenido electrón-lúcido y que suelen formar la población mayoritaria de vesículas del axón. (10X).
- 5. Area total de las V.S. (vesículas sinápticas):** Area que ocupan en la sección axonal, todas las vesículas sinápticas presentes en el axón. Este parámetro se obtiene por la determinación directa del área media de 30 vesículas sinápticas (10X) y por estimación según la siguiente

fórmula:

Area media de 30 V.S. (10X) * Número de V.S. (10X).

- 6. Número de V.S. en contacto "físico" con el axolema sináptico.** Se hace referencia a aquellas vesículas sinápticas que presentan su membrana vesicular en íntimo contacto con el axolema sináptico en toda su longitud y habitualmente situadas a nivel de las densificaciones del axolema denominadas zonas activas. (10X).

- 7. Número de vesículas *coated* o cubiertas presentes en la sección axonal.** Se han considerado como vesículas cubiertas aquellas que, presentando unas características (tanto en volumen como en contenido) similares a las vesículas sinápticas, su membrana es considerablemente más electrón-densa. Este tipo de vesículas están en muy baja proporción y uniformemente distribuidas por todo el axoplasma. (10X).

- 8. Número de vesículas *core* presentes en la sección axonal.** Se han considerado como vesículas *core* aquellas que presentando unas dimensiones similares a las vesículas sinápticas y *coated*, contienen, en cambio, una partícula electrón-densa. Al igual que las vesículas *coated*, este tipo de vesículas están en muy baja proporción y uniformemente distribuidas por todo el axoplasma. (10X).

- 9. Número de lisosomas presentes en la sección axonal.** (10X).

- 10. Area total de las mitocondrias presentes en la sección axonal.** Este parámetro se ha obtenido por la determinación directa del sumatorio del área de cada mitocondria contenida en la sección axonal. (10X).

- 11. Número de cisternas del R.E.L. (retículo endoplasmático liso) presentes en la sección axonal.** Este parámetro se ha obtenido por la cuantificación directa tanto del numero de las imágenes tubulares como cisternales que representan al R.E.L. en la sección axonal. (10X).

12. Longitud total de las Z.A. (zonas activas) presentes en el axolema por sección axonal. Este parámetro se ha obtenido por la determinación directa del sumatorio de la longitud de cada Z.A. presente en la sección axonal. (10X).

13. Número de Z.A. encaradas a las oberturas de los pliegues secundarios del componente postsináptico. En este parámetro se han valorado todas las zonas activas excepto aquellas que no están orientadas sobre una abertura de los pliegues (por ejemplo sobre alguna cresta, en contacto con la célula glial o fuera de la hendidura sináptica). (10X).

V.5.1.3.2- Otros parámetros postsinápticos.

1. Area postsináptica: Area en que están comprendidos todos los pliegues secundarios, desde el pliegue primario hasta la línea imaginaria que une los fondos de saco más profundos. (5X).

2. Amplitud total de las crestas: Sumatorio de la amplitud de todas las crestas postsinápticas contenidas en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (10X).

3. Longitud del pliegue primario: Parámetro obtenido por la determinación de la longitud de la línea imaginaria que une las crestas contenidas en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (5X).

4. Número de secciones de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático contenidos en una determinada porción del componente postsináptico (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (10X).

5. Número de crestas densificadas contenidas en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). Se ha considerado como crestas densificadas todas aquellas crestas que presentan en su porción apical un sarcolema electrón-denso o densificado (10X).

6. Número total de crestas: Independientemente de la presencia de membrana densificada, contenidas en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (10X).

7. Longitud total de las densificaciones de las crestas de los pliegues secundarios contenidos en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). Este parámetro se ha obtenido por el sumatorio de la determinación directa de las longitudes de cada densificación de membrana postsináptica (10X).

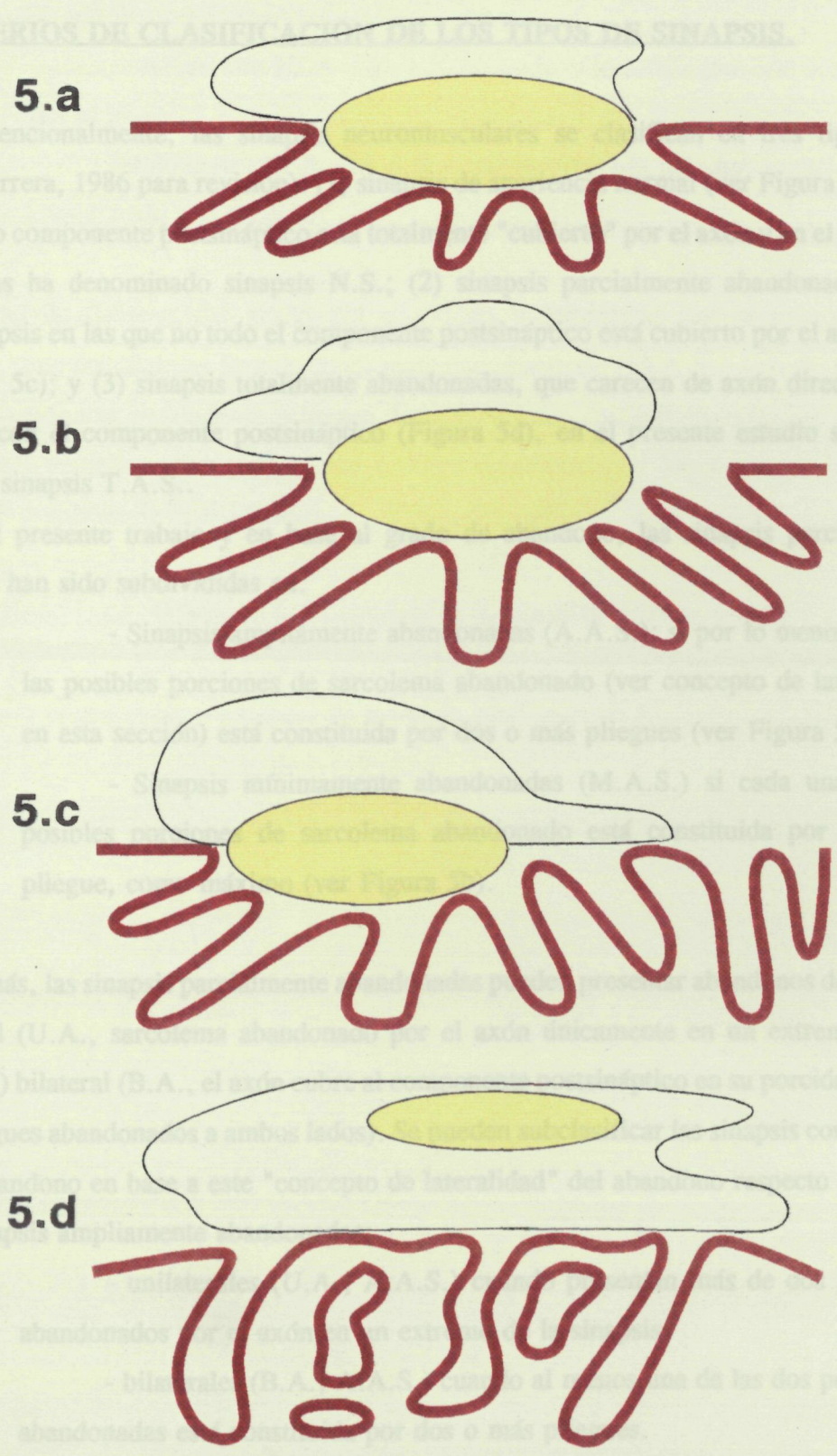
8. Número de vesículas *coated* en contacto "físico" y que tienen fusionada parte de su membrana vesicular con el sarcolema de los pliegues secundarios contenidos en una determinada porción del componente postsináptico (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (10X).

9. Número total de oberturas postsinápticas contenidas en un determinado sarcolema (subaxonal, subglial o totalmente abandonado). (10X).

10. Número de mitocondrias postsinápticas contenidas en todo el sarcoplasma sináptico. Se ha valorado como sarcoplasma sináptico al área situada entre la línea imaginaria que une los fondos de saco de los pliegues secundarios y los paquetes de miofibrillas musculares. (10X).

11. Número de lisosomas postsinápticos contenidas en todo el sarcoplasma sináptico. (10X).

Figura 5. Tipos de sinapsis considerados. Representación esquemática



5.a: sinapsis normal (N.S.). 5.b: sinapsis mínimamente abandonada (M.A.S.). 5.c: sinapsis ampliamente abandonada (A.A.S.). 5.d: sinapsis totalmente abandonada (T.A.S.).

V.6. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LOS TIPOS DE SINAPSIS.

Convencionalmente, las sinapsis neuromusculares se clasifican en tres tipos (ver Wernig y Herrera, 1986 para revisión): (1) sinapsis de apariencia normal (ver Figura 5a), son aquellas cuyo componente postsináptico está totalmente "cubierto" por el axón y en el presente trabajo se las ha denominado sinapsis N.S.; (2) sinapsis parcialmente abandonadas, son aquellas sinapsis en las que no todo el componente postsináptico está cubierto por el axón (ver Figuras 5b y 5c); y (3) sinapsis totalmente abandonadas, que carecen de axón directamente relacionado con el componente postsináptico (Figura 5d), en el presente estudio se las ha denominado sinapsis T.A.S..

En el presente trabajo y en base al grado de abandono, las sinapsis parcialmente abandonadas han sido subdivididas en:

- Sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.): si por lo menos una de las posibles porciones de sarcolema abandonado (ver concepto de lateralidad en esta sección) está constituida por dos o más pliegues (ver Figura 5c).
- Sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) si cada una de las posibles porciones de sarcolema abandonado está constituida por solo un pliegue, como máximo (ver Figura 5b).

Además, las sinapsis parcialmente abandonadas pueden presentar abandonos de forma: (1) unilateral (U.A., sarcolema abandonado por el axón únicamente en un extremo de la sinapsis) y (2) bilateral (B.A., el axón cubre al componente postsináptico en su porción central dejando pliegues abandonados a ambos lados). Se pueden subclassificar las sinapsis con amplio y mínimo abandono en base a este "concepto de lateralidad" del abandono respecto al axón:

- Sinapsis ampliamente abandonadas:
 - unilaterales (U.A.; A.A.S.) cuando presentan más de dos pliegues abandonados por el axón en un extremo de la sinapsis.
 - bilaterales (B.A.; A.A.S.) cuando al menos una de las dos porciones abandonadas está constituida por dos o más pliegues.

- Sinapsis mínimamente abandonadas:

- unilaterales (U.A.; M.A.S.) cuando sólo un pliegue está abandonado por el axón.
- bilaterales (B.A.; M.A.S.) cuando por cada lado hay un sólo pliegue abandonado por el axón.

Independientemente del grado del abandono y lateralidad del abandono, se ha considerado, para las distintas formas de sinapsis con abandono (M.A.S., A.A.S., T.A.S.), la presencia o ausencia de célula de Schwann (S.C. y NoS.C., respectivamente). Se considera como presencia de célula glial, cuando uno o varios lamelipodios o filopodios gliales cubren porciones del componente postsináptico.

Asimismo, se ha clasificado la morfología de las sinapsis mínima, amplia y totalmente abandonadas (M.A.S., A.A.S. y T.A.S. respectivamente) en base los conceptos de lateralidad del abandono y la presencia o ausencia de la célula glial comentados anteriormente (ver las Figuras 11, 12 y 13 en el capítulo de resultados).

V.7. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS

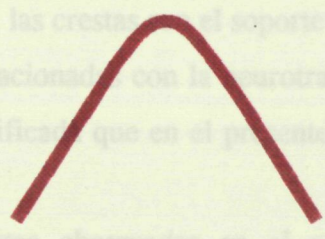
Figura 6: Morfología de las crestas postsinápticas. Representación esquemática.

Las crestas juegan un importante papel en la configuración del componente postsináptico. Están descritas de forma global ciertas características diferenciadas de estas crestas según estén en un músculo físico o tónico (Ogata y cols, 1963; Mascan y cols, 1976). Además, las crestas juegan el soporte estructural de ciertas densificaciones de membrana, íntimamente relacionadas con la neurotransmisión. Eventualmente estas membranas densificadas que en el presente trabajo se han denominado IV y V.

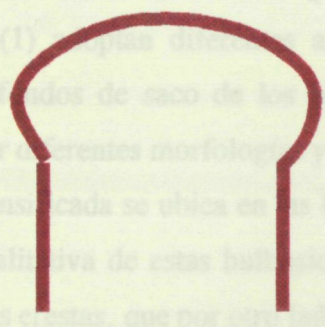
Las crestas observadas en el presente estudio presentan un amplio espectro de características: (1) con anchuras diferentes desde 20 micras hasta 100 micras que conforman los bordes de saco de los pliegues sinápticos; (2) que pueden presentar diferentes morfologías; (3) múltiples membranas densificadas que la membrana densificada se sitúa en la hendidura que se forma al hacer una clasificación cualitativa de estas hendiduras en 5 morfologías, correspondientes de las anchuras de las crestas, que por ser de la misma naturaleza se denominan por su anchura de las crestas: Tipo I y de este modo se han diferenciado las diferentes morfologías de las crestas postsinápticas observadas en el presente estudio:

- Tipo I, cuando la cresta tiene una morfología de "punta de flecha".
- Tipo II, cuando la cresta tiene una morfología de "saco de teatro".
- Tipo III, si la porción apical se sitúa en el interior del pliegue sináptico y la porción basal filiforme.
- Tipo IV, cuando la cresta tiene una morfología de "pala".
- Tipo V, cuando la cresta tiene una morfología de "rectángulo".

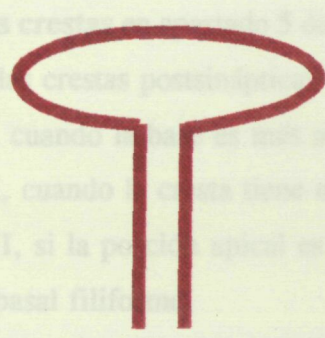
Es importante concretar que el presente estudio de las crestas puede tener diferentes grados de convexidad según de la morfología que se trate por lo que se ha buscado de esta forma se pueda establecer una gradación, de mayor a menor convexidad, de los diferentes tipos de crestas en: tipo I como las más convexas, seguidas de los tipos II, III y, como las más rectilíneas, tipo V.



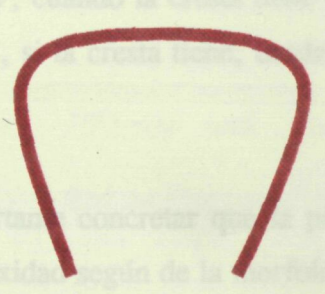
Tipo I



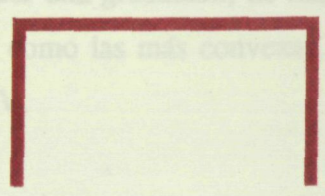
Tipo II



Tipo III



Tipo IV



Tipo V

V.7. CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS.

Las crestas juegan un importante papel en la configuración del componente postsináptico. Están descritas de forma global ciertas características diferenciales de estas crestas según estén en un músculo fásico o tónico (Ogata y cols, 1967; Ellisman y cols, 1976). Además, las crestas son el soporte estructural de ciertas densificaciones de membrana, íntimamente relacionadas con la neurotransmisión. Eventualmente pueden existir crestas sin membrana densificada que en el presente trabajo se han denominado N.D..

Las crestas observadas en el presente estudio presentan un amplio abanico de características: (1) adoptan diferentes amplitudes desde su porción superficial hasta que conforman los fondos de saco de los pliegues secundarios, (2) sus bulbosidades apicales pueden presentar diferentes morfologías y (3) múltiples combinaciones de 1 y 2. Debido a que la membrana densificada se ubica en las bulbosidades apicales de las crestas se ha hecho una clasificación cualitativa de estas bulbosidades en 5 morfologías, independientemente de las amplitudes de las crestas, que por otro lado se contemplan como parámetro morfométrico (ver **Amplitud de las crestas** en apartado 5 de este capítulo). Así, se han clasificado las diferentes morfologías de las crestas postsinápticas observadas en (Figura 6):

- Tipo I, cuando la base es más ancha que la porción apical.
- Tipo II, cuando la cresta tiene una morfología de "palillo de tambor".
- Tipo III, si la porción apical es más ancha en el sentido del pliegue primario y la porción basal filiforme.
- Tipo IV, cuando la cresta tiene una morfología de "pera" invertida.
- Tipo V, si la cresta tiene, desde la base a la porción apical, la misma anchura.

Es importante concretar que la porción apical de las crestas puede tener diferentes grados de convexidad según de la morfología que se trate (ver Figura 6). En función de esto se puede establecer una gradación, de mayor a menor convexidad, de los diferentes tipos de cresta en: tipo I como las más convexas, seguidas de los tipos II, III, IV y, como las más rectilíneas, tipo V.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

01409-17160

0103-91460

**CAMBIOS PLASTICOS DE ADAPTACION ULTRAESTRUCTURAL
DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLOGICO DE ACTIVIDAD.**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICAS BASICAS

UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD, REUS

T 18

MANEL SANTAFE I MARTINEZ

TESIS DOCTORAL

1993

VI. RESULTADOS.

*"If you look enough in the electron microscope, you can
find anything you wish".*

Katz B.

VI.1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS SINAPSIS

VI.1.1. TIPOS DE SINAPSIS NEUROMUSCULARES.

Tanto en condiciones experimentales como habitualmente en situaciones fisiológicas en músculos normales no tratados, las uniones mioneurales pueden adoptar diferentes morfologías, observables tanto con técnicas de microscopía óptica como electrónica. Estas diferentes morfologías constituyen evidencias estructurales de los fenómenos de la remodelación plástica de las conexiones neurales. Para estudiar los diferentes tipos de sinapsis neuromusculares del músculo *Extensor digitorum longus* (EDL) de rata adulta, en ambas series experimentales, se han seguido los criterios de clasificación que se detallan a continuación. Desde un punto de vista convencional, están descritos tres tipos de sinapsis: (1) sinapsis de apariencia normal (N.S.; ver figuras 5a y 7), en que el componente postsináptico está totalmente "cubierto" por el axón, (2) sinapsis parcialmente abandonadas, en las que una parte del componente postsináptico no está cubierta por el axón (ver figuras 5b, 5c, 8 y 9) y (3) sinapsis totalmente abandonadas, las que carecen de axón directamente relacionado con el componente postsináptico (T.A.S., figuras 5d y 10).

Además, en el presente trabajo se han estudiado las sinapsis parcialmente abandonadas según el grado del abandono (ver Material y Métodos, apartado V.6.). Se ha considerado que una sinapsis está ampliamente abandonada cuando existen más de dos pliegues abandonados por el axón (A.A.S.; ver figuras 5.c y 9). Las formas de abandono no son exclusivamente unilaterales (sarcolema abandonado por el axón únicamente en un extremo de la sinapsis) y

el abandono puede ser bilateral (el axón cubre al componente postsináptico en su porción central dejando pliegues abandonados a ambos lados, ver figuras 11 y 12). Así, se considera que una sinapsis presenta un amplio abandono unilateral (A.A.S.; U.A.) cuando presenta más de dos pliegues abandonados por el axón en un extremo de la sinapsis. Y en una sinapsis bilateralmente abandonada (B.A.) se considera que el abandono es amplio cuando presenta más de dos pliegues abandonados por lado (o en uno de los dos lados si en el otro extremo existe un solo pliegue abandonado). Por otra parte, se define una sinapsis mínimamente abandonada (M.A.S. figuras 5b y 8) de forma unilateral (U.A.) cuando sólo un pliegue secundario está abandonado por el axón, y de forma bilateral (B.A.) cuando por cada lado hay sólo un pliegue abandonado por el axón.

VI.1.1.1. SERIE CONTROL

En esta serie experimental han sido estudiados 24 músculos EDL procedentes de 12 ratas normales (Sprague-Dawley, macho) de 3 meses de edad, de los cuales han sido analizadas morfológicamente un total de 172 áreas sinápticas a nivel ultraestructural. En este músculo, siguiendo los criterios de clasificación que se acaban de describir, se han evidenciado diferentes tipos de sinapsis (ver Tabla II). Como se puede observar en los resultados de este análisis ultraestructural que se presentan en la Tabla II, casi dos tercios (64.71%) de todas las sinapsis de la serie control presentan alguna forma de abandono axonal. Las sinapsis de apariencia normal (N.S.), las formas de abandono mínimo (M.A.S.) y las de amplio abandono (A.A.S.) representan, cada una de ellas, aproximadamente un tercio de la población total de sinapsis control. Por otra parte, las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.) casi no tienen representación (3.76%; N=6) en la serie control. Sorprendentemente,

en otros estudios (ver por ejemplo en anfibios Diaz y Pecot-Dechavaissine, 1988; ver para revisión Wernig y Herrera, 1986) en los que se han utilizado técnicas combinadas para evidenciar simultáneamente el componente pre- y postsináptico a nivel estructural, la proporción de formas abandonadas detectada fue de un 10% del total de las sinapsis analizadas. En el presente trabajo el total de sinapsis que presentan diferentes grados de abandono es muy elevado por lo que cabe suponer que las sinapsis con mínimo grado de abandono axonal cuando son estudiadas a nivel óptico son indistinguibles de las normales y, por tanto, no son valoradas.

En este sentido, se han contabilizado también las sinapsis parcialmente abandonadas (A.A.S. y M.A.S.), según la presencia o ausencia de célula de Schwann (S.C. y No S.C, respectivamente). Se considera como presencia de célula de Schwann, cuando uno o varios filopodios o lamelipodios de la célula glial, ocupan porciones de componente postsináptico abandonadas por el axón, de manera que una parte del componente postsináptico está cubierta por estos procesos gliales. Atendiendo a este criterio, se ha podido evidenciar que las formas de mínimo abandono (M.A.S.) presentan habitualmente poca participación glial, solamente en un tercio de las sinapsis M.A.S. de la serie control (Tabla II). Por otro lado, las formas de amplio abandono con participación glial representan casi la mitad de la población de las sinapsis A.A.S. de la serie control. En términos generales, la presencia de procesos gliales sobre el sarcolema abandonado es más frecuente en las formas A.A.S. que en las formas M.A.S. en la serie control. La participación de la célula de Schwann en las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.) afecta a la mitad de las sinapsis (50%, N=3). La baja proporción de sinapsis T.A.S. (3.76%, que corresponde a una N de 6) observadas en la serie control es un hallazgo habitual en mamíferos adultos normales (ver por ejemplo Wigston, 1989; y ver también Wernig y Herrera, 1986 para revisión en otros modelos experimentales).

Como se ha comentado anteriormente, en las sinapsis parcialmente abandonadas el axón se puede situar respecto al componente postsináptico de dos maneras: (1) de forma unilateral (U.A., si el axón se sitúa en un extremo del componente postsináptico dejando el otro extremo abandonado) y, (2) de forma bilateral (B.A., cuando el axón se sitúa en una porción central del componente postsináptico, dejando los dos extremos abandonados). Según esta característica de lateralidad del abandono, puede establecerse que en el músculo EDL control las sinapsis M.A.S. están preferentemente abandonadas por el axón de una forma unilateral (70 %) mientras que en las sinapsis A.A.S. no se observan preferencias en cuanto a la lateralidad del abandono (50% con abandono unilateral y 50% bilateral).

Del análisis los resultados obtenidos de los diversos tipos de abandono axonal se puede deducir que la forma más frecuente de sinapsis M.A.S es la que presenta un sarcolema abandonado por el axón de forma unilateral y sin que la porción abandonada esté cubierta por procesos gliales, mientras que las sinapsis A.A.S. son menos específicas tanto en el sentido de la lateralidad del abandono (pueden presentar abandono axonal de forma uni- o bilateral) como por la participación glial en estas porciones abandonadas (pueden estar cubiertas o no por procesos de la célula de Schwann). Estas tendencias sugieren que las sinapsis con mínimo abandono, al pasar eventualmente, a un grado mayor de abandono podrían implicar a la célula glial.

Tabla II: Tipos de sinapsis.

Serie control:

N.S.	TIPO DE POSTSINAPTICO ABANDONADO		
35.29 ± 4.22	64.71 ± 2.75		
	M.A.S	A.A.S	T.A.S.
	27.64 ± 5.91	33.31 ± 2.01	3.76 ± 1.70
S.C.	34.00 ± 15.30	47.67 ± 16.94	50.0 ± 0.00
No S.C.	66.00 ± 15.30	52.33 ± 16.94	50.0 ± 0.00
U.A	69.01 ± 15.02	50.67 ± 5.20	
B.A	30.25 ± 15.02	49.33 ± 5.20	

Sinapsis estudiadas N=172.

Serie de incremento fisiológico de actividad (IFA):

N.S.	TIPO DE POSTSINAPTICO ABANDONADO		
29.51 ± 1.01	70.49 ± 4.45		
	M.A.S	A.A.S	T.A.S.
	18.42 ± 5.40*	41.90 ± 3.15	10.17 ± 0.30*
S.C.	36.01 ± 19.76	56.10 ± 11.53	62.50 ± 10.22
No S.C.	63.99 ± 19.76	43.90 ± 16.53	37.50 ± 10.22
U.A	86.86 ± 6.31*	44.63 ± 20.13	
B.A	14.14 ± 6.31*	55.37 ± 20.13	

Sinapsis estudiadas N= 216

Sinapsis Normales (N.S.). Sinapsis Mínimamente Abandonadas (M.A.S.).
 Sinapsis Ampliamente Abandonadas (A.A.S.). Sinapsis Totalmente Abandonadas (T.A.S.).
 Abandono Unilateral (U.A.). Abandono Bilateral (U.B.). Célula de Schwann Presente (S.C.), Ausente (NoS.C).
 Valores expresados en % ± Error Estándar.
 * P < 0.05, X², serie IFA vs serie control.

VI.1.1.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Una vez analizada la distribución de los diferentes tipos de sinapsis en los músculos de la serie control, en este apartado se compararán estos resultados con los observados en la serie de músculos entrenados. En esta serie experimental han sido estudiados 24 músculos EDL procedentes de 12 ratas (Sprague-Dawley, macho) que han seguido el protocolo de entrenamiento locomotor durante 28 días (ver capítulo de Material y Métodos, apartado V.3), de los cuales han sido analizadas morfológicamente un total de 216 áreas sinápticas a nivel ultraestructural.

Respecto a los valores observados en la serie control, el incremento de actividad fisiológica no modifica significativamente el % de sinapsis normales (N.S.) en los músculos estudiados, ni el % global de sinapsis que presentan alguna forma de abandono postsináptico (ver Tabla II). No obstante, en la serie de incremento fisiológico de actividad se observa, respecto a la serie control, una redistribución interna entre las diferentes formas de abandono (ver Tabla II): disminución significativa ($P < 0.05$, X^2) del porcentaje de las sinapsis M.A.S. (con incremento significativo de las formas unilateralmente abandonadas) y un incremento también significativo ($P < 0.05$, X^2) de las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.). Entre estas dos series (control en incremento de actividad) no se observan variaciones significativas ($P > 0.05$, X^2) del porcentaje de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.), así como tampoco se modifican los porcentajes de "lateralidad" de estas sinapsis A.A.S.. Y respecto a los valores observados en la serie control, con el incremento de actividad la participación de la célula glial no se modifica en ninguna de las situaciones de abandono axonal estudiadas (M.A.S., A.A.S., T.A.S.).

Posiblemente esta redistribución de los porcentajes de los tipos de sinapsis parcialmente abandonadas M.A.S. (disminución) y T.A.S. (aumento) inducida por el incremento de actividad locomotora, implica el paso hacia formas en que el abandono es más intenso a partir de las sinapsis que inicialmente presentan un abandono mínimo (M.A.S.) y, paralelamente, algunas sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) han pasado a engrosar la población de sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.) al perder su axón (ver capítulo de Discusión).

Figura 7: Sinapsis normal (N.S.). (10.000X).

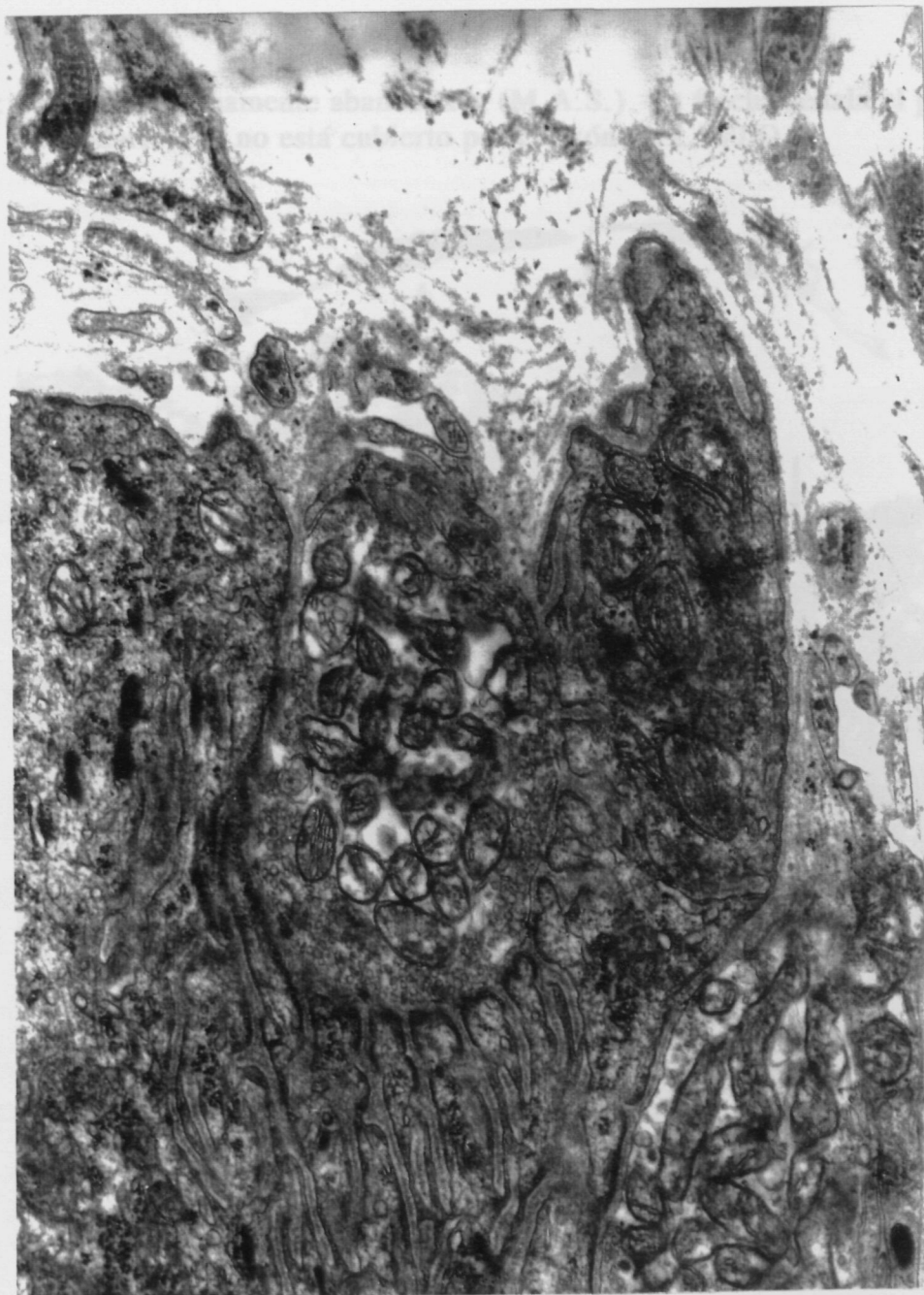


Figura 8: Sinapsis mínimamente abandonada (M.A.S.). La flecha señala el pliegue secundario que no está cubierto por el axón. (12.500X).

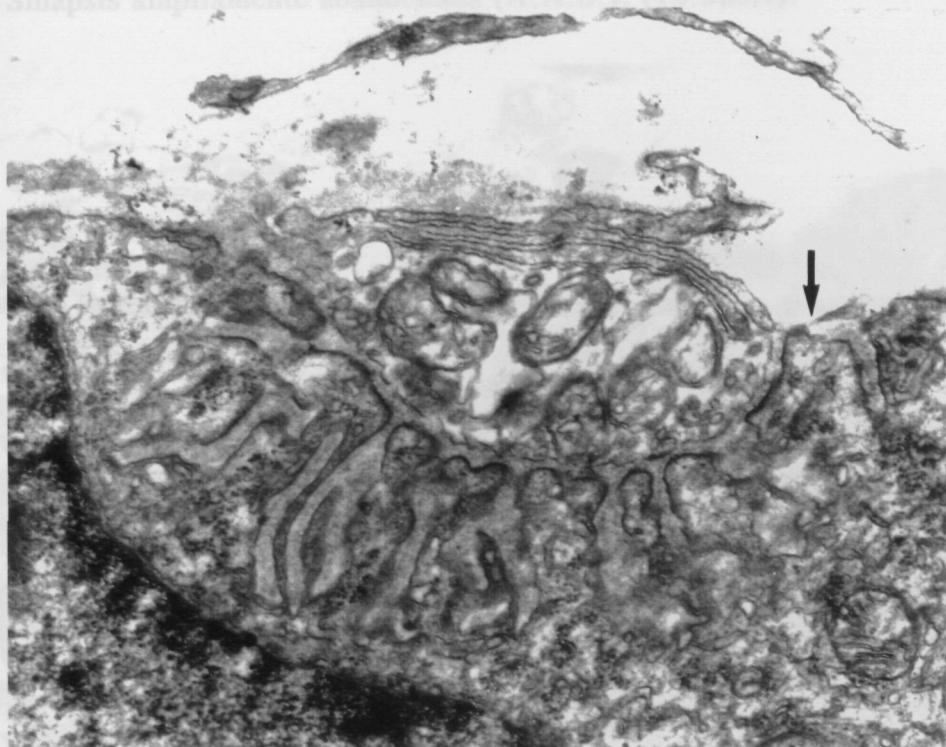


Figura 9: Sinapsis ampliamente abandonada (A.A.S.). (12.500X).

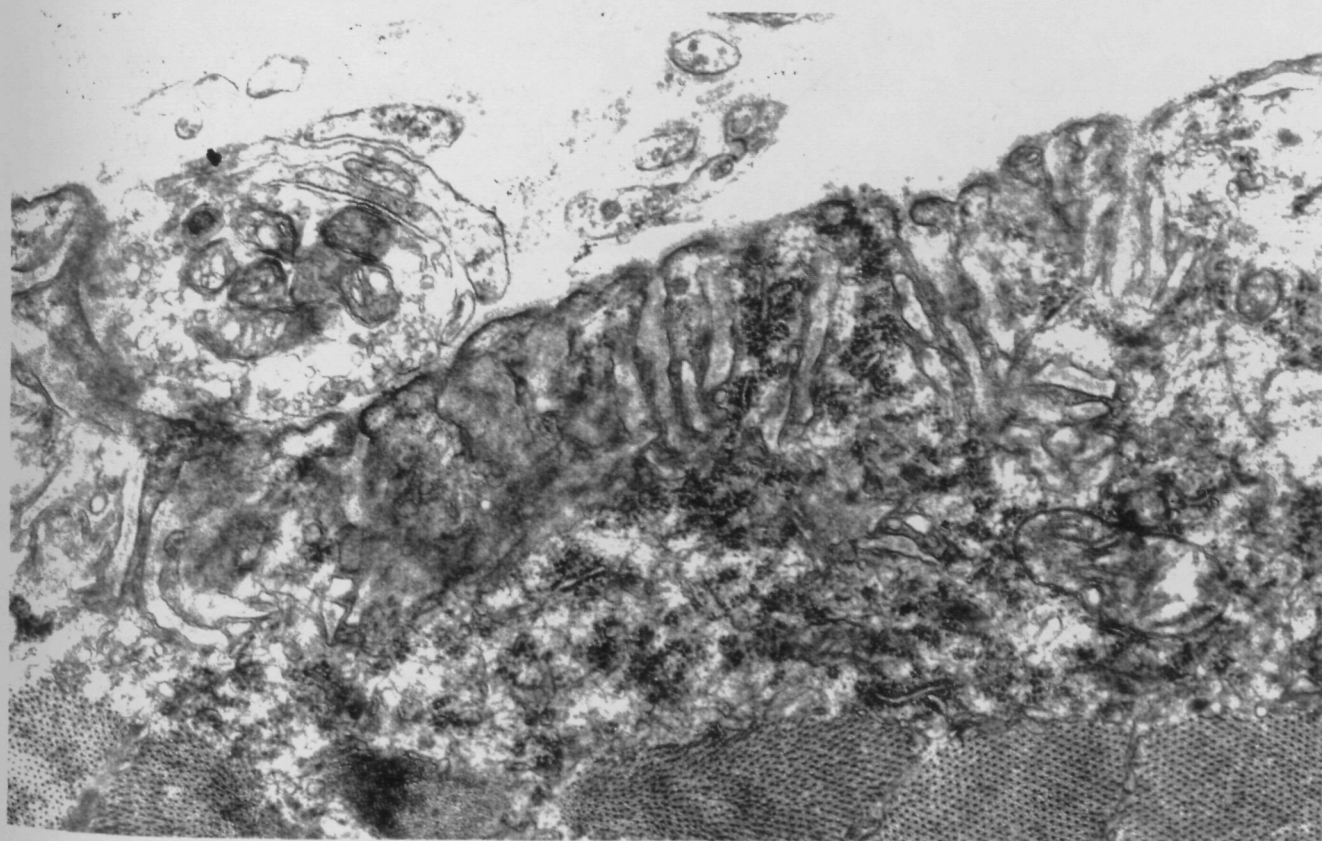


Figura 10: Sinapsis totalmente abandonada (T.A.S.). (10.000X).

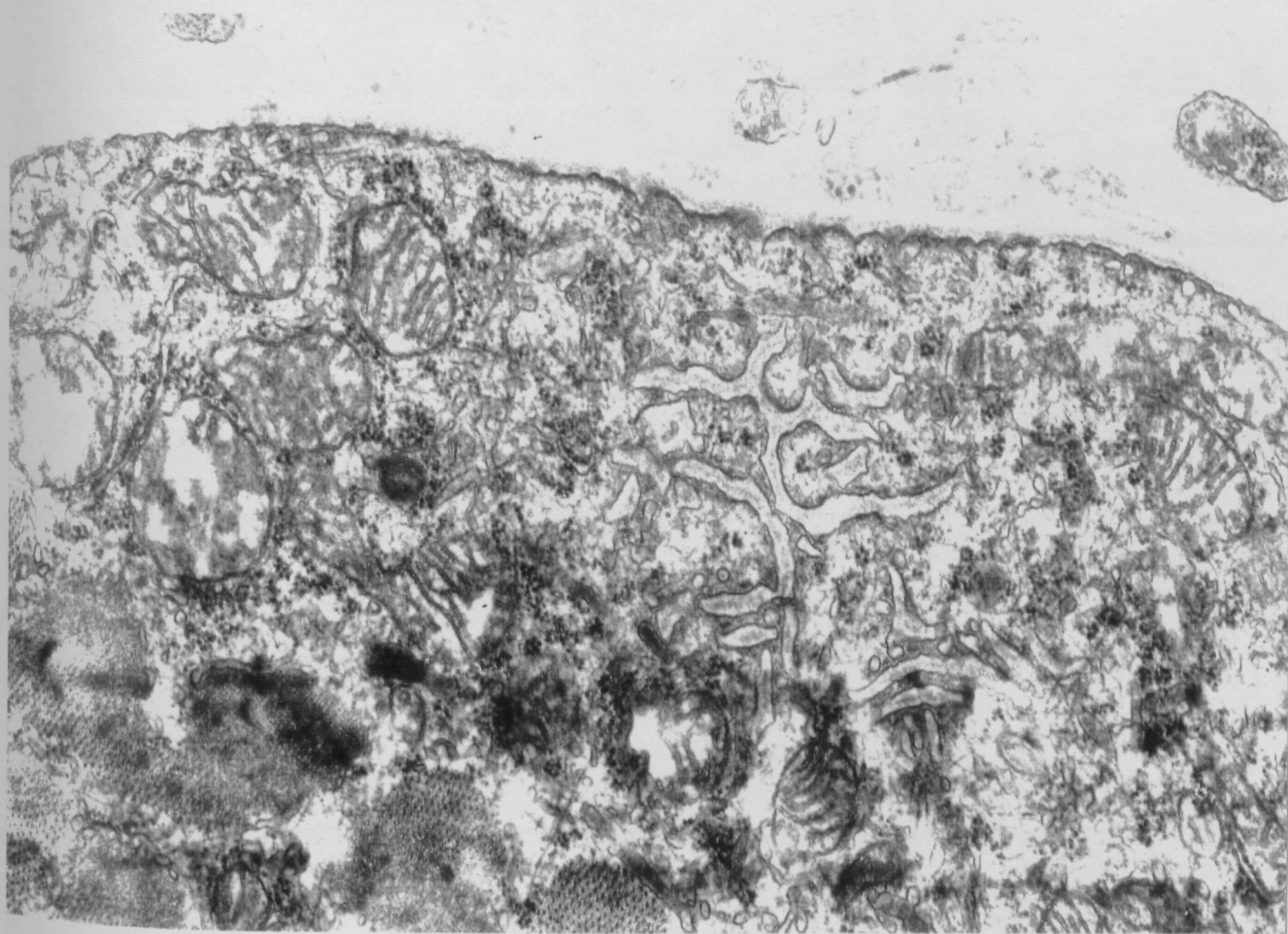


Figura 11: Morfología de las sinapsis M.A.S.

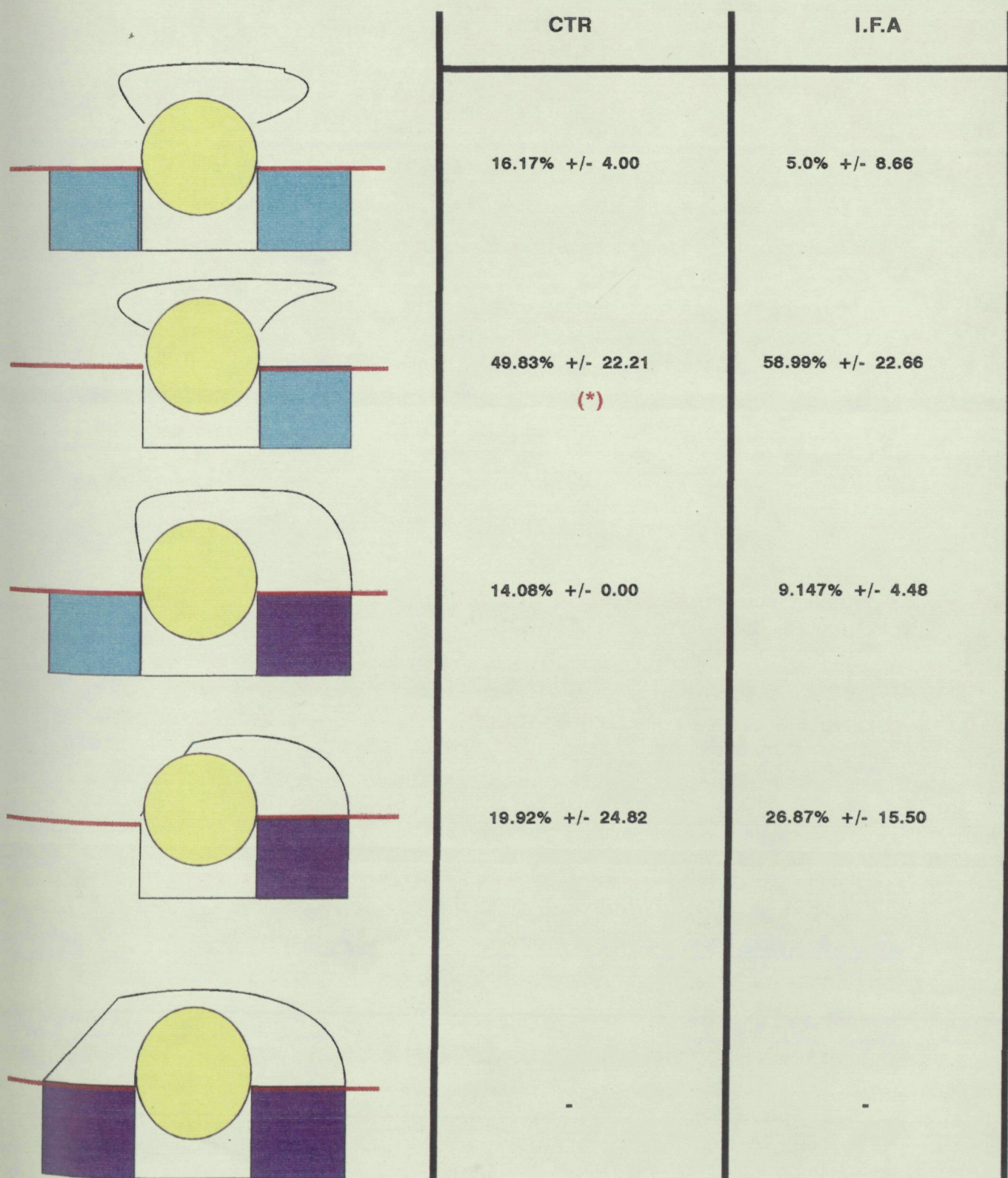


Figura 12: Morfología de las sinapsis A.A.S..

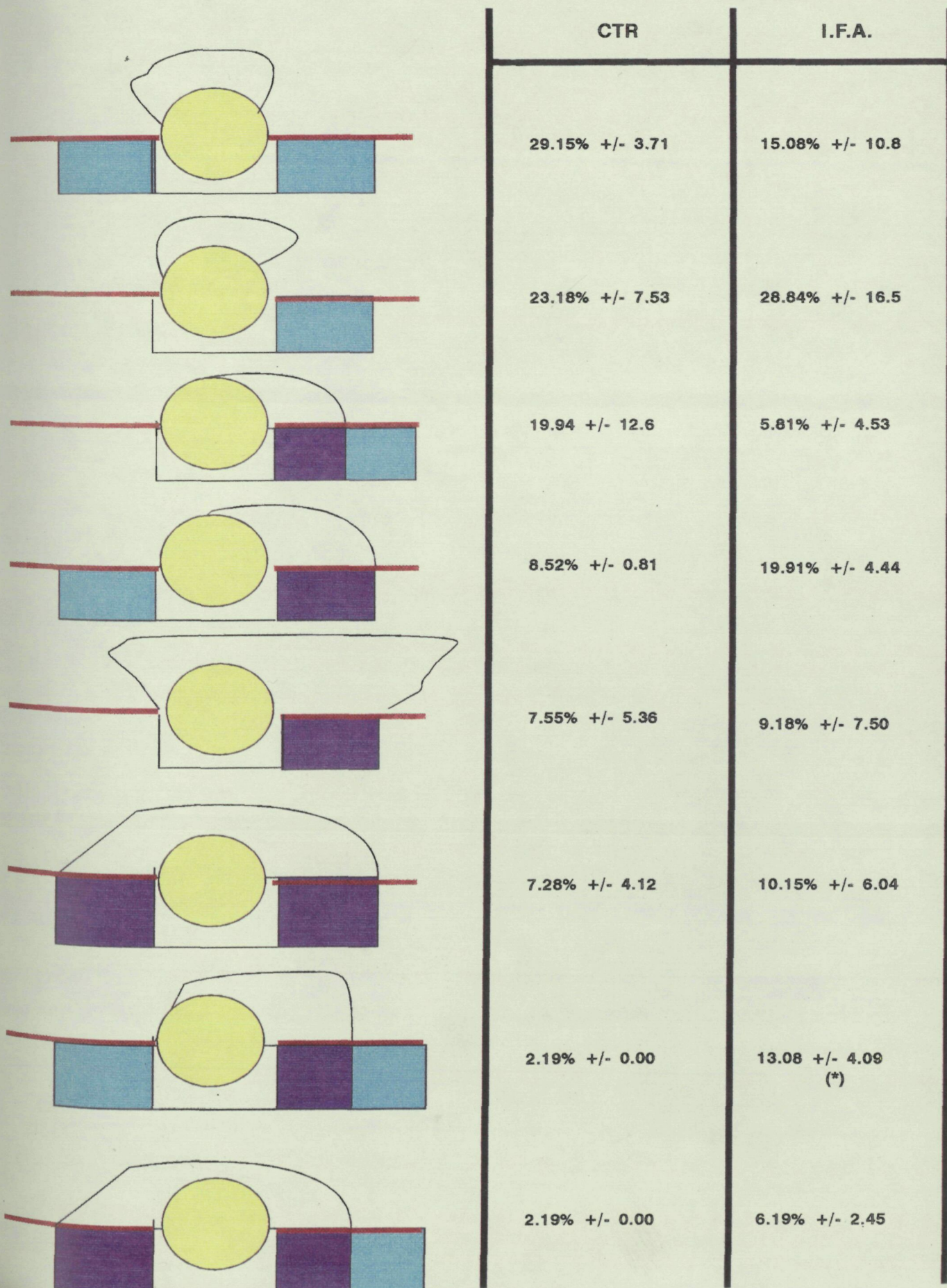
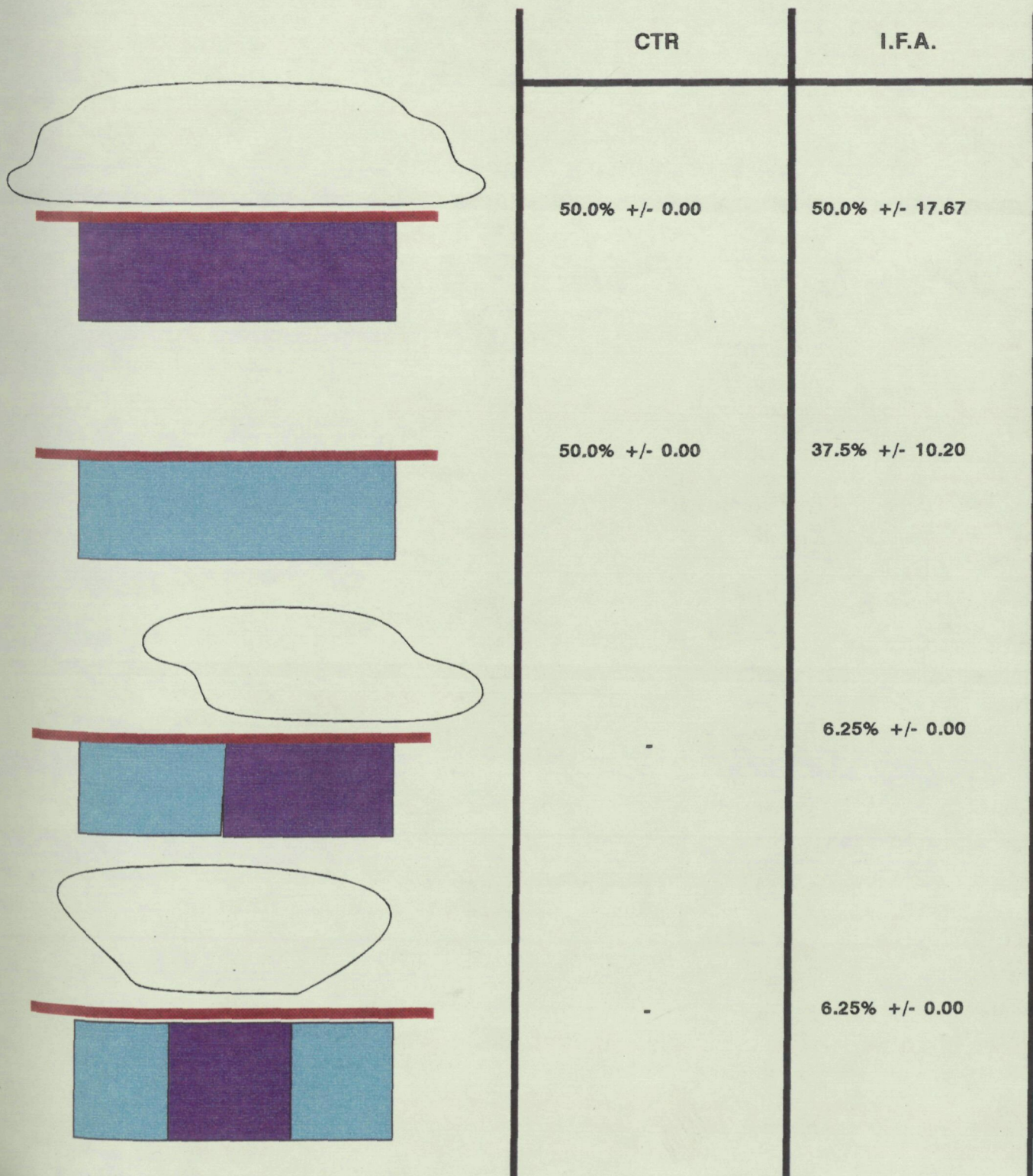


Figura 13: Morfología de las sinapsis T.A.S.



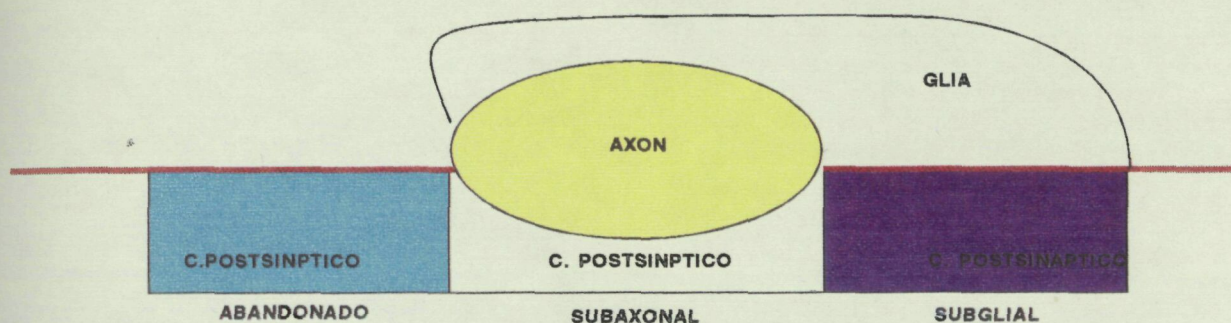


Figura 11: Morfología de las sinapsis M.A.S..

CTR: serie control; IFA: serie de incremento fisiológico de actividad.

Serie control, N= 50; Serie I.F.A., N= 43.

* $P < 0.05$, test X^2 , entre morfologías M.A.S. de la serie control y morfologías A.A.S. de la serie control.

No se observa ninguna diferencia significativa ($P > 0.05$, test X^2) entre la serie control y la serie de incremento fisiológico de actividad (I.F.A..)

Figura 12: Morfología de las sinapsis A.A.S.

CTR: serie control; IFA: serie de incremento fisiológico de actividad.

Serie control, N= 59; Serie I.F.A., N= 88.

* $P < 0.05$, test X^2 , entre la serie control y la serie incremento fisiológico de actividad (I.F.A.).

Figura 13: Morfología de las sinapsis T.A.S.

CTR: serie control; IFA: serie de incremento fisiológico de actividad.

Serie control, N= 6; Serie I.F.A., N= 22.

No se observa ninguna diferencia significativa ($P > 0.05$, test X^2) entre la serie control y la serie de incremento fisiológico de actividad (I.F.A..)

VI.1.2. MORFOLOGIA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE ABANDONO

El presente estudio ha permitido obtener suficientes datos y criterios estructurales para establecer una clasificación morfológica de las diferentes formas de abandono axonal.

VI.1.2.1. SERIE CONTROL.

La morfología predominante para las sinapsis M.A.S. en la serie control es la de abandono unilateral y sin participación glial (aproximadamente un 50%; Figura 11). El resto de morfologías (abandono unilateral cubierto por glía, bilateral sin participación glial y bilateral con participación glial en un solo lado) se distribuyen aproximadamente en una misma proporción, entre un 15% y un 20% (Figura 11). Las sinapsis mínimamente abandonadas sólo presentan cuatro, de las cinco morfologías posibles, ninguna sinapsis M.A.S. adopta la morfología de abandono bilateral y totalmente cubierto de glía (Figura 11).

A diferencia de lo que ocurre con las morfologías M.A.S, las formas de amplio abandono (A.A.S.) presentan todas las morfologías posibles, aunque sea en muy baja proporción (ver Figura 12). Las formas sin presencia glial (NoSc) se presentan en un 50% de toda la población de sinapsis A.A.S. Como se mostró en la Tabla II, desde esta perspectiva (figuras 11 y 12) también se observa que las formas de abandono bilateral son más frecuentes en las sinapsis A.A.S. (50%) que en las M.A.S. (30%). El hecho de que las sinapsis con amplio abandono adopten todas las morfologías posibles indica que tienen una mayor versatilidad que las sinapsis M.A.S.; aparecen formas A.A.S. mixtas como por ejemplo, bilaterales con un extremo parcialmente cubierto de glía, que no pueden existir en las sinapsis M.A.S..

No obstante, entre las morfologías M.A.S. y A.A.S. únicamente se observa una diferencia significativa: la forma unilateral sin glía es más frecuente en las sinapsis M.A.S. que en las sinapsis A.A.S. ($P < 0.05$, test X^2). El resto de tipos sólo apuntaría hacia una redistribución a favor de una mayor diversidad de las morfologías de las sinapsis A.A.S. sin observarse diferencias significativas ($P > 0.05$, X^2).

Cuando el axón no participa en la sinapsis de la serie control, es decir las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.), los procesos de la célula glial o bien cubren el componente postsináptico completamente (50%) o bien están completamente ausentes (50%). Cabe resaltar que las morfologías de las sinapsis T.A.S. no adoptan en ningún caso una morfología en la que los procesos de la célula glial cubran sólo una porción del componente postsináptico (ver Figura 13).

VI.1.2.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Del análisis morfológico de las diferentes formas de abandono axonal (M.A.S., A.A.S., T.A.S.) en la serie de incremento fisiológico de actividad ha sido posible evidenciar que el aumento fisiológico de actividad no provoca cambios substanciales respecto de los porcentajes observados en los músculos control (ver figuras 11, 12 y 13). Únicamente se observa un ligero y significativo ($P < 0.05$, test X^2) incremento de un tipo de morfología de sinapsis A.A.S., concretamente las que están bilateralmente abandonadas con participación parcial de la glía en uno de los dos lados (ver Figura 12).

VI.1.3. DISTRIBUCION DE LOS PLIEGUES ABANDONADOS EN LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS (A.A.S.).

Para completar la descripción general de las sinapsis del músculo EDL se han analizado el número y distribución de pliegues abandonados en las sinapsis ampliamente abandonadas.

VI.1.3.1. SERIE CONTROL.

La mayoría (un 80%) de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) del músculo EDL de la serie control poseen entre 2 y 5 pliegues secundarios abandonados (ver Tabla III y Figura 14). El porcentaje de sinapsis A.A.S. con más de 5 pliegues secundarios abandonados decrece de forma exponencial, siendo 11 el máximo número de pliegues abandonados observado, en un 1% de las sinapsis tipo A.A.S. de la serie control.

El estudio de la distribución, en cuanto a la lateralidad, de los pliegues abandonados muestra que, como se ha dicho anteriormente, en la serie control (Tabla IV.A y Figura 15.A) la mayoría de sinapsis A.A.S. presentan muy pocos pliegues abandonados (entre dos y cinco), estén estos uni- o bilateralmente situados en relación al axón. En las sinapsis A.A.S. con abandono bilateral solo uno de los dos lados presenta, como máximo, nueve pliegues abandonados mientras que el otro lado presenta, como máximo, dos. Se puede observar una progresiva disminución del % de sinapsis (eje de las ordenadas) conforme aumenta el número de pliegues abandonados (ejes X y Z; ver Figura 15.A). Existiendo una gradación de mayor a menor frecuencia de aparición (ver Tabla IV.A): la mayor proporción de sinapsis A.A.S. observadas son las unilateralmente abandonadas, seguidas en importancia, por las de abandono

bilateral de un pliegue en uno de los lados y, por último, abandono bilateral de dos pliegues en uno de los lados.

VI.1.3.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

En la serie de incremento fisiológico de actividad se observa que, al igual que en la serie control, la mayoría de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) presentan entre 2 y 5 pliegues secundarios abandonados (ver Tabla III y Figura 14). Al igual que en la serie control, estas sinapsis suman el 80% de la población total de sinapsis A.A.S.. Pero a pesar de estas analogías, en un 10% de la población total de sinapsis A.A.S. presenta 7 pliegues abandonados (Figura 14). Este "segundo pico" podría ser debido a un incremento del número de pliegues secundarios abandonados en algunas de las sinapsis A.A.S. preexistentes, inducido por el mayor nivel de actividad aplicado en esta serie. No obstante, estas diferencias entre la serie control y la serie de incremento fisiológico de actividad (ver Tabla III) no son significativas ($P > 0.05$, X^2).

Cabe resaltar que en la serie de incremento fisiológico de actividad no hay sinapsis con más de nueve pliegues abandonados, esto sugiere que a partir de este grado de abandono el axón podría retraerse definitivamente dejando todos los pliegues secundarios abandonados (sinapsis T.A.S.).

Tanto en la serie control como en la de incremento de actividad, la distribución de los pliegues abandonados tiene, aparentemente, las mismas posibilidades de ser uni- o bilateral (el 49,33% de sinapsis A.A.S. son B.A. en la serie control y en la serie actividad lo son el

55.37%, ver Tabla II). En cualquier caso y a la luz de los resultados obtenidos en la Tabla III, lo que se altera es la cantidad de pliegues abandonados que presentan las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) en ambas series.

En la serie de incremento fisiológico de actividad (IFA), la tendencia al decremento progresivo de los valores (% de sinapsis) conforme aumenta el número de pliegues abandonados (Tabla IV.B, Figura 15.B) no es tan marcada como la descrita para la serie control. En la serie de incremento de actividad locomotora (IFA), la disminución más marcada del % de sinapsis no es hasta los 5 pliegues abandonados. La distribución de los pliegues abandonados en las formas de abandono bilateral, uno de los dos lados presenta siete pliegues abandonados, como máximo (en la serie control el máximo es de nueve), mientras que el otro lado presenta, como máximo, cuatro (el doble que en la serie control). En general, las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) de la serie de incremento fisiológico de actividad (IFA) tienden a estar abandonadas de forma más simétrica que las de la serie control, lo cual no afecta a la naturaleza del abandono (bilateral o unilateral). No obstante, las diferencias entre la serie control y la serie de incremento fisiológico de actividad no son significativas ($P > 0.05$, X^2).

Tabla III: % del número total de pliegues abandonados en las sinapsis A.A.S.

NUMERO DE PLIEGUES	SERIE CONTROL	SERIE IFA
3	22.77 ± 15.14	27.52 ± 6.17
4	19.90 ± 3.19	20.67 ± 4.63
5	19.12 ± 10.57	15.32 ± 10.65
6	6.83 ± 8.72	5.79 ± 6.07
7	3.13 ± 2.84	10.34 ± 6.51
8	2.56 ± 4.46	2.76 ± 2.64
9	1.85 ± 3.30	3.06 ± 3.03
10	1.28 ± 2.21	-
11	1.28 ± 2.21	-

Expresado en % ± Error Estándar.

Número total de pliegues abandonados valorados: 235 en serie control y 418 en la serie de incremento fisiológico de actividad (IFA). Número de sinapsis estudiadas: 57 en la serie control y 88 en la serie IFA. No se observan diferencias significativas ($P > 0.05$, test X^2) entre las dos series.

Figura 14: Representación gráfica de la tabla III.

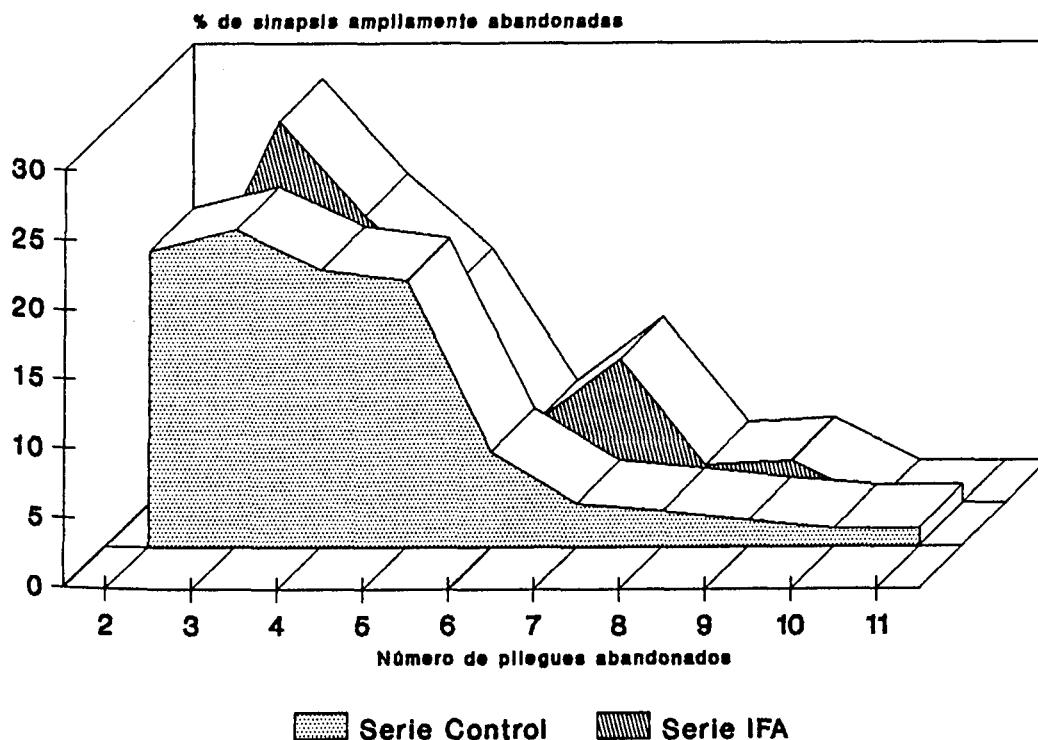


Tabla IV: Distribución de los pliegues según lateralidad. Sinapsis A.A.S..

IV.A- Serie control:

N°	0	1	2	3
2	21.59 ± 8.23	13.03 ± 10.63	5.18 ± 4.01	-
3	9.60 ± 1.20	9.60 ± 1.20	6.99 ± 5.70	-
4	5.12 ± 7.88	6.07 ± 4.69	1.28 ± 1.21	-
5	5.89 ± 4.23	1.85 ± 2.20	-	-
6	3.70 ± 5.42	3.13 ± 1.84	-	-
7	-	1.28 ± 1.21	-	-
8	1.28 ± 1.21	1.85 ± 2.20	-	-
9	-	-	1.28 ± 1.21	-
10	1.28 ± 1.21	-	-	-

*: N = número de pliegues secundarios abandonados
 Expresado en % ± Error Estándar.
 235 pliegues valorados de 57 sinapsis A.A.S..

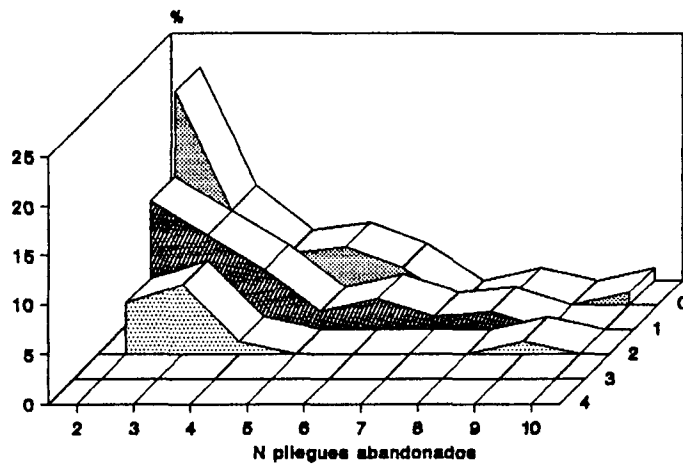
IV.B-Serie de incremento fisiológico de actividad (IFA).

N°	0	1	2	3	4
2	14.59 ± 3.95	14.93 ± 10.20	6.12 ± 5.06	-	-
3	13.57 ± 8.74	4.07 ± 3.61	11.48 ± 3.78	3.77 ± 2.29	-
4	10.47 ± 7.07	-	1.01 ± 1.36	4.82 ± 1.01	-
5	3.83 ± 2.35	-	2.76 ± 1.64	-	1.04 ± 1.02
6	1.01 ± 1.36	1.01 ± 1.36	-	-	-
7	1.75 ± 2.03	1.75 ± 2.03	2.02 ± 2.49	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-

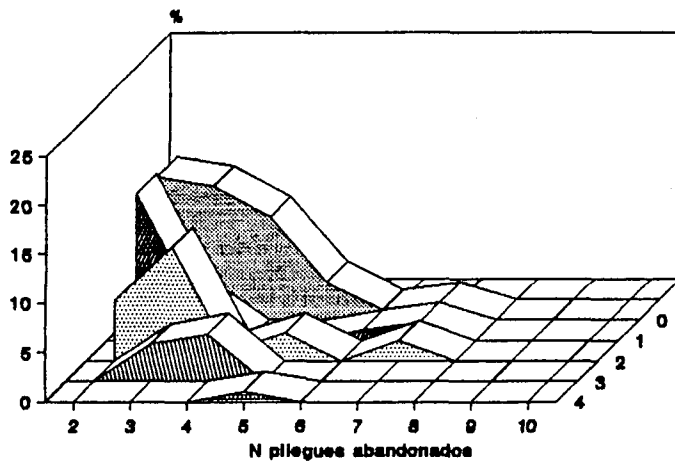
*: N = número de pliegues secundarios abandonados.
 Expresado en % ± Error Estándar.
 418 pliegues valorados de 88 sinapsis A.A.S..

Figura 15: Representación gráfica de la tabla IV.

15.A: Representación gráfica de la tabla IV.A.



15.B: Representación gráfica de la tabla IV.B.



VI.2. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CRESTAS.

Parece importante el estudio de la morfología de las crestas ya que son el soporte estructural de la membrana densificada, elemento importante en la neurotransmisión, y que como se expondrá posteriormente, presentan una gran variabilidad en las diferentes situaciones estudiadas. Este estudio se ha limitado a las sinapsis normales (N.S.) y ampliamente abandonadas (A.A.S.) por presentar sarcolemas cualitativamente diferentes: las sinapsis N.S. presentan un sarcolema con el grado máximo de normalidad esperable en un adulto normal, mientras que el grado máximo de abandono, con las tres porciones de sarcolema presentes, están representadas por las sinapsis A.A.S..

Se han clasificado las diferentes morfologías de las crestas postsinápticas (ver capítulo de Material y Métodos y Figura 6) en cinco tipos: tipo I, cuando la base de la cresta es más ancha que la porción apical; tipo II, cuando la cresta tiene una morfología de "palillo de tambor"; tipo III, cuando la porción apical es más ancha (en el sentido del pliegue primario) y la porción basal es filiforme; tipo IV cuando la cresta tiene una morfología piriforme; y, por último, tipo V si la cresta tiene, desde la base a la porción apical, la misma anchura. Cada una de estas morfologías puede presentar crestas con o sin membrana densificada. Es importante, además, concretar que la porción apical de las crestas puede tener diferentes grados de convexidad según de la morfología que se trate. En función de esta característica es posible establecer un criterio de gradación, de mayor a menor convexidad, de los diferentes tipos de cresta en: tipo I como la más convexa, seguida de los tipos II, III, IV y, como la más rectilínea, el tipo V.

Tabla V: Morfología de las crestas.

Serie control:

TIPO CRESTA	N.S.		A.A.S.					
	SUBAXONAL		SUBAXONAL		SUBGLIAL		ABANDONADO	
	TOTAL	ND	TOTAL	ND	TOTAL	ND	TOTAL	ND
I	4.8 ± 0.9	23.4 ± 0.2	4.1 ± 2.1	16.0 ± 0.2	-	-	9.2 ± 6.5	24.7 ± 1.2
II	22.0 ± 1.3	7.9 ± 0.4	30.9 ± 15.2	6.0 ± 1.2	51.4* ± 24.9	13.1 ± 1.6	30.9 ± 15.0	18.2* ± 2.6
III	24.2 ± 2.6	7.4 ± 0.0	26.0* ± 9.8	3.6 ± 0.0	5.9* ± 1.4	-	1.9* ± 0.0	-
IV	30.3 ± 1.2	4.6 ± 0.3	20.9* ± 6.7	3.0 ± 0.2	13.2* ± 9.5	-	20.2 ± 7.3	15.7* ± 0.8
V	20.8 ± 2.0	3.6 ± 0.3	19.7 ± 3.4	3.2 ± 0.2	38.7 ± 15.7	22.5 ± 0.3	46.5* ± 10.1	24.3* ± 5.3

N= 57 sinapsis NS, 627 crestas tipificadas. N= 59 sinapsis AAS, 472 crestas cubiertas por el axón, 177 por la glía y 236 crestas sin oposición; Total de crestas A.A.S. estudiadas 885.

Expresado en media ± S.E. * P < 0.005, (test X²), respecto a las sinapsis normales.

Serie de incremento fisiológico de actividad (IFA):

TIPO CRESTA	N.S.		A.A.S.					
	SUBAXONAL		SUBAXONAL		SUBGLIAL		ABANDONADO	
	TOTAL	ND	TOTAL	ND	TOTAL	ND	TOTAL	ND
I	0.7** ± 0.5	-	-	-	-	-	-	-
II	18.3 ± 2.8	1.3 ± 1.8	18.5 ± 5.8	19.0 ± 18.7	34.4 ± 8.2	39.3 ± 10.5	27.1 ± 11.6	40.3 ± 7.1
III	32.8* ± 5.3	0.9 ± 1.2	30.8 ± 5.3	-	13.7 ± 3.8	16.6 ± 23.5	5.6** ± 2.0	16.6 ± 23.5
IV	35.6 ± 6.0	3.5 ± 3.8	43.3* ± 3.0	4.5 ± 2.4	43.8* ± 15.2	25.4 ± 8.1	37.7** ± 7.0	21.9 ± 10.6
V	12.6** ± 1.2	10.5** ± 2.7	7.5* ± 2.4	10.0 ± 8.1	8.1* ± 6.5	23.3 ± 20.5	29.6* ± 20.2	26.2 ± 21.5

N= 63 sinapsis NS, 345 crestas tipificadas. N= 88 sinapsis AAS, 672 crestas cubiertas por el axón, 134 por la glía y 247 crestas sin oposición; Total de crestas A.A.S. estudiadas 1053.

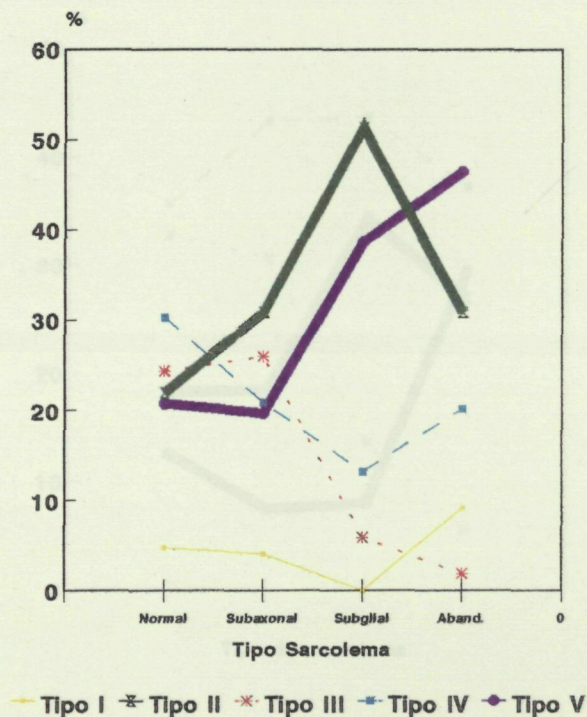
Expresado en media ± S.E. * P < 0.05, ** P < 0.005 (test X²), respecto a la serie control.

Sinapsis Normales (NS). Sinapsis Ampliamente Abandonada (A.A.S.), con sus 3 tipos de sarcolema. TOTAL es el % del número total de crestas. ND es el % de crestas no densificadas en cada tipo de cresta.

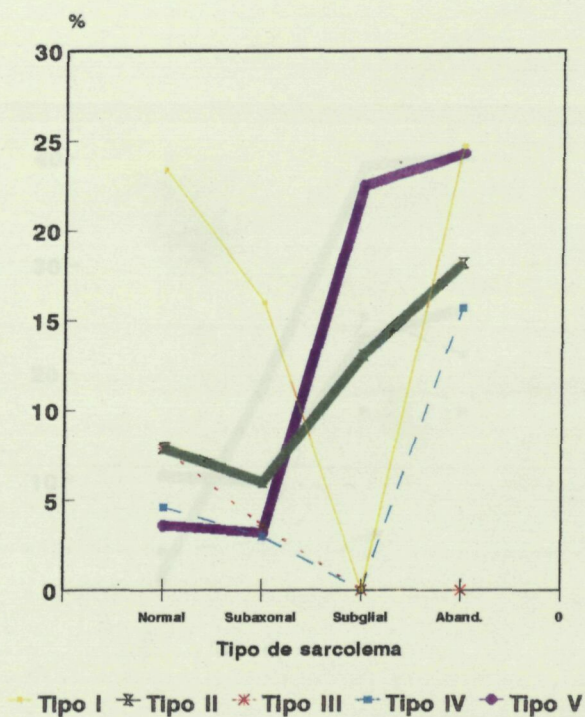
Figura 16: Morfología de las crestas. Representación gráfica de la tabla V.

Serie de control.

Proporción de morfologías

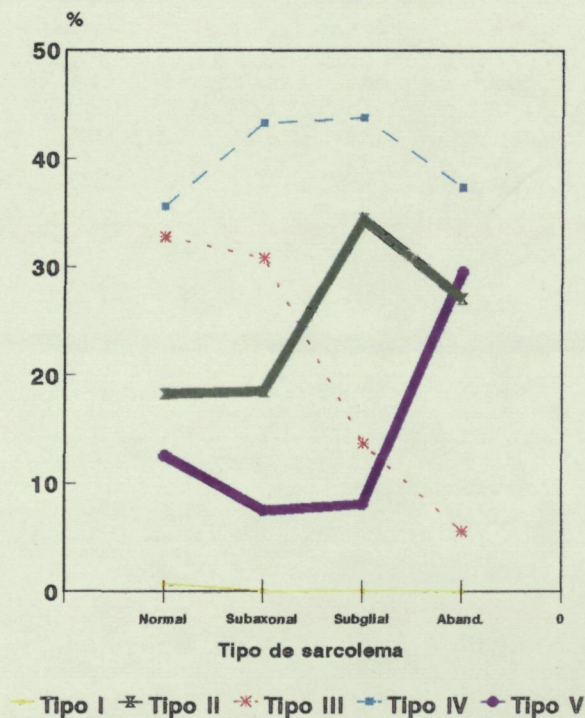


Crestas no densificadas.

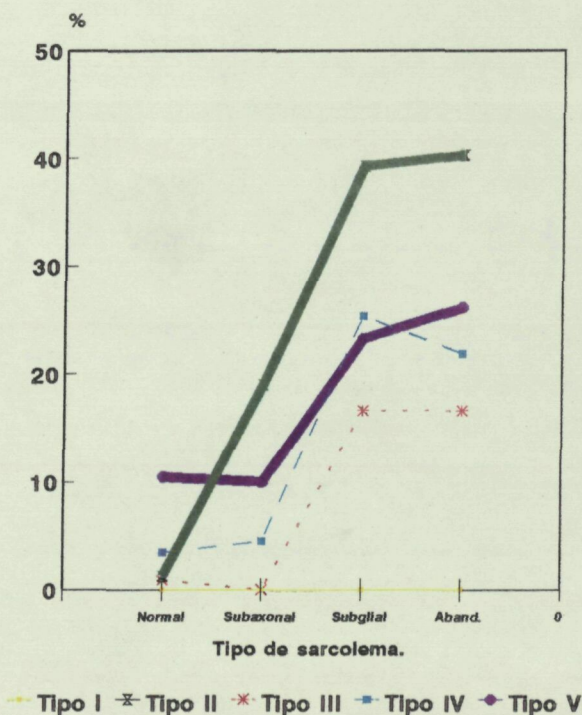


**Figura 17: Morfología de las crestas. representación gráfica de la tabla V.
 Serie de incremento fisiológico de actividad (IFA).**

Proporción de morfologías.



Crestas no densificadas.



VI.2.1. SERIE CONTROL.

En el componente postsináptico de las sinapsis normales (N.S.) de la serie control, la proporción de crestas observadas se distribuye por igual (entre un 20 y un 30%) entre todos los tipos descritos, aunque las del tipo I están en menor proporción (5%), y las crestas del tipo IV predominan ligeramente en el postsináptico normal (ver Tabla V y Figura 16). En cuanto al grado de densificación de las crestas subaxonales en las sinapsis normales, el tipo de crestas de menor participación (tipo I) son las que presentan un mayor porcentaje de no densificación (casi un 25%), mientras que el resto de tipos de crestas nunca superan el 8% de no densificación (Tabla V). Se puede deducir que para obtener un 92% en el parámetro **% de crestas densificadas** en el componente postsináptico de las sinapsis normales (expresado en Tabla VII), todos los tipos de crestas contribuyen de una forma proporcional, excepto el tipo I. Así pues, en las sinapsis normales, no parece haber una relación directa entre morfología de las crestas y la densificación de la membrana asociada.

En el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S., la morfología del tipo II predomina ligeramente sobre el resto de morfologías (ver Tabla V y Figura 16). Respecto a las sinapsis normales, únicamente se detecta un incremento significativo para la morfología del tipo III y un importante decremento para las crestas del tipo IV ($P < 0.005$ en ambos casos. Tabla V). Las proporciones de crestas no densificadas (ND) no varía significativamente pero sí se observa una ligera redistribución de sus valores, que es responsable del incremento significativo en el parámetro **% de crestas densificadas** (expresados en la Tabla IX) en el sarcolema subaxonal de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.).

En la porción del sarcolema subglial de la sinapsis A.A.S. (cubierto por glía), también predomina la morfología del tipo II (ver Tabla V y Figura 16). Así mismo, aumentan de forma significativa los tipos II y V respecto de las sinapsis normales ($P < 0.005$, X^2 , en ambos casos). Por el contrario, respecto a las sinapsis normales, las formas III y IV disminuyen significativamente ($P < 0.005$, X^2), y las del tipo I desaparecen (ver Tabla V y Figura 16). Del bajo valor del parámetro **% de crestas densificadas** observado en el sarcolema subglial en las sinapsis A.A.S. (58%, Tabla IX) son responsables los tipos II y V, ya que las formas restantes tienen todas las crestas densificadas (ND).

En el sarcolema totalmente abandonado de las sinapsis A.A.S. la morfología de las crestas predominante es la V (ver Tabla V y Figura 16). Y sólo disminuyen significativamente las formas III y V respecto a las sinapsis normales ($P < 0.005$, X^2 , en ambos casos). El resto de tipos de morfología crestal adoptan aproximadamente los mismos valores que en el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S.. Contribuyen de forma significativa al decremento del parámetro **% crestas densificadas** en el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. abandonado las formas V, II y IV (ver Tabla IX).

En cuanto a las crestas sin densificar (Tabla V, y Figura 16), las crestas del tipo III sólo presentan morfologías sin densificar en situación subaxonal (tanto en el componente postsináptico de las sinapsis normales como en la porción subaxonal del componente postsináptico de las sinapsis A.A.S.). En todos los casos en los que el axón cubre una porción de sarcolema (tanto de las sinapsis normales como de las sinapsis A.A.S.), la distribución de formas no densificadas es similar ($P > 0.05$). Sin embargo, en condiciones de abandono axonal (bajo la glía o totalmente abandonadas), únicamente las morfologías tipo II y V, siem-

pre contienen una determinada proporción de estas crestas sin densificar. Pese a todo, sólo se observan diferencias significativas, en cuanto a los tipos de cresta no densificada, en la porción del sarcolema que está totalmente abandonado (ver Tabla V).

Resumiendo estos resultados, en las sinapsis A.A.S. se observa que las crestas de tipo III disminuyen progresivamente en función del grado de abandono (Figura 16). Parece que la morfología más característica bajo el axón sea la del tipo III, mientras que la morfología tipo II parece ser la más representativa del componente postsináptico opuesto a glía y la morfología tipo V sea la más frecuentemente observada en condiciones de máximo abandono. El tipo I contribuye de forma anodina a una distribución final de morfologías de las crestas en todos los sarcolemas estudiados. Respecto a la morfología del tipo IV, pese a que no es el tipo de cresta que se pueda considerar como propio del sarcolema subaxonal (por ejemplo, en el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. representa un mismo % que bajo el axón de estas misma sinapsis) este tipo predomina ligeramente en las sinapsis normales y tiene también una importante presencia (20%) en situación subaxonal de las sinapsis A.A.S..

VI.2.1. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

En las condiciones experimentales de incremento de actividad locomotora desarrollada en el presente trabajo el comportamiento de la morfología de las crestas sigue una tendencia de adaptación plástica que muestra un determinado grado de coherencia con los resultados obtenidos en el estudio de la morfología crestal en la serie control.

La Tabla V (ver también la Figura 17) indica que en las sinapsis normales de la serie de incremento de actividad aumenta notablemente el % de crestas de los tipos III y IV (el tipo III de forma significativa, $P < 0.005$) disminuyendo, por otra parte, el porcentaje de crestas del tipo V ($P < 0.05$) que en el estudio de la serie control se mostraba como el más frecuentemente observado en las porciones de sarcolemas abandonados (sinapsis A.A.S.).

Por otra parte el % de crestas con morfología del tipo II no se afecta significativamente con el incremento de actividad, en ninguno de los componentes postsinápticos estudiados en este apartado (sinapsis normales y A.A.S.).

En las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad, es interesante observar que, con respecto a la serie control, en el sarcolema subaxonal se incrementan también las morfologías de crestas de los tipos II y IV (el tipo IV lo hace de forma significativa, $P < 0.005$), concomitantemente se observa una disminución, también en este caso de forma significativa, del tipo V (ver Tabla V).

En cuanto a la presencia de membrana densificada de las crestas, se observa que el incremento de actividad no afecta al grado de densificación que presentan las diferentes morfologías de crestas (ver figuras 16 y 17), excepto en el sarcolema subaxonal de las sinapsis normales en que hay un incremento ($P < 0.05$) de crestas sin densificar para la morfología del tipo V. Estos datos son coherentes con la escasa variación del parámetro **% de crestas densificadas** que se ha observado entre la serie control y de incremento de actividad para casi todas las sinapsis consideradas (normales, sinapsis A.A.S. y M.A.S; ver tablas XI, XIV y XVIII).

VI.3. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS NORMALES (N.S.).

En el presente trabajo se ha tomado como referencia las sinapsis de aspecto normal (N.S) para el estudio de la población de sinapsis de la serie control. Como se comentó en el capítulo de Material y Métodos, para estudiar las posibles variaciones inducidas por el incremento de actividad fisiológica sobre los diferentes tipos de sinapsis consideradas (N.S., A.A.S., M.A.S., T.A.S.) se ha comparado cada tipo de sinapsis observada en la serie control respecto a su homóloga observada en la serie actividad. Así, para el estudio de las sinapsis A.A.S., M.A.S. y T.A.S. se considerarán dos grandes subapartados, uno para el estudio de estos tipos de sinapsis en la serie control y otro para observar las posibles variaciones inducidas por el incremento de actividad locomotora. Según este razonamiento, el estudio de las sinapsis normales (N.S.) se limita a detectar posibles variaciones inducidas por el incremento experimental de actividad locomotora.

Tabla VI: Componente presináptico. Sinapsis normales. Serie IFA.

C. PRESINAPTICO SINAPSIS NORMALES	AXON CTR	AXON IFA	COMP.
Area (μm^2)	3.18 ± 2.15	2.91 ± 2.84 8.49%↓	U 0.056
Perímetro (μm)	7.64 ± 3.34	6.70 ± 3.60 11.84%↓	U 0.029
% de axolema sináptico	58.47 ± 11.37	55.88 ± 13.75 4.43%↓	U 0.399
% de axolema glial	36.83 ± 8.85	35.34 ± 10.93 4.43%↓	U 0.427
% de axolema libre	7.18 ± 6.49	11.57 ± 11.63 61.14%↑	U 0.065
Ratio área pre- / área postsináptica	2.23 ± 1.81	2.96 ± 2.91 32.73%↑	U 0.157
Ratio perímetro / área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	2.84 ± 0.99	3.52 ± 2.03 23.94%↑	U 0.084
Número de V.S. / μm^2	44.45 ± 28.30	45.93 ± 28.24 3.33%↑	T 0.774
Diámetro V.S. (nm)	45.99 ± 4.79	48.10 ± 5.16 14.58%↑	T 0.021
% axoplasma ocupado por V.S.	2.48 ± 1.76	2.70 ± 1.66 8.87%↑	U 0.385
Número de V.S. por μm de axolema sináptico	2.12 ± 0.86	3.18 ± 2.04 50.00%↑	U 0.003
Número de vesículas coated / μm^2	2.66 ± 2.57	2.92 ± 2.87 9.77%↑	U 0.308
Número de vesículas core / μm^2	2.21 ± 1.51	2.90 ± 2.12 31.22%↑	T 0.056
Número de lisosomas / μm^2	2.25 ± 1.56	2.37 ± 1.66 5.33%↑	T 0.701
% de axoplasma ocupado por mitocondrias	12.14 ± 7.52	20.70 ± 11.43 70.51%↑	T 0.000
Número de cisternas del R.E.L. / μm^2	1.45 ± 0.93	1.99 ± 1.36 37.24%↑	T 0.018
Número de Z.A.	2.17 ± 2.21	2.59 ± 1.94 14.09%↑	U 0.139
Longitud media de las Z.A. (nm)	92.41 ± 36.83	156.78 ± 523.3469.65%↑	U 0.077
% de Z.A. encaradas	81.50 ± 25.77	70.77 ± 30.21 13.16%↓	U 0.135
% del perímetro ocupado por Z.A.	3.16 ± 4.06	3.56 ± 5.26 12.65%↑	U 0.139
% del axolema sináptico ocupado por Z.A.	5.77 ± 8.30	6.81 ± 9.92 18.02%↑	U 0.075
Número de Z.A. por μm de axolema	0.30 ± 0.25	0.38 ± 0.20 26.66%↑	U 0.139
Separación axón-postsináptico (nm)	43.95 ± 6.51	41.57 ± 8.23 5.41%↓	T 0.079
Separación cedula glial-postsináptico (nm)	64.73 ± 12.72	80.52 ± 20.98 24.39%↑	U 0.321

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test.

%↓ y %↑ representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.
 N= 57 sinapsis normales en la serie control; N= 63 sinapsis normales en la serie IFA.

VI.3.1. COMPONENTE PRESINÁPTICO.

En los animales de la serie de incremento fisiológico de actividad (I.F.A.), no se modifica significativamente, respecto a los animales de la serie control, el porcentaje de sinapsis normales. En este sentido, el análisis de los parámetros axonales en ambas situaciones (sinapsis normales de la serie control respecto a las sinapsis normales de la serie I.F.A.) revelan la existencia de cambios mínimos, aunque con una posible relevancia funcional (ver Tabla VI). Específicamente un incremento del **% de axoplasma ocupado por mitocondrias** y también de la densidad de cisternas del R.E.L. (**Numero de cisternas del R.E.L./ μm^2**), lo que sugiere un posible incremento de actividad metabólica global.

Así mismo, se observa un incremento del **diámetro de V.S.** (vesículas sinápticas) y del número de V.S. en contacto con el axolema sináptico (**Número de V.S. por μm de axolema sináptico**), lo que podría ser interpretado en el sentido de una mayor diferenciación de una parte de la maquinaria de la neurotransmisión. Sin embargo, los parámetros que describen las densificaciones del axolema (zonas activas) no se modifican. Así por ejemplo, la **longitud media de las Z.A.** (zonas activas; en la serie de incremento de actividad es un 70% mayor que en la serie control), el **% de axolema sináptico ocupado por Z.A.** (en la serie de incremento de actividad es un 20% mayor que en la serie control) o el número de Z.A. por unidad de longitud del axolema (**Número de Z.A. por μm de axolema**, en la serie de incremento de actividad es un 25% mayor que en la serie control) no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la serie control y la de incremento de actividad locomotora.

Curiosamente, algunos de estos cambios en sinapsis normales de animales con actividad locomotora incrementada son similares a los observados en los axones de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) de la serie control (ver Tabla VII, en el siguiente apartado). Esta observación sugiere que la remodelación sináptica que ocurre espontáneamente en los animales control, y que conlleva la aparición de diferentes grados de abandono en algunas sinapsis, podría estar relacionado también con variaciones puntuales de actividad en determinadas ramas axonales para un mismo músculo. Curiosamente también, algunos de estos cambios son similares a los descritos en las sinapsis M.A.S. de los animales control (ver apartado 5 del capítulo de Resultados).

En resumen, los cambios de la estructura axonal en las sinapsis de aspecto normal atribuibles al incremento de actividad (serie I.F.A.), se encuentran también en mayor o menor medida en las sinapsis de los animales control que presentan algún grado de abandono neural (M.A.S. y A.A.S.).

Tabla VII: Componente postsináptico. Sinapsis normales. Serie IFA.

C. POSTSINAPTICO SINAPSIS NORMALES	SUBAXONAL CTR	SUBAXONAL IFA	COMP.
Longitud sarcolema (μm)	37.43 \pm 16.66	34.60 \pm 25.08 7.56% \downarrow	T 0.054
Amplitud oberturas (μm)	77.50 \pm 21.62	65.26 \pm 15.22 15.79% \downarrow	T 0.001
Amplitud crestas (μm)	320.45 \pm 128.31	332.41 \pm 121.87 3.73% \uparrow	U 0.278
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 \pm 1.56	5.24 \pm 1.88 23.29% \uparrow	T 0.002
% del pliegue primario ocupado por crestas	76.07 \pm 17.56	88.76 \pm 18.26 16.68% \uparrow	U 0.000
Longitud del pliegue secundario (μm)	613.67 \pm 157.95	642.65 \pm 151.67 4.72% \uparrow	T 0.304
Número de secciones por abertura	3.27 \pm 1.59	3.51 \pm 1.96 7.33% \uparrow	T 0.457
Penetración densificaciones (μm)	77.67 \pm 37.30	147.38 \pm 69.00 89.75% \uparrow	T 0.000
% crestas densificadas	91.81 \pm 12.82	95.41 \pm 10.48 3.92% \uparrow	U 0.058
Longitud media densificaciones (μm)	337.82 \pm 137.03	455.94 \pm 138.24 34.96% \uparrow	T 0.000
Ratio longitud densificaciones pre-/post-	0.10 \pm 0.15	0.06 \pm 0.01 40.00% \downarrow	U 0.243
Número V. coated por abertura	0.22 \pm 0.13	0.52 \pm 0.79 136.36% \uparrow	U 0.032
Número de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.44 \pm 1.67	1.39 \pm 1.33 3.47% \downarrow	U 0.363
Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico	4.0 \pm 4.31	4.83 \pm 2.62 20.75% \uparrow	U 0.001

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad.

T: t-test; U: U-test.

% \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.

N= 57 sinapsis normales en la serie control; N= 63 sinapsis normales en la serie IFA.

VI.3.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO.

El componente postsináptico de las sinapsis de aspecto normal de la serie de incremento de actividad locomotora en relación al componente postsináptico normal de la serie control, muestra ciertos cambios en determinados parámetros que indican una mayor diferenciación de ciertas estructuras (ver Tabla VII).

Específicamente, se observa una disminución de la **amplitud de las oberturas** ($P < 0.005$) lo que conlleva (no varía la **amplitud de las crestas**) a una alteración de la **ratio de amplitud de cresta/obertura**. Respecto al sarcolema de las sinapsis normales de la serie control, para una **longitud del sarcolema** similar ($P > 0.05$) se observa solamente una menor amplitud de oberturas lo que conlleva a un incremento ($P < 0.000$) de la proporción de pliegue primario correspondiente a superficie crestal (**% de pliegue primario ocupado por crestas**; Tabla VII).

Por otra parte, los cambios observados en la membrana densificada que recubre a la crestas son notables (ver Tabla VII). Existe un incremento del 90% en la penetración de la membrana densificada hacia la profundidad de los pliegues secundarios (**Penetración de las densificaciones**) y un incremento del 35% de la **longitud media de las densificaciones** ($P < 0.000$ en ambos casos) y, sin embargo, no se modifica el porcentaje de crestas que presenta densificaciones de membrana (**% de crestas densificadas**). Pese a todos los cambios observados, el incremento de membrana densificada postsináptica no es desproporcionado con respecto a la longitud de las membranas densificadas presinápticas (zonas activas) ya que no varía la **ratio entre longitud pre-/post-** de forma significativa ($P > 0.2$).

Existen claros indicios de un incremento de actividad reformatora en el componente postsináptico de las sinapsis normales de la serie control. Por ejemplo, se observa un incremento significativo en el número de vesículas *coated* por obertura de los pliegues secundarios ($P < 0.05$) y en la densidad de lisosomas presentes en el componente postsináptico normal ($P < 0.005$; Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico; Tabla VII).

Los cambios descritos, especialmente los referentes a la membrana densificada (que incrementa los valores métricos de los parámetros que la describen) junto con los cambios presinápticos de incremento del diámetro de las vesículas sinápticas y del número de vesículas próximas al axolema sináptico, sugieren el desarrollo de una mayor y selectiva diferenciación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión inducido por el incremento experimental de actividad .

VI.4. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS

(A.A.S.).

VI.3.1. SERIE CONTROL.

En el presente trabajo, los resultados cuantitativos obtenidos del análisis de los parámetros de cada tipo de sinapsis (parámetros definidos en el capítulo de Material y Métodos) se han comparado inicialmente con los de las sinapsis de aspecto normal (S.N.). Eventualmente, con las sinapsis que presentan formas de abandono se ha hecho el intento de tipificación, comparando también las sinapsis con diferentes grados de abandono entre ellas (A.A.S. vs M.A.S. y A.A.S. vs T.A.S.).

VI.4.1.1. COMPONENTE PRESINAPTICO. SINAPSIS A.A.S.. SERIE CONTROL.

Las sinapsis con amplio abandono (A.A.S.) presentan axones más pequeños que en las sinapsis normales, los valores tanto del área como del perímetro son menores significativamente ($P < 0.000$, en ambos casos). Sin embargo, son más anfractuosos (*Ratio perímetro/área*; $P < 0.05$, Tabla VIII) que los axones de las sinapsis normales, de manera que el axolema está más plegado, dando un aspecto en la sección, de superficie más irregular. Esto sugiere una desaparición de parte del axoplasma con un posterior plegamiento relativo del axolema.

El incremento del % de axolema libre (sin aposición al componente postsináptico ni a la célula glial) en las sinapsis A.A.S. respecto de las sinapsis normales no es significativo

($P > 0.1$, Tabla VIII). Por tanto, en relación a las sinapsis normales, el aumento del **% de axolema glial** observado en las sinapsis A.A.S. puede ser debido a la disminución del **% de axolema sináptico** ($P < 0.000$ en ambos casos; Tabla VIII). Cabe resaltar que el aumento del perímetro glial y el decremento del perímetro sináptico son del mismo orden de magnitud (un 20%).

El área postsináptica subaxonal también disminuye en las sinapsis A.A.S. respecto al valor de este parámetro en las sinapsis normales (datos no mostrados en tablas). En las formas de amplio abandono, es más importante el decremento del área presináptica (un 37% de decremento) que el decremento del área postsináptica (32 % de decremento) respecto al valor de estos parámetros en las sinapsis normales, de manera que la **ratio área pre-/área post-sináptica** es un 38% mayor en las sinapsis A.A.S. que en las sinapsis normales ($P < 0.05$, Tabla VIII). Estos resultados sugieren que los cambios a nivel del componente presináptico podrían inducir ciertas modificaciones (ver Tabla IX) en el componente postsináptico (ver capítulo de Discusión, apartado 5.1.2.).

En cuanto al contenido de orgánulos de los axones de las sinapsis A.A.S. en relación a las sinapsis normales, se observa un incremento de la densidad de vesículas **core** (**Número de vesículas core/ μm^2**), densidad de lisosomas (**Número de lisosomas / μm^2**) y cisternas del retículo endoplasmático liso (**Número de cisternas del R.E.L./ μm^2** ; $P < 0.005$ en todos los casos, Tabla VIII). En relación al axón normal, prácticamente no hay variaciones en la densidad de las vesículas **coated** (**Número de vesículas coated/ μm^2**) ni del **% de axoplasma ocupado por mitocondrias** ($P > 0.05$ en los dos casos, Tabla VIII). Estos datos, globalmente, podrían ser indicativos de incremento de actividad lítica en los axones A.A.S..

TABLA VIII: Componente presináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie control.

COMPONENTE PRESINAPTICO SINAPSIS A.A.S.	AXON NORMAL	AXON A.A.S.	COMP.
Perímetro (μm)	7.64 \pm 3.34	5.92 \pm 3.84 22.49% ↓	U 0.000
% de axolema sináptico	58.47 \pm 11.37	47.87 \pm 10.54 18.13% ↓	T 0.000
% de axolema glial	36.83 \pm 8.85	44.66 \pm 11.25 21.25% ↑	T 0.000
% de axolema libre	7.18 \pm 6.49	8.56 \pm 8.17 19.22% ↑	T 0.331
Ratio área pre- / área postsináptica	2.23 \pm 1.81	3.08 \pm 2.65 38.11% ↑	U 0.008
Ratio perímetro / área ($\mu\text{m} / \mu\text{m}^2$)	2.84 \pm 0.99	3.90 \pm 1.62 37.18% ↑	T 0.000
Número de V.S. / μm^2	44.45 \pm 28.30	41.24 \pm 22.93 7.22% ↑	T 0.502
Diámetro medio de V.S. (nm)	45.99 \pm 4.79	49.38 \pm 6.75 7.38% ↑	T 0.004
% axoplasma ocupado por V.S.	2.48 \pm 1.76	2.53 \pm 1.56 2.01% ↑	T 0.862
Número de V.S. por μm de axolema sináptico	2.12 \pm 0.86	2.65 \pm 1.23 24.99% ↑	T 0.011
Número de vesículas coated / μm^2	2.66 \pm 2.57	3.09 \pm 2.41 16.16% ↑	U 0.070
Número de vesículas core / μm^2	2.21 \pm 1.51	5.65 \pm 4.45 54.75% ↑	T 0.000
Número de lisosomas / μm^2	2.25 \pm 1.56	3.66 \pm 2.78 62.67% ↑	T 0.002
% de axoplasma ocupado por mitocondrias	12.14 \pm 7.52	13.07 \pm 6.41 7.66% ↑	T 0.526
Número de cisternas del R.E.L. / μm^2	1.45 \pm 0.93	2.23 \pm 1.57 53.79% ↑	T 0.006
Número de Z.A. por sección	2.17 \pm 2.21	2.95 \pm 2.06 35.94% ↑	U 0.010
Longitud media de las Z.A. (nm)	92.41 \pm 36.83	85.64 \pm 31.30 7.33% ↑	T 0.387
% de Z.A. que están encaradas	81.50 \pm 25.77	75.26 \pm 25.20 7.65% ↓	U 0.298
% del perímetro ocupado por Z.A.	3.16 \pm 4.06	4.53 \pm 3.26 43.25% ↑	U 0.001
% del axolema sináptico ocupado por Z.A.	5.77 \pm 8.30	10.21 \pm 8.07 76.95% ↑	U 0.000
Número de Z.A. por μm de axolema	0.30 \pm 0.25	0.51 \pm 0.29 72.34% ↑	U 0.000
Separación axón-postsináptico (nm)	43.95 \pm 6.51	45.24 \pm 9.75 2.93% ↑	T 0.406
Separación célula glial-postsináptico (nm)	64.73 \pm 12.72	67.23 \pm 22.56 3.86% ↑	T 0.654

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S.

T: t-test; U: U-test.

% ↓ y % ↑ en negrilla hace referencia al % de decremento o incremento de los valores de los parámetros de la sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis normales.

En las sinapsis A.A.S. no se modifican ni la densidad de vesículas sinápticas (Número de V.S./ μm^2) ni el % de axoplasma que ocupan, en relación al valor de estos parámetros en el axón de las sinapsis normales ($P > 0.5$ en los dos casos, Tabla VIII). En cambio, se observa un incremento significativo ($P < 0.005$) del diámetro y del número de vesículas sinápticas en contacto con el axolema sináptico (Número de V.S. por μm de axolema sináptico, $P < 0.05$). Estas variaciones indican que las sinapsis A.A.S. poseen un axón con una mayor diferenciación de esta porción de la maquinaria de neurotransmisión que las sinapsis normales.

En cuanto a las zonas activas (estructuras también relacionadas con la neurotransmisión), entre el axón A.A.S. y el axón normal, no varía la longitud media de estas densificaciones ni el % de Z.A. encaradas a las oberturas de los pliegues postsinápticos. En cambio aumenta (en un 36%, $P < 0.05$) el número de Z.A. por sección (Tabla VIII). Es interesante resaltar que los axones de las sinapsis A.A.S. mantienen el % de Z.A. encaradas cuando presentan un axolema de menor longitud que el normal. En el axón de las sinapsis A.A.S., el incremento observado en el número de zonas activas se traduce en un importante aumento del % de perímetro sináptico, propiamente dicho, ocupado por estas diferenciaciones (% de perímetro ocupado por Z.A., 77% de incremento respecto al axón normal; $P < 0.005$; Tabla VIII). Estos resultados sugieren una importante remodelación subcelular en condiciones de retracción presináptica.

En resumen, en relación al axón normal, se observa un incremento de diferenciación presináptica de las formas A.A.S. en cuanto a la maquinaria de la neurotransmisión se refiere, tanto por: (1) vesículas sinápticas (mayores y más proporción en contacto con el axolema sináptico) y (2) zonas activas (más numerosas y ocupan un porcentaje mayor del perímetro sináptico).

Tabla IX: Componente postsináptico. Sinapsis A.A.S. Serie control.

COMPONENTE POSTSINÁPTICO	C. POSTSINÁPTICO N.S. (1)	C. POSTSINÁPTICO A.A.S.			COMPARACIONES		
		Subaxonal (2)	Subglial (3)	Abandonado (4)	1/2	1/3	1/4
Longitud sarcolema (μm)	37.43 \pm 16.66	23.94 \pm 14.58 36.00% \downarrow	7.32 \pm 9.48 80.40% \downarrow	11.18 \pm 8.61 70.10% \downarrow	0.000 T	0.000 T	0.000 T
Longitud sarcolema total	37.43 \pm 16.66	37.03 \pm 16.46 1.05% \downarrow			T 0.898		
% sarcolema opuesto a...	100.00 \pm 0.00	63.49 \pm 19.04 36.51% \downarrow	22.89 \pm 20.50 77.11% \downarrow	30.04 \pm 20.07 69.96% \downarrow			
Amplitud oberturas (nm)	77.50 \pm 21.62	69.18 \pm 20.75 10.70% \downarrow	86.48 \pm 26.86 11.50% \uparrow	88.52 \pm 32.88 14.20% \uparrow	0.037 T	0.154 T	0.045 T
Amplitud crestas (nm)	320.45 \pm 128.31	274.89 \pm 105.32 14.20% \downarrow	275.73 \pm 122.97 14.00% \downarrow	253.74 \pm 81.67 20.80% \downarrow	0.039 U	0.213 U	0.008 U
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 \pm 1.56	4.14 \pm 1.54 2.58% \downarrow	3.42 \pm 1.63 19.50% \downarrow	3.19 \pm 1.53 24.90% \downarrow	0.691 T	0.039 T	0.000 T
% de pliegue primario ocupado por crestas	76.07 \pm 17.56	79.71 \pm 19.65 4.78% \downarrow	74.20 \pm 38.94 2.46% \downarrow	57.79 \pm 20.34 24.00% \downarrow	0.295 T	0.823 T	0.000 T
Longitud pliegue secundario (nm)	613.67 \pm 157.95	602.08 \pm 140.46 1.88% \downarrow	505.18 \pm 218.11 17.60% \downarrow	548.65 \pm 260.55 10.60% \downarrow	0.677 T	0.031 T	0.125 T
Número de secciones por obertura	3.27 \pm 1.59	3.29 \pm 5.06 0.61% \uparrow	1.82 \pm 0.80 44.34% \downarrow	2.61 \pm 1.65 20.18% \downarrow	0.051 U	0.000 T	0.000 T
Número de secciones por obertura totales	3.27 \pm 1.59	2.77 \pm 2.03 15.29% \downarrow			U 0.008		
Penetración densificaciones (nm)	77.67 \pm 37.30	60.06 \pm 31.63 22.70% \downarrow	45.88 \pm 26.54 41.30% \downarrow	42.36 \pm 36.28 45.40% \downarrow	0.008 T	0.000 T	0.000 U
% crestas densificadas	91.81 \pm 12.82	95.93 \pm 11.55 4.50% \uparrow	58.21 \pm 15.57 36.60% \downarrow	62.22 \pm 18.13 32.20% \downarrow	0.013 U	0.000 U	0.000 U
Longitud media densificaciones (nm)	337.82 \pm 137.03	285.72 \pm 113.88 15.40% \downarrow	330.62 \pm 266.90 21.13% \downarrow	242.06 \pm 129.08 28.30% \downarrow	0.028 T	0.901 T	0.000 T
Ratio longitud densificaciones pre-/post-	0.10 \pm 0.15	0.10 \pm 0.09 0.00%			T 0.900		
Número vesículas coated por obertura	0.22 \pm 0.13	0.34 \pm 0.22 54.00% \uparrow	0.49 \pm 0.42 168.00% \uparrow	0.70 \pm 0.45 218.00% \uparrow	0.030 T	0.020 U	0.005 T
Número de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.44 \pm 1.67	1.99 \pm 1.85 38.19% \uparrow			U 0.071		
Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico	4.0 \pm 4.31	4.68 \pm 5.02 17.00% \uparrow			U 0.214		

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S.

T: t-test; U: U-test. % \uparrow y % \downarrow hace referencia al % de incremento o decremento de los valores de componente postsináptico A.A.S. respecto al componente postsináptico normal.

VI.4.1.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO. SINAPSIS A.A.S.. SERIE CONTROL.

En las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.), la **longitud de sarcolema total** es la misma que en las sinapsis normales ($37 \mu\text{m}$ en los dos casos, Tabla IX). Globalmente el componente postsináptico de las sinapsis ampliamente abandonadas es menor que el de las normales (el área postsináptica total de las formas A.A.S. decrece un 22% respecto de las formas normales, $P < 0.05$, valores no mostrados en tablas), en concordancia con un axón más pequeño (ver subapartado anterior).

Se acepta, convencionalmente, que el abandono se ha producido por retracción axonal (ver por ejemplo Wernig y Dorlöchter, 1989). Así, el axón retraído pasa a cubrir, en promedio, unos 2/3 (63%) del total del sarcolema de las sinapsis A.A.S., el resto del sarcolema, está cubierto por la célula de Schwann (20%) o totalmente abandonado (30%) (% de sarcolema opuesto a...; Tabla IX).

Por otro lado, también unos 2/3 del número de oberturas postsinápticas están ocupadas por el axón (7.89 ± 5.92 sobre un total de 12.21 ± 6.32 oberturas, valores no mostrados en Tablas). En promedio, 3.63 ± 2.24 oberturas están totalmente abandonadas y sólo 2.54 ± 1.96 cubiertas por prolongaciones de la célula glial. Esta distribución de oberturas de pliegues postsinápticos es correlacionable con el % de ocupación del sarcolema de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.).

El número de secciones por obertura (secciones de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático), disminuye en el conjunto de todo el componente postsináptico

A.A.S.. Se trata, pues, de unos pliegues globalmente más simples que los de las sinapsis normales (Tabla IX). El estudio pormenorizado de este parámetro revela que solamente bajo el axón se mantiene el número de cisternas por obertura ($P > 0.05$), mientras que disminuye el valor de este parámetro tanto bajo la célula glial (44% de decremento) como en el resto del sarcolema abandonado (20% de decremento; $P = 0.000$ en ambos casos, Tabla IX). Así, realmente, no todo el componente postsináptico A.A.S. presenta unos pliegues más simples que los de las sinapsis normales, sino que este fenómeno sólo sucede en la porción de sarcolema no relacionado directamente con el axón.

El número de vesículas *coated* por obertura se incrementa casi linealmente desde el componente postsináptico cubierto por el axón de las sinapsis A.A.S. (54% de incremento respecto a valores del componente postsináptico de las sinapsis normales), al cubierto por la glía (168% de incremento), y hasta un máximo (218% de incremento respecto al postsináptico de las sinapsis normales) en el sarcolema abandonado ($P < 0.05$ en todos los casos; Tabla IX). A mayor grado de abandono, se observan más vesículas cubiertas por obertura. Sin embargo los parámetros referentes a otros organoides del sarcoplasma sináptico (Número de mitocondrias por μm^2 de sarcoplasma, Número de mitocondrias por μm^2 de sarcoplasma), no se ven afectados por el fenómeno del abandono axonal; aunque aumentan sus valores considerablemente respecto a los valores normales (Tabla IX), no lo hacen de forma significativa.

VI.4.1.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S.. Serie control.

En la zona de membrana del componente postsináptico de las sinapsis A.A.S. ocupada por el axón se observan (ver Tabla IX) unas oberturas más estrechas que en el componente postsináptico normal (**Amplitud oberturas**; $P < 0.05$), aunque el pliegue, que depende de estas oberturas, penetra a igual profundidad en la placa motriz (**Longitud pliegue secundario**). Las crestas entre estos pliegues secundarios, no sólo están, en promedio, en un número menor bajo el axón de las sinapsis A.A.S. que bajo el axón de las sinapsis normales (un 22% menos, dato no mostrado en tablas), si no que son también más estrechas (**Amplitud crestas**; $P < 0.05$), y por ello, ocupan la misma proporción de pliegue primario que en las sinapsis normales (**% de pliegue primario ocupado por crestas**). Pese a que la amplitud de oberturas y crestas es menor en las sinapsis A.A.S., los dos parámetros disminuyen de forma proporcional (diferencia no significativa de *ratio* entre **amplitud cresta/obertura**). Así pues, en relación al postsináptico normal, todos los elementos de la arquitectura postsináptica descritos hasta el momento bajo el axón de las sinapsis A.A.S., presentan unos valores de los parámetros que los describen de menor magnitud.

En relación al postsináptico normal, el sarcolema bajo el axón de las sinapsis A.A.S. presenta además de crestas más estrechas una membrana densificada que penetra un 23% menos, en promedio, por los pliegues postsinápticos y que son, por otra parte, un 15.5% más cortas (**Penetración densificaciones**, **Longitud media densificaciones**, respectivamente; $P < 0.05$ en los dos casos, Tabla IX). Sin embargo, respecto al sarcolema normal, se observa un aumento en la proporción de crestas con membrana densificada bajo el axón de las sinapsis A.A.S. (**% crestas densificadas**; $P < 0.05$, Tabla IX). Este fenómeno sería indicativo de la existencia de un mecanismo que compensaría la disminución de los parámetros de longitud

antes descritos. Si se observa la *ratio* entre la longitud total de axolema densificado (zonas activas) y la del sarcolema con densificaciones bajo el axón (***Ratio* longitud densificaciones pre-/post-**; Tabla IX), la variación entre sinapsis normales y A.A.S. es nula. De manera que las variaciones observadas referentes al sarcolema densificado bajo el axón A.A.S., están compensadas por cambios paralelos en la membrana presináptica.

VI.4.1.2.2. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis A.A.S.. Serie control.

El sarcolema de las sinapsis A.A.S. que no está cubierto por ningún elemento presináptico (abandonado) presenta unas oberturas también mayores que las normales (**Amplitud oberturas**). Sin embargo, respecto a las oberturas normales, el incremento es mayor cuando las oberturas están abandonadas (14%) que cuando están bajo el axón en las sinapsis A.A.S. (10%), ($P < 0.05$ en ambos casos, Tabla IX). Los pliegues secundarios que dependen de estas oberturas siguen teniendo la misma longitud media ($P > 0.05$) que en los pliegues normales (**Longitud pliegue secundario**; Tabla IX).

En cuanto a la **amplitud de las crestas** entre pliegues secundarios abandonados, sucede algo similar a lo descrito para las oberturas. El sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. presenta unas crestas un 20% más estrechas que la amplitud media de las crestas normales ($P < 0.05$, Tabla IX). El decremento de este parámetro es mayor en estas zonas de membrana postsináptica abandonadas que el descrito anteriormente entre crestas subaxonales sean estas de sinapsis normales o de sinapsis A.A.S. (Tabla IX). Por otra parte, la ocupación del pliegue primario por crestas en estas porciones de sarcolema abandonado disminuye en un 25% respecto a lo observado en la membrana postsináptica de sinapsis

normales (**% de pliegue primario ocupado por cresta**). También se observa un desequilibrio de la **Ratio amplitud cresta/obertura** (oberturas más amplias; Tabla IX), en el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. en relación al sarcolema de las sinapsis normales .

En cuanto a la maquinaria relacionada con la neurotransmisión, las densificaciones del sarcolema abandonado muestran, respecto al sarcolema densificado de las sinapsis normales, una disminución de su longitud media, penetración por el pliegue y también del porcentaje de crestas que presentan densificaciones (**Longitud media densificaciones, Penetración densificaciones y % crestas densificadas**, respectivamente; $P < 0.000$, en los tres casos; Tabla IX).

En resumen, en el sarcolema A.A.S. abandonado, todos los parámetros estructurales y relacionados con la maquinaria de neurotransmisión presentan signos de desdiferenciación mucho más marcados que en el sarcolema subaxonal y, a diferencia de este, no están compensados (desequilibrio de la **ratio** entre amplitudes de crestas y oberturas).

VI.4.1.2.3. Componente postsináptico subglial. Sinapsis A.A.S.. Serie control.

En relación al sarcolema de las sinapsis normales, el componente postsináptico de las sinapsis A.A.S. ocupado por glía no varía ($P > 0.1$) ni en la **amplitud de las oberturas** ni en la **amplitud de las crestas**, aunque sus valores medios se comportan de forma similar (crestas más estrechas y oberturas mayores) al descrito para el sarcolema abandonado (Tabla IX). Sin embargo, bajo la célula glial, decrece de forma significativa ($P < 0.05$), la **ratio amplitud cresta/obertura**, que se comporta igual que en el sarcolema abandonado, siempre

a favor de oberturas más amplias que en el componente postsináptico de las sinapsis normales (Tabla VI). Por lo tanto, el **% de pliegue primario ocupado por crestas**, al igual que en la membrana subaxonal de las sinapsis A.A.S., no varía respecto al sarcolema normal (Tabla IX).

En cuanto a la porción de sarcolema directamente relacionado con la neurotransmisión, la membrana densificada bajo la glía muestra una menor profundidad de penetración por el pliegue secundario y una proporción menor de crestas con densificaciones, con respecto a la membrana densificada de las sinapsis normales (**Penetración densificaciones y % crestas densificadas**, respectivamente; $P < 0.000$ en los dos casos, Tabla VI). Sin embargo, no varía la **longitud media de las densificaciones** postsinápticas respecto a la longitud media de este parámetro en las sinapsis normales ($P > 0.1$). Aparentemente, parece incongruente que sobre unas crestas más delgadas y con una misma longitud de densificaciones en vez de aumentar la penetración de las densificaciones en los pliegues postsinápticos, esta disminuya. Una posible explicación puede estar en el estudio de la morfología de estas crestas (capítulo de resultados apartado 2, capítulo de Discusión apartado 5.1.2.).

En resumen, parece haber una clara tendencia a la **desdiferenciación** en el sarcolema de las sinapsis A.A.S. Esta **desdiferenciación** es aparente bajo el axón A.A.S. (ya que queda parcialmente compensada), bajo la célula glial la **desdiferenciación** ya es evidente en algunos parámetros y en el sarcolema sin oposición se intensifican las alteraciones detectadas bajo la glía, mostrando el resto de parámetros signos de clara **desdiferenciación**.

VI.4.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD (I.F.A.).

VI.4.2.1. COMPONENTE PRESINÁPTICO. SINAPSIS A.A.S.. SERIE I.F.A.

En la comparación entre los axones que inervan áreas sinápticas ampliamente abandonadas (A.A.S.) de las series control y de incremento de actividad locomotora (I.F.A.), se observa que, al igual que en las sinapsis normales de la serie de incremento de actividad, son pocos los parámetros que cambian significativamente (ver Tabla X).

Es curioso el incremento del **% de axoplasma ocupado por mitocondrias** (55% mayor que en la serie control), situación que también se observa en los axones que inervan las sinapsis normales en la serie de incremento de actividad, lo que indica claramente un mayor desarrollo de las estructuras que soportan la actividad metabólica del componente presináptico.

Otro parámetro que también se modifica significativamente ($P < 0.05$) es el **diámetro de las V.S.** (vesículas sinápticas). Aunque en este caso de forma inversa al cambio inducido por el incremento de uso en los axones que inervan áreas sinápticas normales. La disminución del **diámetro de las V.S.** (vesículas sinápticas) en los axones que inervan las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad podría tener alguna relación con la disminución también observada en estos axones de la densidad de vesículas *core* (**Número de vesículas *core*/μm²**, ver capítulo de Discusión apartados VII.5.1.1. y VII.5.2.1.).

De hecho, la estructura de los axones en las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) es similar, tanto en la serie control como en la serie de incremento fisiológico de actividad.

Tabla X: Componente presináptico. Sinapsis A.A.S.. Serie IFA.

C. PRESINAPTICO SINAPSIS A.A.S.	AXON CTR	AXON IFA	COMP.
Area (μm^2)	1.98 \pm 1.94	1.73 \pm 1.37 12.62% ↓	U 0.522
Perímetro (μm)	5.92 \pm 3.84	5.33 \pm 3.63 10.11% ↓	U 0.383
% de axolema sináptico	47.87 \pm 10.54	50.35 \pm 9.05 5.18% ↑	T 0.146
% de axolema glial	44.66 \pm 11.25	41.94 \pm 9.76 6.09% ↓	U 0.295
% de axolema libre	8.56 \pm 8.17	8.38 \pm 7.90 2.10% ↓	U 0.822
Ratio área pre-/área postsináptica	3.08 \pm 2.65	3.01 \pm 4.01 2.27% ↓	U 0.043
Ratio perímetro / área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	3.90 \pm 1.69	4.01 \pm 1.50 2.82% ↑	T 0.707
Número V.S. / μm^2	41.24 \pm 22.93	47.53 \pm 26.90 15.25% ↑	T 0.134
Diámetro V.S. (nm)	49.38 \pm 6.75	46.69 \pm 5.79 5.44% ↓	T 0.015
% axoplasma ocupado por V.S.	2.53 \pm 1.56	2.56 \pm 1.34 1.18% ↑	T 0.892
Número de V.S. por μm de axolema sináptico	2.65 \pm 1.23	2.96 \pm 2.16 11.69% ↑	T 0.275
Número de vesículas coated / μm^2	3.09 \pm 2.41	3.19 \pm 3.12 3.23% ↑	U 0.713
Número de vesículas core / μm^2	5.65 \pm 4.45	2.85 \pm 2.31 49.55% ↓	U 0.000
Número de lisosomas / μm^2	3.66 \pm 2.78	3.17 \pm 2.42 13.38% ↓	T 0.298
% de axoplasma ocupado por mitocondrias	13.07 \pm 6.41	20.34 \pm 11.67 55.62% ↑	T 0.000
Número de cisternas del R.E.L. / μm^2	2.23 \pm 1.57	2.82 \pm 2.51 26.45% ↑	T 0.125
Número de Z.A. por sección	2.95 \pm 2.06	2.25 \pm 1.57 23.72% ↓	U 0.061
Longitud media de las Z.A. (nm)	85.64 \pm 31.30	92.12 \pm 61.63 7.56% ↑	U 0.772
% de Z.A. encaradas	75.26 \pm 25.20	76.77 \pm 25.12 2.00% ↑	U 0.483
% de perímetro ocupado por Z.A.	4.53 \pm 3.26	4.13 \pm 6.44 8.83% ↓	U 0.107
% del axolema sináptico ocupado por Z.A.	10.21 \pm 8.07	8.57 \pm 13.41 16.06% ↓	U 0.086
Número de Z.A. por μm de axolema	0.51 \pm 0.29	0.42 \pm 0.25 17.64% ↓	U 0.080
Separación axón-postsináptico (nm)	45.24 \pm 9.75	44.78 \pm 8.54 1.01% ↓	T 0.769
Separación célula glial-postsináptico (nm)	67.23 \pm 22.56	80.91 \pm 24.88 20.34% ↑	T 0.015

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test.

% ↓ y % ↑ representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.
 N= 57 sinapsis A.A.S. en la serie control; N= 88 sinapsis A.A.S. en la serie IFA.

Tabla XI: Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S.. Serie IFA.

C. POSTSINAPTICO SINAPSIS A.A.S.	SUBAXONAL CTR	SUBAXONAL ACT	COMP.
Longitud sarcolema (μm)	23.94 \pm 14.58	25.44 \pm 13.67 6.26% \uparrow	T 0.535
Longitud sarcolema total	37.03 \pm 16.46	40.91 \pm 17.73 10.41% \uparrow	T 0.181
% sarcolema opuesto a...	63.49 \pm 19.04	61.80 \pm 18.06 2.66% \downarrow	T 0.595
Amplitud oberturas (nm)	69.18 \pm 20.75	69.51 \pm 21.25 0.47% \uparrow	T 0.927
Amplitud crestas (nm)	274.89 \pm 105.32	331.56 \pm 146.83 20.61% \uparrow	U 0.017
Ratio amplitud cresta/obertura	4.14 \pm 1.54	4.96 \pm 2.36 19.80% \uparrow	U 0.008
% del pliegue primario ocupado por crestas	79.71 \pm 19.65	86.62 \pm 28.21 8.68% \uparrow	T 0.086
Longitud pliegue secundario (nm)	602.08 \pm 140.46	664.28 \pm 133.21 10.33% \uparrow	T 0.009
Número de secciones por abertura	3.29 \pm 5.06	2.04 \pm 1.71 38.08% \downarrow	U 0.049
Número de secciones por abertura totales	2.77 \pm 2.03	1.75 \pm 1.03 36.82% \downarrow	U 0.000
Penetración densificaciones (nm)	60.06 \pm 31.63	152.79 \pm 61.99 154.39% \uparrow	T 0.000
% crestas densificadas	95.93 \pm 11.55	95.91 \pm 9.97 0.02% \downarrow	U 0.760
Longitud media densificaciones (nm)	285.72 \pm 113.88	440.74 \pm 144.75 54.26% \uparrow	T 0.000
Ratio longitud densificaciones pre-/post-	0.10 \pm 0.09	0.06 \pm 0.12 40.00% \downarrow	U 0.001
Número V. coated por abertura	0.34 \pm 0.22	0.45 \pm 0.49 32.35% \uparrow	T 0.049
Número de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.99 \pm 1.85	26.11 \pm 70.11 1212.06% \uparrow	U 0.006
Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico	4.68 \pm 5.02	122.26 \pm 308.25 2512.93% \uparrow	U 0.000

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad.

T: t-test; U: U-test. % \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.

N= 57 sinapsis A.A.S. en la serie control; N= 88 sinapsis A.A.A. en la serie IFA.

VI.4.2.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO. SINAPSIS A.A.S.. SERIE I.F.A..

En el análisis de los parámetros del componente postsináptico de las sinapsis ampliamente abandonadas, vistas en su totalidad, de la serie de incremento de actividad fisiológica, se observa que la **longitud de sarcolema total** no varía respecto a la del sarcolema homólogo en la serie control (ver Tabla XI).

Por otro lado, los pliegues secundarios de las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad son globalmente más simples que en la serie control ya que el número de secciones de estos pliegues por obertura (**Número de secciones por obertura totales**) disminuye en un 37% ($P < 0.000$). Como sucedía en la serie control, esta simplificación de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático no es uniforme en las tres porciones de sarcolema consideradas en las sinapsis A.A.S.. Para la serie de incremento de actividad, la simplificación de los pliegues sólo se observa de forma significativa para el sarcolema subaxonal y compensa el incremento significativo del valor de este parámetro en el sarcolema subglial (ver tablas XI y XII). El estudio pormenorizado de las diferentes porciones de sarcolema revela, como se verá más adelante, otros cambios relacionados con la citoarquitectura postsináptica.

Con respecto a los organoides postsinápticos, se pone de manifiesto cierta capacidad adaptativa a la nueva situación de incremento de actividad locomotora: incrementa espectacularmente tanto la densidad mitocondrial (1200% de incremento; **número de mitocondrias por μm^2 de postsináptico**) como la densidad lisosomal (2.500% de incremento; **número de lisosomas por μm^2 de postsináptico**) respecto al valor de estos parámetros en el componente postsináptico de las sinapsis A.A.S. de la serie control (ver Tabla XI).

VI.4.2.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis A.A.S.. Serie I.F.A.

El análisis del valor de los parámetros en la porción de sarcolema subaxonal en las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) de la serie de incremento de actividad en relación con los correspondientes parámetros de la serie control, muestra una sorprendente adaptación plástica estructural. Estos cambios, detallados en la Tabla XI, son los siguientes:

(1) Sobre una cantidad de sarcolema subaxonal (**longitud sarcolema**) igual a la serie control, se observa un incremento de la **amplitud de las crestas**.

(2) El aumento de las dimensiones de las crestas será el soporte del acusado desarrollo de la membrana densificada. En este sentido, la **longitud media de las densificaciones**, se incrementa en un 54% y su penetración hacia la profundidad de los pliegues secundarios (**Penetración de las densificaciones**) en un 154% ($P < 0.005$ en ambos casos). La gran profundidad que alcanza la membrana densificada hacia el interior de los pliegues puede ser debida, en parte, al predominio significativo en el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad de la morfología crestal del tipo IV (ver Tabla V). Esta morfología (IV) es menos convexa en su porción apical que las morfologías predominantes (II y III) en el sarcolema homólogo de la serie control (ver Figura 6).

Cabe señalar que la dirección de estos cambios en los sarcolemas subaxonales de las sinapsis A.A.S. es la misma que la descrita previamente en las sinapsis normales de la serie de incremento fisiológico de actividad, aunque en este caso los cambios son mucho más acusados.

Es interesante destacar en este momento, que la **ratio de la longitud de densificaciones pre-/post-** (parámetros indicativo del grado de equilibrio y correspondencia entre las membranas sinápticas que intervienen en la neurotransmisión) es estadísticamente constante ($P > 0.05$) en las sinapsis normales y ampliamente abandonadas de la serie control (ver Tabla IX) y en las sinapsis normales de la serie actividad (ver Tabla VII), modificándose sustancialmente en las sinapsis A.A.S. de la serie actividad que se está considerando (ver Tabla XI). En este sentido, es en las sinapsis A.A.S. en las que repercute más intensamente el incremento fisiológico de actividad o, alternativamente, son los contactos sinápticos con mayor capacidad de adaptación a esta nueva situación (I.F.A.).

(3) Con respecto a los organoides postsinápticos, esta repercusión y/o capacidad de adaptación también es manifiesta: como se ha comentado anteriormente, los parámetros referentes a mitocondrias y lisosomas aumentan sustancialmente, y además los pliegues subaxoniales presentan un incremento de vesículas *coated* asociadas (32%; **Número de vesículas *coated* por abertura**; Tabla XI).

VI.4.2.2.2. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis A.A.S.. Serie I.F.A.

Con respecto a la zona del sarcolema totalmente abandonada en las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad, los resultados obtenidos (Tabla XII) indican una evidente desdiferenciación de esta zona postsináptica, de una magnitud similar a la descrita para el sarcolema homólogo de la serie control (apartado VI.4.1.2.2. del capítulo de Resultados). Sin embargo y con respecto a los parámetros que cuantifican la membrana densificada, es evidente que el nivel global de desdiferenciación no es tan marcado como en

la serie control. Así, la **longitud media de las densificaciones** y la **penetración de las densificaciones** hacia el pliegue secundario presentan valores significativamente mayores ($P < 0.000$ en ambos casos) en la serie de incremento de actividad respecto a la serie control. Cabe destacar que los valores medios de estos dos parámetros están más próximos a los descritos para las diferentes situaciones subaxonales (sinapsis normales y sinapsis A.A.S.) que los observados en el sarcolema homólogo (abandonado de las sinapsis A.A.S.) de la serie control. Directamente relacionado con estas variaciones en los parámetros métricos de la membrana densificada en esta zona del sarcolema de la serie de incremento de actividad, está la variación de la **amplitud de las crestas** (un 20% superior que en la serie control) y, por consiguiente, también se altera la **ratio de amplitud de crestas/oberturas** (un 20% superior que en la serie control; $P < 0.000$ en ambos casos).

Esta relativa proximidad a la situación subaxonal de los valores de los parámetros referentes a la membrana densificada podría ser debida a la relativamente rápida transformación plástica actividad-dependiente de determinadas sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) en sinapsis con amplio abandono (A.A.S.). Ver capítulo de Discusión, apartados VII.5.2. y VII.6.2..

Tabla XII: Componente postsináptico subglial y abandonado. Sinapsis A.A.S.. Serie IFA.

C. POSTSINAPTICO SINAPSIS A.A.S.	SINAPSIS A.A.S. CTR		SINAPSIS A.A.S. ACT		COMP.	
	SUBGLIAL (1)	ABANDONADO (2)	SUBGLIAL (3)	ABANDONADO (4)	1/3	2/4
Longitud sarcolema (μm)	7.32 \pm 9.48	11.18 \pm 8.61	10.18 \pm 9.10 39.07% \uparrow	12.05 \pm 10.17 7.78% \uparrow	0.011 U	0.830 T
% sarcolema opuesto a...	22.89 \pm 20.50	30.04 \pm 20.07	25.60 \pm 17.25 11.84% \uparrow	29.43 \pm 16.97 2.03% \downarrow	0.577 T	0.861 T
Amplitud oberturas (nm)	86.48 \pm 26.86	88.52 \pm 32.88	71.19 \pm 28.82 17.60% \downarrow	79.68 \pm 20.48 9.99% \downarrow	0.068 U	0.095 T
Amplitud crestas (nm)	275.73 \pm 122.97	253.74 \pm 81.67	308.03 \pm 133.14 11.71% \uparrow	352.11 \pm 157.61 38.77% \uparrow	0.305 T	0.000 T
Ratio amplitud cresta/obertura	3.42 \pm 1.63	3.19 \pm 1.53	4.58 \pm 1.97 33.92% \uparrow	4.68 \pm 2.38 46.71% \uparrow	0.009 T	0.000 T
% del pliegue primario ocupado por crestas	74.20 \pm 38.94	57.79 \pm 20.34	70.09 \pm 32.13 5.53% \downarrow	60.96 \pm 22.99 5.48% \uparrow	0.654 T	0.427 T
Longitud pliegue secundario (nm)	505.18 \pm 218.11	548.65 \pm 260.55	592.80 \pm 239.21 17.34% \uparrow	589.89 \pm 232.16 7.52% \uparrow	0.115 T	0.369 T
Número de secciones por abertura	1.82 \pm 0.80	2.61 \pm 1.65	2.37 \pm 1.26 30.22% \uparrow	2.92 \pm 1.90 11.87% \uparrow	0.025 T	0.403 U
Penetración densificaciones (nm)	45.88 \pm 26.54	42.36 \pm 36.28	113.09 \pm 97.77 146.00% \uparrow	91.76 \pm 65.33 116.62% \uparrow	0.000 T	0.000 U
% crestas densificadas	58.21 \pm 15.57	62.22 \pm 18.13	60.00 \pm 18.39 3.07% \uparrow	57.56 \pm 16.49 7.49% \downarrow	0.664 T	0.175 T
Longitud media densificaciones (nm)	330.62 \pm 266.90	242.06 \pm 129.08	451.98 \pm 250.37 36.70% \uparrow	442.89 \pm 253.30 82.96% \uparrow	0.070 T	0.000 T
Número V. coated por abertura	0.59 \pm 0.42	0.70 \pm 0.45	0.58 \pm 0.52 1.69% \downarrow	0.40 \pm 0.41 42.85% \downarrow	0.350 T	0.012 T

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test.

% \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.

N= 57 sinapsis A.A.S. en la serie control; N= 88 sinapsis A.A.S. en la serie IFA.

VI.4.2.2.3. Componente postsináptico subglial. Sinapsis A.A.S.. Serie I.F.A..

Con respecto a la zona de sarcolema cubierto por la célula glial en la serie de incremento de actividad, se observa (Tabla XII) una situación semejante, en términos generales, a la descrita en el apartado anterior y en relación al sarcolema abandonado de las formas A.A.S.. Por ejemplo, la **penetración de las densificaciones** es mayor a la observada en el sarcolema homólogo de la serie control ($P < 0.000$).

El hecho de que no varíe significativamente la **longitud media de las densificaciones** puede derivar de que no varia la **amplitud de las crestas**, aunque la **ratio de amplitudes cresta/obertura** incrementa significativamente ($P < 0.05$) con respecto a los valores de este parámetro en la serie control.

En relación a la mayor parte de los restantes parámetros, sólo cabe señalar que el comportamiento global de estos es similar al descrito para la serie control (ver apartado VI.4.1.2.3. del capítulo de Resultados), ya que se observan muy pocas diferencias significativas (Tabla XII).

VI.5. ESTUDIO DE LAS SINAPSIS MINIMAMENTE ABANDONADAS.

(M.A.S.).

En el presente trabajo, las sinapsis neuromusculares descritas convencionalmente como "parcialmente abandonadas" (ver por ejemplo, Wernig y Herrera, 1986) se han clasificado en función del grado de abandono (ver capítulo de Material y Métodos) en: sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) y sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.). En el presente trabajo se ha incluido el estudio de estas últimas ya que podría revelar alguna característica morfológica o morfométrica que contribuya al conocimiento de los posibles mecanismos que intervienen en el fenómeno del abandono sináptico en el adulto normal. Por otro lado, esta forma de unión mioneural no ha estado contemplada por otros autores hasta el momento. Los trabajos que incluyen sinapsis parcialmente abandonadas por el axón en sus resultados hacen referencia a sinapsis con abandono evidente. (Estas sinapsis con abandono evidente han sido estudiadas, en el presente trabajo, en el apartado de sinapsis ampliamente abandonadas - A.A.S.-).

Tabla XIII: Componente presináptico. Sinapsis M.A. Serie control

C.PRESINÁPTICO. SINAPSIS M.A.S.	AXON NORMAL (1)	AXON M.A.S.* (2)	AXON A.A.S.** (3)	COMPARACIONES		
				1/2	1/3	2/3
Area (μm^2)	3.18 \pm 2.15	1.79 \pm 9.89 43.47% ↓	1.98 \pm 1.94 10.68% ↑	0.000 T	0.000 U	0.400 U
Perímetro (μm)	7.64 \pm 3.34	5.46 \pm 1.74 28.57% ↓	5.92 \pm 3.84 8.50% ↑	0.000 T	0.000 U	0.630 U
% de axolema sináptico	58.47 \pm 11.37	51.89 \pm 8.87 11.10% ↓	47.87 \pm 10.54 7.75% ↓	0.000 T	0.000 T	0.035 T
% de axolema glial	36.83 \pm 8.85	40.89 \pm 8.27 11.02% ↑	44.66 \pm 11.25 9.21% ↑	0.017 T	0.000 T	0.052 T
% de axolema libre	7.18 \pm 6.49	8.04 \pm 6.35 11.91% ↑	8.56 \pm 8.17 6.46% ↑	0.300 T	0.400 T	0.700 T
Ratio área pre-/área post-	2.23 \pm 1.81	2.49 \pm 1.20 11.66% ↑	3.08 \pm 2.65 23.69% ↑	0.022 U	0.008 U	0.600 U
Ratio perímetro / área ($\mu\text{m} / \mu\text{m}^2$)	2.84 \pm 0.99	3.55 \pm 1.15 24.83% ↑	3.90 \pm 1.62 9.89% ↑	0.001 T	0.000 T	0.100 T
Numero V.S. / μm^2	44.45 \pm 28.30	51.41 \pm 24.94 15.66% ↑	41.24 \pm 22.93 19.78% ↓	0.176 T	0.502 T	0.031 T
Diámetro medio de V.S. (nm)	45.99 \pm 4.79	49.73 \pm 4.76 8.14% ↑	49.38 \pm 6.75 0.70% ↓	0.000 T	0.004 T	0.760 T
% axoplasma ocupado por V.S.	2.48 \pm 1.76	3.27 \pm 1.55 31.85% ↑	2.53 \pm 1.56 22.63% ↓	0.014 T	0.862 T	0.015 T
Número de V.S. por μm de axolema sináptico	2.12 \pm 0.86	2.82 \pm 1.28 33.24% ↑	2.64 \pm 1.23 6.19% ↓	0.002 T	0.011 T	0.400 T
Número de V. coated / μm^2	2.66 \pm 2.57	3.83 \pm 2.80 43.98% ↑	3.09 \pm 2.41 19.32% ↓	0.006 U	0.070 U	0.100 U
Número de V. core / μm^2	2.21 \pm 1.51	2.98 \pm 2.40 34.84% ↑	5.63 \pm 4.45 88.92% ↑	0.063 T	0.000 T	0.000 T
Número de lisosomas / μm^2	2.25 \pm 1.56	2.82 \pm 2.07 25.33% ↑	3.66 \pm 2.78 29.78% ↑	0.133 T	0.002 T	0.090 T
% de axoplasma ocupado por mitocondrias	12.14 \pm 7.52	11.26 \pm 5.86 7.25% ↓	13.07 \pm 6.41 16.07% ↑	0.520 T	0.526 T	0.100 T
Número de cisternas del R.E.L. / μm^2	1.45 \pm 0.93	2.10 \pm 1.09 44.85% ↑	2.23 \pm 1.57 6.19% ↑	0.003 T	0.006 T	0.500 T
Número de Z.A. por sección	2.17 \pm 2.21	3.35 \pm 2.14 54.38% ↑	2.95 \pm 2.06 11.94% ↓	0.001 U	0.108 U	0.200 U
Longitud media de las Z.A. (nm)	92.41 \pm 36.83	110.73 \pm 42.50 19.82% ↑	85.64 \pm 31.30 22.66% ↓	0.053 T	0.387 T	0.004 T
% de Z.A. eucaradas	81.50 \pm 25.77	78.45 \pm 24.71 3.74% ↓	75.26 \pm 25.20 4.07% ↓	0.543 U	0.298 U	0.600 U
% del perímetro ocupado por Z.A.	3.16 \pm 4.06	7.24 \pm 5.25 128.76% ↑	4.53 \pm 3.26 37.38% ↓	0.000 U	0.001 U	0.040 U
% del axolema sináptico ocupado por Z.A.	5.77 \pm 8.30	14.48 \pm 11.24 150.95% ↑	10.21 \pm 8.07 29.49% ↓	0.000 U	0.000 U	0.059 T
Número de Z.A. por μm de axolema	0.30 \pm 0.25	0.60 \pm 0.31 99.11% ↑	0.51 \pm 0.30 13.45% ↓	0.000 U	0.000 U	0.200 T
Separación axón-postsináptico (nm)	43.95 \pm 6.51	50.43 \pm 10.07 14.74% ↑	45.24 \pm 9.75 10.20% ↓	0.000 T	0.406 T	0.008 T
Separación glía-postsináptico (nm)	64.73 \pm 12.72	89.98 \pm 33.44 39.00% ↑	67.23 \pm 22.56 25.28% ↑	0.004 T	0.650 T	0.010 T

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S. y 50 de M.A.S.
 T: t-test; U: U-test. % ↓ y % ↑ en negrilla hace referencia al % de decremento o incremento de los valores de los parámetros de: (*) la sinapsis M.A.S. respecto a las sinapsis normales y (**) de las sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis M.A.S.

VI.5.1. SERIE CONTROL.

Para estudiar cómo se comportan las sinapsis de la serie control en función del grado de abandono, se han comparado las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) con las sinapsis normales (N.S.) y, así mismo, con las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.).

VI.5.1.1. COMPONENTE PRESINÁPTICO. SINAPSIS M.A.S.. SERIE CONTROL.

Globalmente, los parámetros de arquitectura del axón de las sinapsis M.A.S. revelan la existencia de un componente presináptico similar al descrito previamente para las formas de amplio abandono (A.A.S., Tabla XIII). Así por ejemplo el **área del axón**, **perímetro**, **% de axolema glial**, **ratio perímetro/ área del axón** (anfractuosidad) y la **ratio entre áreas pre-/postsináptica** adoptan valores en las sinapsis M.A.S. que no presentan diferencias significativas con los valores de estos parámetros en los axones de las sinapsis A.A.S. ($P > 0.05$). Además, en estos parámetros de las sinapsis M.A.S., se observan a la vez diferencias significativas con los de los axones en las sinapsis normales ($P < 0.05$, Tabla XIII).

En cuanto a las vesículas sinápticas, se pueden observar ciertos parámetros de los axones de las sinapsis M.A.S. que adoptan valores iguales ($P > 0.05$) a los de las sinapsis A.A.S. y diferentes ($P < 0.05$) a los observados en los axones de las sinapsis normales. Así por ejemplo, tanto el **diámetro de las V.S.** (vesículas sinápticas) como el **número de V.S. que están en contacto con el axolema sináptico** (**Número de V.S. por μm de axolema sináptico**), siguen esta tendencia de adoptar valores iguales a los de las sinapsis A.A.S. y diferentes a los observados para estos parámetros en las sinapsis normales.

Parte de los parámetros estudiados en las sinapsis M.A.S. referentes a las zonas activas **(Número de Z.A. por sección, % de axolema sináptico ocupado por Z.A. y número de Z.A. por μm de axolema)** presentan también una marcada similitud ($P > 0.05$) con el valor de estos parámetros en las sinapsis A.A.S. (Tabla XIII). (El valor de estos parámetros son además diferentes ($P < 0.05$) de los observados en los axones de las sinapsis normales).

Algunos parámetros referentes a los organoides axonales, como son la densidad de vesículas *coated* **(Número de vesículas *coated* / μm^2)** y la densidad de cisternas del R.E.L. **(Número de cisternas del R.E.L./ μm^2)**, también adoptan en las sinapsis M.A.S. valores iguales ($P > 0.05$) a los observados en los axones de las sinapsis A.A.S. y diferentes ($P < 0.05$) a los valores de estos parámetros en las sinapsis normales (Tabla XIII).

Por otro lado, unos pocos parámetros de las sinapsis M.A.S. adoptan valores que son iguales ($P > 0.05$) a los observados en las sinapsis normales y diferentes ($P < 0.05$) a los valores de estos parámetros en las sinapsis A.A.S.. En la Tabla XIII sólo se observan tres parámetros que siguen esta tónica: densidad de vesículas sinápticas **(Número de V.S./ μm^2)**, densidad de vesículas *core* **(Número de vesículas *core*/ μm^2)** y la longitud media de las Z.A (zonas activas).

Un reducido grupo de parámetros de las sinapsis M.A.S. no presenta ninguna similitud con los observados en las sinapsis A.A.S ($P < 0.05$) ni con los observados en las sinapsis normales ($P < 0.05$). La mayoría de estos parámetros son aparentemente característicos de las formas de mínimo abandono ya que adoptan el valor máximo de la serie control. De entre estos parámetros se observa una máxima separación del componente postsináptico con respecto al axón y a la célula glial **(Separación axón-postsináptico y separación glía-postsináptico**

respectivamente). También son característicos de las formas M.A.S. los elevados valores de algunos parámetros de la maquinaria de la neurotransmisión, como por ejemplo, el % de axoplasma ocupado por V.S. (vesículas sinápticas) y el % de perímetro axonal ocupado por Z.A. (zonas activas; Tabla XIII). De estos parámetros de las sinapsis M.A.S. que adoptan valores significativamente diferentes tanto de los axones normales como de los axones de las sinapsis A.A.S., cabe señalar que el % de axolema sináptico no adopta el valor máximo de la serie control, sino que el valor de este parámetro en las sinapsis M.A.S. es intermedio entre el observado para las sinapsis normales y A.A.S. (ver Tabla XIII).

Otro grupo de parámetros adoptan valores similares tanto a los del axón de las sinapsis normales ($P > 0.05$) como a los del axón de las sinapsis A.A.S. ($P > 0.05$). Tal es el caso de la densidad de lisosomas (Número de lisosomas/ μm^2), % de axolema libre, % de axoplasma ocupado por mitocondrias y el % de Z.A. que están encaradas con las oberturas postsinápticas. Estos tres últimos parámetros son, además, estables en toda la población control al no variar significativamente en ninguna de las comparaciones que se muestran en la Tabla XIII.

En el apartado anterior, se comentó que el axón de las sinapsis A.A.S. mostraba un incremento de diferenciación de la maquinaria de la neurotransmisión respecto al axón de las sinapsis normales. El axón de las sinapsis M.A.S. presenta una maquinaria de la neurotransmisión que, en muchos aspectos, es tan diferenciada como en los axones de las sinapsis A.A.S., incluso el valor de algunos parámetros indica una diferenciación puntualmente mayor.

En resumen, (1) la mayor parte de los parámetros de los axones que inervan las sinapsis con abandono mínimo (M.A.S.) son, en muchos aspectos, cuantitativamente similares a los de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.); (2) globalmente, el resto de parámetros adoptan valores intermedios entre las sinapsis normales y las sinapsis A.A.S..

Tabla XIV: Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S. Serie control.

C.POSTSINAPTICO SINAPSIS M.A.S.	SUBAXONAL NORMAL (1)	SUBAXONAL* M.A.S. (2)	SUBAXONAL** A.A.S. (3)	COMPARACIONES		
				1/2	1/3	2/3
Longitud sarcolema (μm)	37.43 \pm 16.66	24.43 \pm 9.83 34.71% \downarrow	23.94 \pm 14.58 1.82% \downarrow	0.000 T	0.000 T	0.800 T
Longitud sarcolema total	37.43 \pm 16.66	27.53 \pm 10.86 26.45% \downarrow	37.03 \pm 16.46 34.51% \uparrow	0.000 T	0.898 T	0.010 T
% sarcolema opuesto a...	100.00 \pm 0.00	88.55 \pm 8.18 11.45% \downarrow	63.49 \pm 19.04 28.26% \downarrow	-	-	0.000 T
Amplitud oberturas (nm)	77.50 \pm 21.62	72.21 \pm 18.94 6.82% \downarrow	69.18 \pm 20.75 4.19% \downarrow	0.177 T	0.037 T	0.400 T
Amplitud cristas (nm)	320.45 \pm 128.31	256.00 \pm 85.29 20.11% \downarrow	274.89 \pm 105.32 7.38% \uparrow	0.001 U	0.039 U	0.300 T
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 \pm 1.56	3.69 \pm 1.27 13.17% \downarrow	4.14 \pm 1.54 12.19% \uparrow	0.041 T	0.691 T	0.100 T
% del pliegue primario ocupado por crestas	76.07 \pm 17.56	79.95 \pm 14.24 5.10% \uparrow	79.71 \pm 19.65 0.30% \downarrow	0.206 T	0.295 T	0.900 T
Longitud pliegue secundario (nm)	613.67 \pm 157.95	607.28 \pm 129.15 1.04% \downarrow	602.08 \pm 140.46 0.85% \downarrow	0.677 T	0.817 T	0.800 T
Número de secciones por obertura	3.27 \pm 1.59	2.96 \pm 2.11 9.48% \downarrow	3.29 \pm 5.06 11.15% \uparrow	0.136 U	0.051 U	0.100 U
Número de secciones por obertura totales	3.27 \pm 1.59	2.67 \pm 1.14 18.35% \downarrow	2.77 \pm 2.03 3.74% \uparrow	0.043 U	0.008 U	0.400 U
Penetración densificaciones (nm)	77.67 \pm 37.30	75.69 \pm 40.17 2.55% \downarrow	60.06 \pm 31.63 20.65% \downarrow	0.792 T	0.008 T	0.030 T
% crestas densificadas	91.81 \pm 12.82	93.94 \pm 9.31 2.32% \uparrow	95.93 \pm 11.55 2.12% \uparrow	0.543 U	0.013 U	0.052 U
Longitud media densificaciones (nm)	337.82 \pm 137.03	318.49 \pm 117.35 5.72% \downarrow	285.72 \pm 113.88 9.97% \downarrow	0.429 T	0.028 T	0.100 T
Ratio longitud densificaciones pre-/post-	0.10 \pm 0.15	0.17 \pm 0.14 70.00% \uparrow	0.10 \pm 0.09 41.70% \downarrow	0.013 U	0.900 T	0.015 T
Número V. coated por obertura	0.22 \pm 0.13	0.36 \pm 0.28 63.00% \uparrow	0.34 \pm 0.22 5.50% \downarrow	0.005 T	0.030 T	0.060 T
Número de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.44 \pm 1.67	1.88 \pm 1.76 30.55% \uparrow	1.99 \pm 1.85 5.85% \uparrow	0.075 U	0.071 U	0.900 U
Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico	4.00 \pm 4.31	3.15 \pm 2.24 21.25% \downarrow	4.68 \pm 5.02 48.57% \uparrow	0.261 U	0.214 U	0.040 U

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S. y 50 sinapsis M.A.S.

T: t-test; U: U-test. % \downarrow y % \uparrow en negrilla hace referencia al % de decremento o incremento de los valores de los parámetros de: (*) la sinapsis M.A.S. respecto a las sinapsis normales y (**) de las sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis M.A.S..

Tabla XV: Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S.. Serie control.

C. POSTSINÁPTICO SINAPSIS M.A.S.	SUBAXONAL NORMAL (1)	SUBGLIAL* M.A.S. (2)	SUBGLIAL** A.A.S. (3)	COMPARACIONES		
				1/2	1/3	2/3
Longitud sarcolema (µm)	37.43 ± 16.66	2.47 ± 1.75 93.40% ↓	17.73 ± 9.48 196.71% ↑	0.000 T	0.000 T	0.030 U
% sarcolema opuesto a...	100.00 ± 0.00	9.46 ± 4.91 90.54% ↓	22.89 ± 20.50 141.96% ↑	0.000 T	0.000 T	0.005 T
Amplitud oberturas (nm)	77.50 ± 21.62	84.21 ± 30.18 8.66% ↑	86.48 ± 26.86 2.69% ↑	0.378 T	0.154 T	0.700 T
Amplitud crestas (nm)	320.45 ± 128.31	260.26 ± 133.87 18.78% ↓	275.73 ± 122.97 5.49% ↑	0.096 U	0.213 U	0.700 T
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 ± 1.56	3.32 ± 1.96 21.88% ↓	3.42 ± 1.63 3.01% ↑	0.076 T	0.039 T	0.800 T
% del pliegue primario ocupado por crestas	76.07 ± 17.56	84.29 ± 58.75 10.80% ↑	74.20 ± 38.94 11.97% ↓	0.588 T	0.823 T	0.500 T
Longitud pliegue secundario (nm)	613.67 ± 157.95	545.90 ± 241.25 11.04% ↓	505.18 ± 218.11 7.46% ↓	0.263 T	0.031 T	0.500 T
Número de secciones por abertura	3.27 ± 1.59	1.72 ± 1.13 47.40% ↓	1.82 ± 0.80 5.81% ↑	0.000 U	0.000 T	0.200 U
Penetración densificaciones (nm)	77.67 ± 37.30	98.17 ± 66.44 26.39% ↑	45.88 ± 26.54 53.26% ↓	0.267 T	0.000 T	0.010 T
% crestas densificadas	91.81 ± 12.82	50.00 ± 0.00 45.54% ↓	58.21 ± 15.57 16.14% ↑	0.000 U	0.000 U	-
Longitud media densificaciones (nm)	337.82 ± 137.03	321.30 ± 146.52 4.89% ↓	330.62 ± 266.90 2.9% ↑	0.697 T	0.901 T	0.800 T
Número V. coated por abertura	0.22 ± 0.13	1.15 ± 0.11 422.73% ↑	0.49 ± 0.42 48.70% ↓	0.000 U	0.020 U	0.000 T

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S. y 50 sinapsis M.A.S.

T: t-test; U: U-test. % ↓ y % ↑ en negrilla hace referencia al % de decremento o incremento de los valores de los parámetros de: (*) la sinapsis M.A.S. respecto a las sinapsis normales y (**) de las sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis M.A.S..

VI.5.1.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO. SINAPSIS M.A.S.. SERIE CONTROL.

VI.5.1.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S.. Serie control.

Los parámetros de arquitectura postsináptica subaxonal en las sinapsis M.A.S. adoptan valores similares a los observados en la misma localización de las sinapsis A.A.S. (Tabla XIV).

Es de destacar que los valores en las sinapsis M.A.S. de los parámetros **amplitud de las crestas** y *ratio* entre amplitud de cresta y amplitud de obertura (*ratio* **amplitud cresta/obertura**), son similares a los descritos para las sinapsis A.A.S. (crestas más estrechas y *ratio* alterada con oberturas mayores, Tabla XIV). La **amplitud media de las oberturas** es igual a la amplitud media de las oberturas subaxonal tanto en las sinapsis A.A.S. como en las normales ($P > 0.1$ en los dos casos, Tabla XIV), y el valor medio de este parámetro es intermedio entre el de las sinapsis normales y el de las sinapsis A.A.S. El **% de pliegue primario ocupado por crestas** es constante en cualquier situación subaxonal en la serie control ($P > 0.2$ en todos los casos). Otro tanto sucede con la **longitud media del pliegue secundario** y el **número de secciones por obertura**. Por lo tanto, en situación subaxonal, siempre se observa el mismo grado de tortuosidad en el recorrido de los pliegues secundarios y estos tienen una longitud invariable.

En cuanto a la membrana densificada del sarcolema subaxonal en las sinapsis M.A.S., pese a formar parte de unas crestas más estrechas que las de sinapsis normales, la profundidad media de penetración por el pliegue secundario (**penetración de las densificaciones**) no se modifica respecto al valor de este parámetro en las sinapsis normales y además es **significativamente diferente del observado en las sinapsis A.A.S.** (Tabla IX). Sin embargo,

la longitud media de las densificaciones y el % de crestas densificadas adoptan valores intermedios entre las sinapsis normales ($P > 0.1$ en los dos casos) y las sinapsis A.A.S. ($P > 0.05$ en los dos casos). Respecto de las sinapsis normales, el importante incremento observado en las sinapsis M.A.S. (del 70%) de la *ratio* entre las longitudes de membrana densificada pre- y postsináptica (***Ratio* longitud densificaciones pre-/post-**) indica que, como sucedía en las formas A.A.S., existe un importante aumento en la longitud total de zonas activas con un mínimo decremento en la longitud total de las densificaciones postsinápticas (Tabla XIV).

En cuanto a las organelas del sarcoplasma en las formas M.A.S., las vesículas *coated* (Número de vesículas *coated* por obertura) están dentro del rango observado en las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.), valor totalmente diferente al observado en las sinapsis normales ($P < 0.05$). Sin embargo, la densidad de lisosomas (Número de lisosomas por μm^2 de postsináptico) es igual al observado en las sinapsis normales ($P > 0.2$) y diferente al de las sinapsis A.A.S. ($P < 0.05$). La densidad de mitocondrias (Número de mitocondrias por μm^2 de postsináptico) es constante en todos los sarcoplasmas de la serie control (Tabla XIV; $P > 0.05$ en todos los casos).

En resumen, la porción subaxonal del sarcolema de las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) presenta características intermedias o híbridas entre los sarcolemas homólogos de las sinapsis A.A.S. y las sinapsis normales. Esta característica se puede evidenciar de dos formas: (1) Sarcolema con características intermedias ya que ciertos parámetros adoptan valores intermedios (por ejemplo % de crestas densificadas) (2) Sarcolema con características híbridas ya que cierto número de parámetros de las formas M.A.S. adoptan

valores iguales únicamente a los de las sinapsis normales y otro grupo de parámetros adopta valores iguales únicamente a los de las sinapsis A.A.S..

VI.5.1.2.2. Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S.. Serie control.

En las sinapsis M.A.S. que se vienen considerando, los pliegues cubiertos por la célula glial (Tabla XV) únicamente presentan similitud con los parámetros observados en las sinapsis normales ($P > 0.05$) la profundidad media de las densificaciones al penetrar por el pliegue secundario (**Penetración densificaciones**). Y sólo el **número de secciones por obertura** (tortuosidad) y el **% de crestas densificadas** adoptan los valores característicos del amplio abandono (A.A.S.). Es de destacar que el **número de vesículas coated por obertura** es, en las formas M.A.S, el mayor de los observados en de las tres zonas de sarcolema consideradas (Tabla XV).

Con respecto al resto de parámetros, los valores que se observan en este sarcolema son iguales a los observados en las sinapsis normales y en las sinapsis A.A.S.. Pese a no haber diferencias significativas, los valores medios observados en el sarcolema de las sinapsis M.A.S. en situación subglial (Tabla XV), adoptan valores intermedios entre las sinapsis normales y las sinapsis A.A.S.. Siguen esta tónica la **amplitud de las oberturas** y la **longitud del pliegue secundario**. Sin embargo, la **amplitud de las crestas subgliales** y el **% de crestas densificadas** en situación subglial adoptan los valores mínimos de las tres zonas de sarcolema consideradas (sinapsis normales, M.A.S. y A.A.S.), y por tanto sucede lo mismo con la **ratio** entre amplitud de crestas y amplitud de oberturas (**Ratio amplitudes cresta/obertura**).

En resumen, cabe destacar el importante mantenimiento de la diferenciación postsináptica bajo la célula glial de las sinapsis M.A.S respecto al sarcolema de las sinapsis normales.

VI.5.1.2.3. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S.. Serie control.

En el sarcolema abandonado por el axón y por la célula glial de las sinapsis M.A.S., únicamente la **penetración de las densificaciones** por los pliegues secundarios es igual ($P > 0.05$) a la observada (Tabla XVI) en el sarcolema de las sinapsis normales (similar a lo descrito anteriormente en la situación subglial).

El resto de parámetros denotan una arquitectura tanto o más desdiferenciada que la observada (Tabla XVI) en el sarcolema sin oposición (abandonado) en las formas A.A.S.. En este sentido, se observa una **amplitud de oberturas y longitud de pliegue secundario** iguales a los descritos en el sarcolema A.A.S. sin oposición. Sin embargo, la **amplitud de las crestas, el % de pliegue primario ocupado por crestas** así como la *ratio* entre amplitud de las crestas y amplitud de las oberturas (***Ratio* amplitud cresta/obertura**) son significativamente menores que en la situación de amplio abandono (A.A.S.). Por otra parte, sobre crestas más estrechas, que contribuyen menos a configurar el pliegue primario, la **longitud media de las densificaciones** es igual ($P > 0.05$) a la de las formas de mayor abandono (A.A.S.). Además, contribuye a esta pérdida de diferenciación de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión, un **% de crestas densificadas** significativamente menor que en la membrana abandonada de las formas A.A.S.. El recorrido de los pliegues secundarios también es el más simple de los tres sarcolemas estudiados, como se ve reflejado en un mínimo

número de secciones por obertura (Tabla XVI).

A estos pliegues abandonados de las sinapsis M.A.S. se asocia un importante número de vesículas *coated* (**Número de vesículas *coated* por obertura**), incluso superior ($P < 0.05$) al observado en el sarcolema homólogo de las sinapsis A.A.S. (Tabla XVI).

Globalmente, en las formas de mínimo abandono (M.A.S.) los pliegues que no están cubiertos ni por el axón ni por la célula glial aparecen notablemente desdiferenciados, incluso hay una marcada tendencia a superar el nivel de desdiferenciación descrito para esta zona de la membrana postsináptica en las formas de amplio abandono (A.A.S.).

Tabla XVI: Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S. Serie control.

C. POSTSINÁPTICO SINAPSIS M.A.S.	SUBAXONAL NORMAL (1)	ABANDONADO* M.A.S. (2)	ABANDONADO** A.A.S. (3)	COMPARACIONES		
				1/2	1/3	2/3
Longitud sarcolema (μm)	37.43 \pm 16.66	2.89 \pm 3.11 92.30% \downarrow	11.18 \pm 8.61 286.97% \uparrow	0.000 T	0.000 T	0.000 U
% sarcolema opuesto a...	100.00 \pm 0.00	10.56 \pm 7.92 89.44% \downarrow	30.04 \pm 20.07 184.46% \uparrow	0.000 T	0.000 T	0.000 T
Amplitud oberturas (nm)	77.50 \pm 21.62	101.00 \pm 37.65 30.32% \uparrow	88.52 \pm 32.88 12.35% \downarrow	0.001 T	0.045 T	0.100 T
Amplitud crestas (nm)	320.45 \pm 128.31	192.05 \pm 113.87 40.07% \downarrow	253.74 \pm 81.67 32.12% \uparrow	0.000 U	0.008 U	0.007 T
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 \pm 1.56	2.19 \pm 1.93 48.47% \downarrow	3.19 \pm 1.53 45.60% \uparrow	0.000 T	0.000 T	0.011 T
% del pliegue primario ocupado por crestas	76.07 \pm 17.56	47.07 \pm 18.27 38.12% \downarrow	57.79 \pm 20.34 22.77% \uparrow	0.000 T	0.000 T	0.011 T
Longitud pliegue secundario (nm)	613.67 \pm 157.95	462.95 \pm 219.72 24.56% \downarrow	548.65 \pm 260.55 18.51% \uparrow	0.000 T	0.012 T	0.090 T
Numero de secciones por abertura	3.27 \pm 1.59	2.01 \pm 1.69 38.53% \downarrow	2.61 \pm 1.65 29.85% \uparrow	0.000 T	0.000 T	0.000 U
Penetración densificaciones (nm)	77.67 \pm 37.30	94.50 \pm 76.23 21.67% \uparrow	42.36 \pm 36.28 55.17% \downarrow	0.300 T	0.000 U	0.000 U
% crestas densificadas	91.81 \pm 12.82	53.45 \pm 12.10 41.78% \downarrow	62.22 \pm 18.13 16.41% \uparrow	0.000 U	0.000 U	0.011 U
Longitud media densificaciones (nm)	337.82 \pm 137.03	226.45 \pm 141.40 21.69% \downarrow	242.06 \pm 129.08 8.49% \downarrow	0.050 T	0.000 T	0.500 T
Numero V. coated por abertura	0.22 \pm 0.13	1.15 \pm 0.45 468.18% \uparrow	0.70 \pm 0.75 44.00% \downarrow	0.000 U	0.050 T	0.076 T

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S. y 50 sinapsis M.A.S.

T: t-test; U: U-test. % \downarrow y % \uparrow en negrilla hace referencia al % de decremento o incremento de los valores de los parámetros de: (*) las sinapsis M.A.S. respecto a las sinapsis normales y (**) de las sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis M.A.S..

Tabla XVII: Componente presináptico. Sinapsis M.A.S.. Serie IFA.

C.PRESINAPTICO SINAPSIS M.A.S.	AXON CTR	AXON IFA	COMP.
Perímetro (μm)	5.46 \pm 1.74	7.80 \pm 4.47 42.28% \uparrow	T 0.002
% de axolema sináptico	51.89 \pm 8.87	55.14 \pm 11.01 6.26% \uparrow	T 0.125
% de axolema glial	40.89 \pm 8.27	38.91 \pm 10.30 4.84% \downarrow	T 0.316
% de axolema libre	8.04 \pm 6.35	6.09 \pm 5.91 24.25% \downarrow	T 0.132
Ratio área pre-/área postsináptica	2.49 \pm 1.20	2.37 \pm 1.49 4.82% \downarrow	T 0.677
Ratio perímetro / área ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	3.55 \pm 1.15	3.04 \pm 1.26 14.36% \downarrow	T 0.048
Número V.S. / μm^2	51.41 \pm 24.94	36.75 \pm 18.14 28.51% \downarrow	T 0.002
Diámetro V.S. (nm)	49.73 \pm 4.76	48.93 \pm 4.20 1.60% \downarrow	T 0.390
% axoplasma ocupado por V.S.	3.27 \pm 1.55	2.23 \pm 1.12 31.80% \downarrow	T 0.000
Número de V.S. por μm de axolema sináptico	2.82 \pm 1.28	3.12 \pm 1.84 10.63% \uparrow	T 0.384
Número de vesículas coated / μm^2	3.83 \pm 2.80	3.02 \pm 3.86 21.14% \downarrow	U 0.025
Número de vesículas core / μm^2	2.98 \pm 2.40	2.29 \pm 2.78 23.15% \downarrow	U 0.038
Número de lisosomas / μm^2	2.82 \pm 2.07	2.17 \pm 1.81 23.04% \downarrow	T 0.128
% de axoplasma ocupado por mitocondrias	11.26 \pm 5.86	17.42 \pm 8.18 54.70% \uparrow	T 0.000
Número de cisternas del R.E.L. / μm^2	2.10 \pm 1.09	1.73 \pm 1.18 17.61% \downarrow	T 0.146
Número de Z.A. por sección	3.35 \pm 2.14	3.19 \pm 2.76 4.77% \downarrow	T 0.746
Longitud media de las Z.A. (nm)	110.73 \pm 42.50	64.20 \pm 21.54 42.02% \downarrow	T 0.000
% de Z.A. encaradas	78.45 \pm 24.71	63.53 \pm 26.65 19.02% \downarrow	U 0.038
% del perímetro ocupado por Z.A.	7.24 \pm 5.25	2.70 \pm 2.10 62.70% \downarrow	T 0.000
% del axolema sináptico ocupado por Z.A.	14.48 \pm 11.24	4.87 \pm 3.69 66.36% \downarrow	T 0.000
Número de Z.A. por μm de axolema	0.59 \pm 0.31	0.42 \pm 0.31 28.81% \downarrow	T 0.032
Separación axón-postsináptico (nm)	50.43 \pm 10.07	41.33 \pm 6.00 18.04% \downarrow	T 0.000
Separación célula glial-postsináptico (nm)	89.98 \pm 33.44	79.32 \pm 35.66 11.84% \downarrow	T 0.379

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test.
 % \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.
 N= 50 sinapsis M.A.S en la serie control; N= 43 sinapsis M.A.S. en la serie IFA.

VI.5.2. SERIE DE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD (I.F.A.).

VI.5.2.1. COMPONENTE PRESINÁPTICO. SINAPSIS M.A.S.. SERIE I.F.A..

Como se ha comentado anteriormente (ver Tabla II), en la serie de incremento de actividad, se observa una disminución del % de sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) acompañado de un mantenimiento del porcentaje de sinapsis normales (N.S.) y de sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.), así como un incremento del % de áreas sinápticas totalmente abandonadas (T.A.S.). Curiosamente, las características ultraestructurales de los axones que inervan las sinapsis M.A.S. en la serie de incremento de actividad, son muy diferentes de la estructura de los axones en las sinapsis M.A.S. de la serie control (ver Tabla XVII), ya que no muestran las diferenciaciones en las estructuras de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión, que en la serie control caracterizaba a los axones de las sinapsis M.A.S. (ver Tabla XIII).

En la serie de incremento de actividad, los axones de las sinapsis M.A.S. son mayores que en la serie control (Área y Perímetro mayores; $P < 0.005$ en los dos casos, Tabla XVII) y menos anfractuosos (*Ratio* perímetro/área, $P < 0.05$), pero no varía la proporción de los diferentes axolemas (% de axolema sináptico, % de axolema glial y % de axolema libre; $P > 0.1$ en los tres casos, ver Tabla XVII) y se mantiene la relación entre áreas pre- y postsináptica (*Ratio* área pre-área postsináptica; $P > 0.5$).

En cuanto a la dotación de vesículas sinápticas, los axones de las sinapsis M.A.S. en la serie de incremento de actividad presentan, en relación a la serie control, una menor densidad de V.S. (Número de V.S. / μ^2 ; $P < 0.005$, Tabla XVII) y también una menor

ocupación del axoplasma por V.S. (**% de axoplasma por V.S.**; $P < 0.000$, Tabla XVII). Sin embargo, respecto a las sinapsis M.A.S. de la serie control, no se modifican ni el **diámetro de las V.S.**, ni la proporción de vesículas sinápticas en contacto con el axolema "sináptico" (**Número de V.S. por μm de axolema sináptico**; $P < 0.1$ en los dos casos, Tabla XVII).

La casi totalidad de parámetros referentes a las zonas activas de los axones M.A.S. en la serie de incremento de actividad adoptan valores significativamente ($P < 0.05$) menores que sus homólogos en la serie control (Tabla XVII). Estos resultados referentes a las vesículas sinápticas y a las zonas activas indican que en la serie de incremento fisiológico de actividad las formas M.A.S. presentan una maquinaria relacionada con la neurotransmisión menos diferenciada que en la serie control, pero, como se argumenta en el capítulo de Discusión (apartado VII.6.2.2.), esta pérdida de diferenciación puede ser solo aparente.

En cuanto a los organoides, también aquí se observa un mayor **% de axoplasma ocupado por mitocondrias** que en los axones de las sinapsis M.A.S. de la serie control ($P < 0.000$, Tabla XVII). Así, en los tres tipos de axones estudiados (normales, A.A.S. y M.A.S.) el incremento de actividad locomotora ha provocado una mayor ocupación de su axoplasma por mitocondrias, indicando, indirectamente, una mayor actividad metabólica (ver tablas VI, X y XVII).

En términos generales, los axones de las sinapsis M.A.S. de la serie de actividad incrementada pierden las características que los diferenciaban de los axones normales en la serie control. Así, estos axones presentan una mayor similitud con los axones de las sinapsis normales (tanto de la serie control como de la serie de incremento de actividad) que con los axones M.A.S. de la serie control.

VI.5.2.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO. SINAPSIS M.A.S.. SERIE I.F.A.

El estudio de los parámetros totalizadores del componente postsináptico de las sinapsis M.A.S. revela la existencia de una mayor **longitud de sarcolema total** (un 80% superior) en la serie de incremento de actividad que en la serie control; así como una redistribución de las proporciones de este sarcolema en relación al componente postsináptico que lo cubre (es decir sarcolema subaxonal, subglial y sin oposición). Esta redistribución viene dada por un mayor **% de sarcolema opuesto al axón** ($P < 0.05$ respecto a la serie control) y una menor proporción de las porciones del sarcolema cubierto por glía y sin oposición (esta última es significativa a $P < 0.005$, respecto a la serie control) en relación al valor de estos parámetros en la serie control (ver Tabla XVIII). En términos generales, en este componente postsináptico de la serie de incremento de actividad se observa una mayor longitud de sarcolema y este está más preferentemente situado de forma subaxonal que en la serie control.

En cuanto al grado de tortuosidad de los pliegues secundarios (**Número de secciones por obertura**), no se observa variación global ni en las diferentes porciones del sarcolema de las sinapsis M.A.S. de la serie de incremento de actividad respecto a la serie control.

Respecto a la serie control, los organoides del componente postsináptico de la serie de incremento de actividad no varían ni en el **número de vesículas *coated* por obertura** ni en la densidad mitocondrial (**Número de mitocondrias por μm^2 de componente postsináptico**) y solo se observa un importante incremento significativo de la densidad lisosomal (**Número de lisosomas por μm^2 de componente postsináptico**; un 200% superior al valor de este parámetro en la serie control y con una $P < 0.05$).

Tabla XVIII: Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S.. Serie IFA.

C. POSTSINAPTICO SINAPSIS M.A.S.	SUBAXONAL CTR	SUBAXONAL IFA	COMP.
Longitud sarcolema (μm)	24.43 \pm 9.83	47.29 \pm 9.83 93.57% \uparrow	U 0.000
Longitud sarcolema total	27.53 \pm 10.86	49.70 \pm 75.76 80.53% \uparrow	U 0.000
% sarcolema opuesto a...	88.55 \pm 8.18	92.59 \pm 6.54 4.56% \uparrow	T 0.009
Amplitud oberturas (nm)	72.21 \pm 18.94	66.73 \pm 16.54 7.59% \downarrow	T 0.140
Amplitud crestas (nm)	256.00 \pm 85.29	326.16 \pm 96.46 27.40% \uparrow	T 0.000
Ratio amplitud cresta/obertura	3.69 \pm 1.27	5.04 \pm 1.58 36.58% \uparrow	T 0.000
% del pliegue primario ocupado por crestas	79.95 \pm 14.24	84.51 \pm 14.09 5.70% \uparrow	T 0.125
Longitud pliegue secundario (nm)	607.28 \pm 129.15	618.30 \pm 13.87 11.24% \uparrow	T 0.685
Número de secciones por obertura	2.96 \pm 2.11	2.81 \pm 1.13 5.06% \downarrow	U 0.880
Número de secciones por obertura totales	2.77 \pm 2.03	2.64 \pm 0.95 1.12% \downarrow	U 0.886
Penetración densificaciones (nm)	75.69 \pm 40.17	132.39 \pm 53.53 74.91% \uparrow	T 0.000
% crestas densificadas	93.94 \pm 9.31	98.35 \pm 4.82 4.69% \uparrow	U 0.009
Longitud media densificaciones (nm)	318.49 \pm 117.35	399.88 \pm 147.00 25.55% \uparrow	T 0.005
Ratio longitud densificaciones pre-/post-	0.17 \pm 0.14	0.04 \pm 0.03 76.47% \downarrow	T 0.000
Número V. coated por obertura	0.36 \pm 0.28	0.40 \pm 0.48 11.11% \uparrow	T 0.231
Número de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.88 \pm 1.76	3.23 \pm 12.59 71.81% \uparrow	U 0.059
Numero de lisosomas por μm^2 de postsináptico	3.15 \pm 2.24	9.63 \pm 30.48 205.71% \uparrow	U 0.005

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test. % \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.
 N= 50 sinapsis M.A.S en la serie control; N= 43 sinapsis M.A.S. en la serie IFA.

VI.5.2.2.1. Componente postsináptico subaxonal. Sinapsis M.A.S.. Serie I.F.A..

En la serie control, las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) presentaban, en sus axones y en su sarcolema subaxonal, con respecto a las sinapsis normales y A.A.S. de esa serie (Tabla XIV), un conjunto de variaciones con una marcada tendencia a asemejarse a las sinapsis A.A.S. (ver apartado VI.5.1.2.1. en este capítulo).

En la serie de incremento de actividad, los parámetros axonales de las sinapsis M.A.S. no muestran esta tendencia si no que, por el contrario, estos parámetros son más compatibles con los observados en las sinapsis normales, tanto de la serie control como de la serie de incremento de actividad. En este sentido, concretamente en el sarcolema subaxonal de las sinapsis M.A.S., los parámetros generales de arquitectura sináptica también son compatibles con los observados en las sinapsis normales (por ejemplo, **longitud del sarcolema**, Tabla XVII). Por otro lado, el axón de las sinapsis M.A.S. de la serie de incremento de actividad es de mayor tamaño que el observado en la serie control y por consiguiente le corresponde un componente postsináptico subaxonal de mayor tamaño también.

La **amplitud de las crestas** entre los pliegues secundarios subaxonales es significativamente mayor en la serie de incremento de actividad que en la serie control, y por consiguiente también es mayor la **ratio de amplitud de cresta/obertura** ($P < 0.000$ en ambos casos). La ocupación del pliegue primario por crestas no se ve afectado por el incremento de la amplitud de estas (**% de pliegue primario ocupado por crestas**), posiblemente por estar en un sarcolema subaxonal mucho mayor (un 90%) que el sarcolema de la serie control (Tabla XVIII).

Los resultados hasta ahora expuestos podrían indicar que el bajo porcentaje de sinapsis M.A.S. observado en la serie de incremento de actividad (Tabla II) correspondería a un mantenimiento en este grupo de determinadas formas de mínimo abandono (concretamente las que presentasen rasgos que las aproximarían a la normalidad); mientras que otras sinapsis M.A.S. de la serie control (con determinados rasgos que las aproximarían a las formas A.A.S.) habrían pasado, con el incremento de actividad, a adquirir todas las diferenciaciones de las sinapsis A.A.S. (ver capítulo de Discusión, apartado VII.6.2.3.).

Sin embargo, en las sinapsis M.A.S. de la serie de incremento de actividad se observa un incremento de los valores que describen a la membrana densificada en situación subaxonal (**penetración de las densificaciones, % de crestas densificadas y longitud media de las densificaciones**) capaz, incluso, de alterar la *ratio* longitud de densificaciones pre-/post-. La magnificación de los parámetros relacionados con las membranas densificadas crestaes parece un fenómeno habitual en todas las porciones subaxonales (normales, A.A.S., M.A.S.) de la serie de incremento de actividad (ver tablas VII, XI y XVIII).

En resumen, el componente postsináptico de la porción subaxonal de las sinapsis M.A.S. de la serie actividad presenta muchos de los rasgos observados para las sinapsis normales (serie control y serie de incremento de actividad), así como lejana similitud con las formas M.A.S. de la serie control. En cuanto a la membrana densificada subaxonales, se comporta de igual manera (más prominente) que en los otros sarcolema subaxonales de la serie de incremento de actividad.

**Tabla XIX: Componente postsináptico subglial y abandonado. Sinapsis M.A.S..
 Serie IFA.**

C. POSTSINÁPTICO SINAPSIS M.A.S.	SINAPSIS M.A.S. CTR		SINAPSIS M.A.S. IFA		COMP.	
	SUBGLIAL (1)	ABANDONADO (2)	SUBGLIAL (3)	ABANDONADO (4)	1/3	2/4
Longitud sarcolema (μm)	2.46 \pm 1.75	2.30 \pm 3.11	2.30 \pm 1.17 6.50% \downarrow	2.30 \pm 1.85 20.41% \downarrow	0.883 U	0.337 U
% sarcolema opuesto a...	9.56 \pm 4.91	10.56 \pm 7.92	7.20 \pm 5.79 24.68% \downarrow	7.03 \pm 6.60 33.42% \downarrow	0.107 U	0.004 U
Amplitud oberturas (nm)	84.21 \pm 30.18	101.00 \pm 37.65	50.42 \pm 10.96 40.12% \downarrow	77.86 \pm 31.48 22.91% \downarrow	0.000 U	0.006 T
Amplitud crestas (nm)	260.26 \pm 133.87	192.05 \pm 113.87	305.14 \pm 230.40 17.24% \uparrow	216.37 \pm 114.98 12.66% \uparrow	0.904 U	0.382 T
Ratio amplitud cresta/obertura	3.32 \pm 1.96	2.19 \pm 1.93	6.11 \pm 4.11 84.03% \uparrow	3.22 \pm 2.43 47.03% \uparrow	0.049 U	0.059 T
% del pliegue primario ocupado por crestas	84.29 \pm 58.75	47.07 \pm 18.27	98.44 \pm 57.13 16.78% \uparrow	58.44 \pm 96.46 24.15% \uparrow	0.826 U	0.000 T
Longitud pliegue secundario (nm)	545.90 \pm 241.25	462.95 \pm 219.72	609.68 \pm 214.53 11.68% \uparrow	592.64 \pm 311.97 28.01% \uparrow	0.578 U	0.129 T
Número de secciones por abertura	1.72 \pm 1.13	2.01 \pm 1.69	1.85 \pm 1.28 7.55% \uparrow	1.73 \pm 1.28 13.93% \downarrow	0.737 U	0.338 U
Penetración densificaciones (nm)	98.17 \pm 66.44	94.50 \pm 76.23	135.56 \pm 120.15 38.08% \uparrow	102.19 \pm 93.09 8.03% \uparrow	0.493 U	0.965 U
% crestas densificadas	50.00 \pm 0.00	53.45 \pm 12.10	50.00 \pm 0.00 0.00%	52.27 \pm 11.84 2.20% \downarrow	1.000	0.483 U
Longitud media densificaciones (nm)	321.30 \pm 146.52	264.52 \pm 141.40	256.53 \pm 80.40 20.15% \downarrow	243.62 \pm 141.83 7.90% \downarrow	0.270 U	0.883 U
Número V. coated por abertura	1.50 \pm 0.11	1.15 \pm 0.45	1.00 \pm 0.00 33.33% \downarrow	0.94 \pm 0.25 18.26% \downarrow	-	0.075 U

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. T: t-test; U: U-test. % \downarrow y % \uparrow representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR.

N = 50 sinapsis M.A.S en la serie control; N = 43 sinapsis M.A.S. en la serie IFA.

VI.5.2.2.2. Componente postsináptico subglial. Sinapsis M.A.S.. Serie I.F.A..

Respecto a las porciones de sarcolema subglial de las sinapsis M.A.S. en la serie de incremento de actividad, no se observan (ver Tabla XIX), prácticamente, variaciones significativas con respecto a la porción de sarcolema homólogo de la serie control (únicas diferencias significativas son: decremento de la **amplitud de las oberturas** y, concomitantemente, alteración de la **ratio de amplitud de crestas/oberturas**).

Esta circunstancia no sorprende puesto que en la serie control esta porción de sarcolema de la sinapsis M.A.S. era también similar al sarcolema de las sinapsis normales. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el sarcolema de las sinapsis M.A.S. en la serie de incremento de actividad tiende a asemejarse al de las sinapsis normales (ver capítulo de Discusión apartado VII.6.2.3., para la interpretación de los hechos).

VI.5.2.2.3. Componente postsináptico abandonado. Sinapsis M.A.S.. Serie I.F.A..

Respecto al sarcolema totalmente abandonado en las sinapsis M.A.S. de la serie de incremento de actividad, tampoco se observa, prácticamente, variaciones con respecto a su sarcolema homólogo de la serie control (sólo destaca una **amplitud de las oberturas** que aquí también es menor). Es decir, se mantiene la marcada desdiferenciación comentada para la serie control (Tabla XIX).

En términos generales, las porciones de sarcolema no cubiertas por el axón en las sinapsis M.A.S. (subglial y sin oposición) no se ven afectados por el incremento de actividad.

Tabla XX: Sinapsis T.A.S.. Serie control.

C. POSTSINÁPTICO SINAPSIS T.A.S.	SUBAXONAL NORMAL (1)	SINAPSIS A.A.S.		SINAPSIS T.A.S.		COMPARACIONES			
		SUBGLIAL (2)	ABANDONADO (3)	SUBGLIAL (4)	ABANDONADO (5)	1/4	1/5	2/4	3/5
Longitud sarcolema (μm)	37.43 \pm 16.66	17.73 \pm 9.48	11.18 \pm 8.61	33.65 \pm 14.95 89.79% \uparrow 10.81% \downarrow	25.38 \pm 15.22 127.0% \uparrow 32.18% \downarrow	0.632	0.568	0.010	0.056
Longitud sarcolema total	37.43 \pm 16.66	37.03 \pm 16.46		33.74 \pm 14.69 8.90% \downarrow 9.86% \downarrow		0.678		0.900	
% sarcolema opuesto a..	100.00 \pm 0.00	22.89 \pm 20.50	30.04 \pm 20.07	83.26 \pm 28.99 263.7% \uparrow 16.64% \downarrow	87.55 \pm 24.90 191.4% \uparrow 12.45% \downarrow	0.343	0.406	0.010	0.020
Amplitud oberturas (μm)	77.50 \pm 21.62	86.48 \pm 26.86	88.52 \pm 32.88	99.98 \pm 24.47 12.94% \uparrow 29.00% \uparrow	74.10 \pm 27.58 16.29% \downarrow 4.38% \downarrow	0.063	0.800	0.300	0.400
Amplitud crestas (μm)	320.45 \pm 128.31	275.73 \pm 122.97	253.74 \pm 81.67	351.28 \pm 39.84 27.40% \uparrow 9.62% \uparrow	259.93 \pm 62.41 2.39% \uparrow 18.58% \downarrow	0.200	0.213	0.500	0.200
Ratio amplitud cresta/obertura	4.25 \pm 1.56	3.42 \pm 1.63	3.19 \pm 1.53	3.67 \pm 1.00 7.30% \uparrow 13.64% \downarrow	3.78 \pm 1.13 18.50% \uparrow 11.05% \downarrow	0.600	0.400	0.120	0.870
% de pliegue primario ocupado por crestas	76.07 \pm 17.56	74.20 \pm 38.94	57.79 \pm 20.34	67.76 \pm 50.66 8.68% \downarrow 10.92% \downarrow	19.22 \pm 10.47 66.74% \downarrow 75.73% \downarrow	0.400	0.001	0.600	0.001
Longitud pliegue secundario (μm)	613.67 \pm 157.95	505.18 \pm 218.11	548.65 \pm 260.55	909.04 \pm 479.05 79.94% \uparrow 48.13% \uparrow	627.50 \pm 409.21 14.36% \uparrow 2.25% \uparrow	0.200	0.600	0.009	0.600
Número de secciones por abertura	3.27 \pm 1.59	1.82 \pm 0.80	2.61 \pm 1.65	11.42 \pm 8.38 527.4% \uparrow 249.2% \uparrow	10.00 \pm 10.71 283.1% \uparrow 205.8% \uparrow	0.030	0.010	0.006	0.006
Número de secciones por abertura totales	3.27 \pm 1.59	2.77 \pm 2.03		11.75 \pm 9.30 324.1% \uparrow 259.8% \uparrow		0.001		0.000	
Penetración densificaciones (μm)	77.67 \pm 37.30	45.88 \pm 26.54	42.36 \pm 36.28	53.41 \pm 0.00 16.41% \uparrow 31.23% \downarrow	56.94 \pm 3.12 34.42% \uparrow 26.68% \downarrow	-	0.300	-	0.200
% crestas densificadas	91.81 \pm 12.82	58.21 \pm 15.57	62.22 \pm 18.13	100.00 \pm 0.00 71.79% \uparrow 8.92% \uparrow	63.33 \pm 4.71 1.78% \uparrow 31.02% \downarrow	-	0.010	-	0.100
Longitud media densificaciones (μm)	337.82 \pm 137.03	330.62 \pm 266.90	242.06 \pm 129.08	469.20 \pm 0.00 41.91% \uparrow 38.90% \uparrow	313.40 \pm 13.75 29.47% \uparrow 7.22% \downarrow	-	0.900	-	0.200
Número V. coated por abertura	0.22 \pm 0.13	0.49 \pm 0.42	0.70 \pm 0.45	0.85 \pm 0.00 73.46% \uparrow 286.3% \uparrow	0.44 \pm 0.00 37.40% \downarrow 100.0% \uparrow	-	-	-	-
Nº de mitocondrias por μm^2 postsináptico	1.44 \pm 1.67	1.99 \pm 1.85		0.39 \pm 0.00 80.40% \downarrow 72.91% \downarrow		-		-	
Nº de lisosomas por μm^2 postsináptico	4.00 \pm 4.31	4.68 \pm 5.02		4.43 \pm 1.67 5.30% \uparrow 10.75% \uparrow		0.057		0.600	

N = 57 sinapsis normales, 59 sinapsis A.A.S. y 6 de T.A.S.
 Todas las significaciones se han obtenido con U-test. % \uparrow , % \downarrow : incremento o decremento de los valores de las sinapsis T.A.S. respecto
 a las sinapsis normales y respecto las sinapsis A.A.S. (en negrilla)

VI.6. SINAPSIS TOTALMENTE ABANDONADAS (T.A.S.)

VI.6.1. SERIE CONTROL.

Como cabe esperar en un adulto normal, el número de sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.) es extremadamente bajo (N=6, 3 sinapsis completamente cubiertas de glía y 3 no tienen ninguna oposición). Por esta razón, no es posible desarrollar una interpretación detallada de los resultados expresados en la Tabla XX.

La longitud total del sarcolema de las formas T.A.S. es igual a la longitud total del sarcolema de las formas A.A.S., además no hay diferencia significativa ($P < 0.5$) entre ninguna de las longitudes totales del sarcolema de las sinapsis estudiadas en la serie control (ver tablas XIV y XX). Es decir, independientemente del estado del componente presináptico siempre se observa la misma cantidad de membrana postsináptica total.

El número de oberturas totales ha disminuido drásticamente (desde 12.21 ± 6.32 para la formas A.A.S. a 2.67 ± 1.87 en las formas T.A.S., datos no mostrados en tablas) y sin embargo el sarcolema total no ha variado en todo el proceso. De alguna manera estas pocas oberturas dispersas no están separadas por crestas si no por porciones de sarcoplasma que posiblemente no puedan ser denominadas crestas, sino más bien "distancia entre las oberturas". Siguiendo el mismo razonamiento, el desmesurado número de secciones de pliegues secundarios por obertura (Número de secciones por obertura, que aquí representa entre un 260% y 324% de incremento respecto a la membrana postsináptica normal y a la membrana postsináptica A.A.S. respectivamente, Tabla XX) incluye, además, formas

saculares, de antiguos pliegues que habrían fusionado sus membranas a nivel de las oberturas y que podrían estar en fase de degradación. Esto último es independiente de la presencia o ausencia de glía (Tabla XX).

En cuanto a las **amplitud de las oberturas** y *ratio* entre amplitud de las crestas y amplitud de las oberturas (***Ratio* amplitud cresta/obertura**), se pueden observar unos valores similares a los descritos para los sarcolemas de las sinapsis A.A.S. tanto subgliales como abandonados (Tabla XX).

En las formas de abandono total, únicamente en un caso, se ha hallado un postsináptico con crestas densificadas. Concretamente en esta imagen de abandono podía verse un axón a unos 5 micrómetros de la superficie postsináptica y totalmente cubierto por célula de Schwann.

En la presente forma de componente postsináptico (sinapsis T.A.S.) no puede haber ningún efecto trófico por parte del axón y, en los casos con participación de la célula glial, la relativa acción de esta puede no ser tan efectiva como en las situaciones en que acompañe al axón. Los resultados reflejados en la Tabla XX, muestran una grandísima variabilidad, de valores y significaciones que no tienen ninguna pauta razonable de desdiferenciación. Estos resultados pueden estar relacionados con la pérdida de acción trófica antes comentada.

Tabla XXI: Sinapsis T.A.S.. Serie IFA.

C. POSTSINÁPTICO SINAPSIS T.A.S.	SINAPSIS T.A.S. CTR		SINAPSIS T.A.S. IFA		COMP.	
	SUBGLIAL (1)	ABANDONADO (2)	SUBGLIAL (3)	ABANDONADO (4)	1/3	2/4
Separación célula glial-postsináptico (nm)	87.29 ± 35.37	-	87.20 ± 31.62 0.10% ↓	-	0.705	-
Longitud sarcolema (µm)	33.65 ± 14.95	2.30 ± 3.11	26.66 ± 29.10 20.77% ↓	2.30 ± 1.85 20.41% ↓	0.207	0.337
Longitud sarcolema total	33.74 ± 14.69		28.06 ± 23.90 16.83% ↓		0.263	
% sarcolema opuesto a...	83.26 ± 28.99	10.56 ± 7.92	90.54 ± 19.18 8.74% ↑	7.03 ± 6.60 33.42% ↓	0.754	0.004
Amplitud oberturas (nm)	99.98 ± 24.47	68.00 ± 37.65	68.36 ± 16.48 31.55% ↓	77.86 ± 31.48 22.91% ↓	0.023	0.006
Amplitud crestas (nm)	351.28 ± 39.84	192.05 ± 113.87	330.39 ± 156.90 5.94% ↓	216.37 ± 114.98 12.66% ↑	0.449	0.382
Ratio amplitud cresta/obertura	3.67 ± 1.00	2.19 ± 1.93	4.74 ± 1.65 29.15% ↑	3.22 ± 2.43 47.03% ↑	0.379	0.059
% pliegue primario ocupado por crestas	67.76 ± 50.66	47.07 ± 18.27	58.65 ± 25.02 13.44% ↑	58.44 ± 96.46 24.15% ↑	0.788	0.000
Longitud pliegue secundario (nm)	909.04 ± 479.05	462.95 ± 219.72	716.33 ± 363.75 21.20% ↓	592.64 ± 311.97 28.01% ↑	0.614	0.129
Número de secciones por abertura	11.42 ± 8.38	2.01 ± 1.69	4.31 ± 2.70 62.26% ↓	1.73 ± 1.28 13.93% ↓	0.101	0.338
Número de secciones totales por abertura	11.75 ± 9.30		4.36 ± 2.70 62.89% ↓		0.047	
Penetración densificaciones (nm)	53.41 ± 0.00	94.50 ± 76.23	154.24 ± 77.63 188.78% ↑	102.19 ± 93.09 8.03% ↑	0.172	0.965
% crestas densificadas	100.00 ± 0.00	53.45 ± 12.10	88.68 ± 16.46 11.32% ↓	52.27 ± 11.84 2.20% ↓	0.433	0.483
Longitud media densificaciones (nm)	469.20 ± 0.00	264.52 ± 141.40	421.33 ± 240.51 10.20% ↓	243.62 ± 141.83 7.90% ↓	0.643	0.883
Número V. coated por abertura	0.85 ± 0.00	1.15 ± 0.45	0.82 ± 1.20 3.52% ↓	0.94 ± 0.25 18.26% ↓	-	0.075
Número V. coated por abertura totales	0.47 ± 0.02		0.60 ± 0.95 27.65% ↑		0.049	
Nº de mitocondrias por µm ² postsináptico	0.39 ± 0.00		7.44 ± 17.69 1807.70% ↑		0.107	
Nº de lisosomas por µm ² postsináptico	4.43 ± 1.67		12.04 ± 24.24 171.78% ↑		0.705	

CTR: serie control; IFA: serie de Incremento Fisiológico de Actividad. % ↓ y % ↑ representa el % de incremento o decremento de los valores de los parámetros en la serie IFA respecto a la serie CTR. Todas las significaciones se han obtenido con U-test.

N = 6 sinapsis T.A.S en la serie control; N = 22 sinapsis T.A.S. en la serie IFA.

VI.6.2. SERIE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Las membranas postsinápticas de las sinapsis T.A.S. de la serie de incremento de actividad presenta (tanto si aparecen cubiertas o no por procesos de la célula glial), a diferencia de estas membranas en la serie control, una relativa estructuración en crestas y oberturas con un patrón de diferenciación típico de cualquier componente postsináptico de las sinapsis neuromusculares estudiadas hasta el momento (ver Tabla XXI). Estas membranas en la serie control presentaban, por contra, una muy acusada desdiferenciación que incluso llegaba al extremo de ser las "crestas" amplias zonas de membrana entre orificios ("oberturas").

Esta situación sugiere un abandono reciente por parte del axón durante el período de incremento de actividad locomotora.

Por otro lado, también en este componente postsináptico (T.A.S.) se observa un marcado incremento de los orgánoides relacionados con el metabolismo, como por ejemplo, la densidad de mitocondrias (número de mitocondrias por μm^2 de postsináptico) incrementa un 1800% y la densidad de lisosomas (número de lisosomas por μm^2 de postsináptico) incrementa un 170%, pero no se observan variaciones significativas respecto a los valores de estos parámetros en la serie control.

**CAMBIOS PLASTICOS DE ADAPTACION ULTRAESTRUCTURAL
DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MEDICAS BASICAS

UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD, REUS

T 18

MANEL SANTAFE I MARTINEZ

TESIS DOCTORAL

1993

VII. DISCUSION.

"Facts and truth really don't have much to do with each other".

William Faulkner.

VII.1. NIVEL FISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD APLICADA: DISCUSION DEL PROTOCOLO DE ENTRENAMIENTO.

El patrón de entrenamiento locomotor aplicado en el presente trabajo (velocidad: 27 m/min., alternando ciclos de 5 min. de actividad seguidos de 8 min. de reposo) está dentro de los límites contemplados como fisiológicos por otros autores. En este sentido, Kovanen y Suominen (1987) consideran fisiológico un entrenamiento a 22-25 m/min en ciclos de 60 minutos de actividad continuada y diaria, 5 días a la semana durante 2 años. Y Andonian y Fahim (1987) consideran dentro del umbral fisiológico un entrenamiento locomotor a una velocidad de 25-28 m/min ininterrumpida durante 60 min. por día, 5 días a la semana durante 8 semanas.

En el presente trabajo no se han observado en ningún momento signos sugestivos de que el incremento de actividad aplicado no esté dentro del umbral fisiológico. En la bibliografía existen abundantes estudios que aplican variaciones del nivel de actividad locomotor que, por varios motivos, sí que inducen lesiones a nivel muscular. Por ejemplo, Wernig y colaboradores (1990 y 1991) aplicando un nivel abusivo de entrenamiento de forma "ininterrumpida" durante varios meses a ratones adultos obtuvieron fibras musculares con disrupción de su sarcolema y sarcoplasma además de observar abundantes miocitos con sus núcleos centralizados (signo inequívoco de que se ha producido regeneración muscular), y obtuvieron a nivel nervioso numerosos fenómenos de retoñamiento (*sprout*). Por otro lado, Ogilvie y colaboradores (1988) aplicando otro patrón de actividad, similar al del presente estudio (ciclos actividad-reposo a una velocidad de 16 m/min. sobre un plano inclinado), obtuvieron lesiones ultraestructurales del tipo disrupción y coagulación de las miofibrillas y

desaparición de líneas Z; estos autores atribuyeron estas lesiones musculares al patrón de contracción muscular (eccéntrico) aplicado, que supone el correr por un plano inclinado.

Estos ejemplos pueden dar idea de la variabilidad de protocolos de actividad locomotora que se aplican y la necesidad de unificar criterios. En este sentido, Casaburi ha propuesto recientemente (1992) ciertas bases para que un entrenamiento mínimo sea eficaz. Este autor define como "entrenamiento mínimo eficaz", aquel que, dentro de unos límites fisiológicos, no produce lesiones de ningún tipo a nivel muscular, y es capaz de producir cambios estructurales y bioquímicos, además de incrementar el metabolismo aeróbico. En líneas generales, estas bases son las siguientes: (1) la duración mínima de las sesiones de un entrenamiento eficaz debe durar entre 10 y 15 minutos; (2) la frecuencia de un entrenamiento debe oscilar entre 3 y 5 días por semana, menos es inefectivo; (3) la duración mínima del programa de entrenamiento debe ser de 3 a 4 semanas. El protocolo presentado en el capítulo de Material y Métodos está dentro de las bases de Casaburi para un entrenamiento fisiológico mínimo eficaz.

VII.2. DESCRIPCION GENERAL DE LAS SINAPSIS **EN MUSCULOS CONTROL Y ENTRENADOS.**

En el presente estudio se han seguido los criterios ultraestructurales de clasificación de las sinapsis con abandono axonal asentados por Wernig y colaboradores (1980a), estos autores introdujeron el término "pliegues secundarios abandonados" (*abandoned gutters*) cuando el axón no cubre a algún pliegue secundario, así, tipificaron a las sinapsis como "parcialmente abandonadas" si los pliegues abandonados (*abandoned gutters*) coexistían con pliegues normalmente inervados por el axón (ver también Wernig y Herrera, 1986). En el presente trabajo, se ha ampliado y profundizado más en el concepto ultraestructural de "sinapsis parcialmente abandonada" al contemplar la intensidad del abandono para subclasificarla en sinapsis mínimamente abandonada (M.A.S.) o ampliamente abandonada (A.A.S.), estudiar la morfología de estas sinapsis con abandono axonal y analizar el número y distribución de los pliegues abandonados. Dado que estos conceptos no han sido documentados hasta la fecha, no es posible contrastarlos con otros estudios.

VII.2.1. TIPOS DE SINAPSIS NEUROMUSCULARES.

En la Tabla II se observa un importante porcentaje de sinapsis con algún grado de abandono (65%) en músculos control. Concretamente, las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) y las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) representan cada una de ellas, aproximadamente, un tercio de la población total de sinapsis abandonadas de los músculos control. Estos porcentajes son muy superiores a los habitualmente observados mediante microscopía óptica en mamíferos incluso de anfibios (Wernig y Herrera, 1986). Este hallazgo,

aparentemente contradictorio, podría atribuirse a que a nivel estructural (microscopía óptica) las sinapsis mínimamente abandonadas sean indistinguibles de las sinapsis normales.

Trabajos similares a nivel ultraestructural (microscopía electrónica) han obtenido unos porcentajes de sinapsis abandonadas mucho menores que los descritos en el presente estudio (por ejemplo Cardasis, 1983). Esta diferencia se debe a que en estos trabajos, se ha considerado a las formas M.A.S. como sinapsis normalmente inervadas. En otro estudio ultraestructural, Miriam Salpeter (1987b) presenta iconografía de sinapsis normales y, sin embargo, puede observarse algún pliegue secundario abandonado (Salpeter, 1987b, Figuras 13, 16 y 18) y algo similar sucede al analizar con detalle otros estudios (por ejemplo, véase Ellisman y cols, 1976, Figura 3).

El incremento fisiológico del nivel de actividad neuromuscular durante un período relativamente largo (1 mes) no modifica significativamente la proporción de sinapsis normales ni de la población total de sinapsis con abandono axonal (Tabla II). Estos resultados indican claramente que las sinapsis de apariencia normal no han sufrido abandono axonal. Trabajos similares a este estudio detectan un incremento de formas con abandono axonal (y disminución de las sinapsis normales) inducido por la actividad experimental (Wernig y cols., 1980a; Rosenheimer y Smith, 1985; Andonian y Fahim, 1987; Wernig y Herrera, 1986; Jans y cols., 1986; Cardasis y LaFontaine, 1987). Pero algunos de estos experimentos introducen factores no fisiológicos en sus entrenamientos locomotores. Por ejemplo, Rosenheimer (1985) somete a descargas eléctricas (*foodshock*) a los animales durante los períodos de ejercicio y obtiene un importante aumento de sinapsis con retracción axonal. Un buen ejemplo de incremento abusivo de actividad es el descrito recientemente por Wernig y colaboradores (1991), estos autores obtienen lesiones musculares evidentes y un importante porcentaje de *sprouts* sin

observar aumento en el nivel de retracciones axonales. Indirectamente, los resultados expuestos en el presente trabajo indican que no se ha sobrepasado el nivel fisiológico con la actividad aplicada.

En la serie de incremento de actividad, los porcentajes de las diferentes formas de abandono muestran que únicamente ha disminuido de forma significativa la presencia de las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.), y que aumentan significativamente las formas totalmente abandonadas (T.A.S.) sin detectarse variación en la presencia de la sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.). Estos resultados parecen indicar la existencia de un "flujo de conversión sináptica", en la dirección del mayor abandono, promovido o acelerado por el incremento de actividad. Así, algunas sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) pueden, eventualmente, convertirse en ampliamente abandonadas (A.A.S.) si incrementan su abandono axonal y, paralelamente, determinadas sinapsis A.A.S. podrían aumentar su grado de abandono hasta el extremo de perder completamente el axón y quedar totalmente abandonadas (T.A.S.). Del estudio morfométrico de los parámetros (ver apartado VII.6.2.) de las sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) se desprende la posibilidad de que ciertas sinapsis M.A.S., con una más marcada similitud previa (serie control) con las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.), podrían convertirse en A.A.S. con el incremento de actividad. Paralelamente, las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) que en la serie control presentan un mayor grado de abandono (o signos de retracción axonal mas marcados) podrían convertirse en sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S) con el incremento de actividad (ver apartado VII.7.2.). Refuerza este razonamiento el hecho de hallar, en la serie de incremento de actividad, menos sinapsis M.A.S. bilateralmente abandonadas (ver Tabla II). Presumiblemente las formas mínima y bilateralmente abandonadas (M.A.S., B.A.) sean más susceptibles a ampliar su abandono (convirtiéndose en A.A.S.) con el incremento de actividad. Por otro

lado, el flujo de conversión de sinapsis M.A.S. en A.A.S. y el de conversión de sinapsis A.A.S. en T.A.S. es de un ritmo similar (no varía el porcentaje de sinapsis A.A.S.) lo cual podría indicar que el incremento de actividad afecta de una forma uniforme a todas las sinapsis con algún grado de abandono.

Está bien documentado que un componente postsináptico totalmente abandonado puede permanecer durante prolongados períodos de tiempo en este estado (Birks y cols, 1960; Robbins y Fahim , 1985; Krause y Wernig, 1985; ver también el apartado VII.7). Según Robbins y Fahim (1985), el progresivo aumento del índice de sinapsis abandonadas en animales seniles es debido a un fenómeno de "sumación" de las sinapsis abandonadas neoformadas a la población de sinapsis abandonadas preexistente. En el presente estudio también se detecta un fenómeno de "sumación" similar al descrito, en donde las sinapsis T.A.S recién formadas por el incremento de actividad (resultantes de la conversión de sinapsis A.A.S en T.A.S.) pasarían a engrosar la población de sinapsis T.A.S. preexistentes (incremento significativo, ver Tabla II).

En líneas generales, los resultados obtenidos del estudio de los tipos de sinapsis de la serie control y de la serie de incremento de actividad fisiológica sugieren la existencia de un "flujo de conversión plástica actividad-dependiente en dirección al mayor grado de abandono axonal" con el incremento de actividad.

VII.2.2. MORFOLOGIA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE ABANDONO.

En términos generales, el incremento fisiológico de actividad no afecta de forma significativa a la morfología de las diferentes formas de abandono (M.A.S., A.A.S. y T.A.S.). Si bien, cabe señalar una redistribución de las morfologías que presentan las sinapsis con mínimo y amplio abandono a favor de un incremento no significativo de la morfología con abandono unilateral (U.A.) y sin participación glial (NoSC; ver Figuras 11 y 12), en respuesta al ejercicio.

En cuanto a las morfologías de las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.), el incremento de actividad permite la aparición de procesos gliales que cubren sólo parcialmente al componente postsináptico (ver Figura 13). Este hallazgo puede sugerir que las nuevas morfologías T.A.S. observadas con el incremento de actividad provengan de sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) que han perdido definitivamente su axón quedando en su lugar, tan solo, algunos filopodios gliales.

VII.2.3. DISTRIBUCION DE LOS PLIEGUES ABANDONADOS

EN LAS SINAPSIS A.A.S.

La mayoría de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) de la serie control (80%) presentan entre 2 y 5 pliegues secundarios abandonados (ver Figura 14). En las sinapsis normales de esta serie el número medio de oberturas de los pliegues secundarios es de 10.12 ± 5.79 (los valores referentes a oberturas no aparecen en Tablas) y en las sinapsis A.A.S.

el número medio de oberturas abandonadas es de 5.71 ± 3.37 . Así, parece habitual que en las sinapsis A.A.S. de la serie control el número medio máximo de pliegues abandonados no supere el 50% de la dotación total de pliegues secundarios de las sinapsis normales.

En la serie de incremento fisiológico de actividad se observa también que la mayoría de sinapsis A.A.S. presenta entre dos y cinco pliegues secundarios abandonados, pero en una proporción superior a la de la serie control. Además en la Figura 14 se observa la aparición de un segundo "pico" de sinapsis que presentan 7 pliegues abandonados. El primer "pico", más acusado, puede responder a las formas A.A.S. de reciente aparición (provenientes de determinadas sinapsis M.A.S.), y el segundo "pico" puede responder a parte de las sinapsis A.A.S. preexistentes que con el incremento de actividad hayan aumentado el número de pliegues abandonados. En este contexto, Wernig y colaboradores (1980a) observaron en músculos de anfibios un aumento en el número de pliegues abandonados que presenta cada sinapsis durante el período estival (nivel fisiológico de actividad) y disminución de estos durante el período de hibernación de estos animales. Los resultados del presente estudio corroboran en mamíferos las observaciones de Wernig y colaboradores.

Sin embargo, pese al aumento del número de pliegues secundarios abandonados que presenta cada sinapsis, es destacable que en la serie de incremento de actividad no se observen sinapsis A.A.S. con más de 9 pliegues abandonados cuando en la serie control es posible observar sinapsis hasta con 11 pliegues abandonados. Esto sugiere que tiene lugar una conversión de estas sinapsis A.A.S. con más de 9 pliegues abandonados a la forma del abandono total (T.A.S.). inducido por el incremento de actividad.

En términos generales, el incremento de actividad afecta únicamente a las sinapsis abandonadas y las afecta con mayor intensidad en función del grado de abandono axonal.

VII.3. ANALISIS DE LA MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS POSTSINAPTICAS.

De momento, no es posible contrastar los resultados obtenidos del estudio de la morfología de las crestas, dado que, hasta la fecha, este es un aspecto no analizado de la ultraestructura neuromuscular.

VII.3.1. MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS EN MUSCULOS CONTROL.

Del estudio de la morfología crestal a nivel ultraestructural se desprende que todas las morfologías consideradas (ver Figura 6) están presentes bajo el axón ya sea este normal o de las formas A.A.S.. Sin embargo, se detecta una ligera redistribución entre los dos casos de estas morfologías crestales consistente en un incremento de formas III con una disminución de las IV bajo el axón A.A.S. respecto a las sinapsis normales (Tabla V). Cuando se analiza la morfología de las crestas del sarcolema abandonado (bajo la célula glial y sin oposición) se observa un aumento de los tipos II y V, con un decremento de las formas III y IV respecto a las crestas normales. La morfología de las crestas parece cambiar en función del grado de abandono. Así, parecen existir unas tendencias generales en donde se puede observar que la forma III se comporta como específica de las crestas bajo el axón y lo mismo sucedería con la morfología II bajo la glía y la morfología V en el sarcolema totalmente abandonado.

Pese a esta posible relación entre grado de abandono y morfología de las crestas, el grado de densificación no está directamente relacionado con la morfología. En todas las sinapsis estudiadas, bajo el axón, siempre hay un bajo porcentaje de morfologías no densificadas (Tabla V). Sin embargo, en todos los casos de abandono estudiados y para todos los tipos de crestas presentes (excepción hecha de la morfología III) este porcentaje de crestas no

densificadas incrementa. Así, la densificación de la membrana está más relacionada con el grado de abandono que con la morfología de la cresta que la sustenta.

Las morfologías III y IV parecen requerir, para mantener su forma, de la actividad sináptica inducida por el axón. Cuando la actividad sináptica cesa (por que se haya producido retracción axonal) las morfologías III y IV podrían transformarse en tipos II y V. Realmente, las crestas no desaparecen ya que no varía su número entre sinapsis normales y A.A.S. (10 y 12 respectivamente, $P > 0.05$, datos no mostrados en Tablas), todo indica que más bien se transforman de unas morfologías a otras. Las formas tipo III (más diferenciadas) detectadas bajo el axón, se podrían transformar en tipo II bajo la glía. La morfología II se puede asumir que es aún más diferenciada que la V, que predomina en el sarcolema abandonado. Parece ser que, según el grado de abandono, en el sarcolema no sólo varían los parámetros de amplitud de las crestas y de las oberturas sino que también la morfología de sus crestas entrarían en una dinámica desdiferenciadora. Sería plausible pues, un flujo de desdiferenciación desde las morfologías III y IV, como más específicas, hacia II y V como más indiferenciadas. En este sentido, se podría sugerir una balonización progresiva de las crestas íntimamente ligada al grado de abandono. Alternativamente, esta balonización podría estar relacionada con el citoesqueleto de las crestas, en que su forma más relajada correspondiera a la morfología V y, mediado por el ión Ca^{2+} (ver Sanes, 1989), la forma con el citoesqueleto más activo (bajo el axón) correspondería a la morfología III. El resto de tipología descrita podría corresponder a formas intermedias de activación del citoesqueleto y probablemente neurotransmisión. Independientemente de las posibles implicaciones que puedan suponer estas variaciones de las morfologías crestales, lo que es verdaderamente relevante es la específica distribución de las crestas en relación al grado de abandono ya que estas son el soporte estructural de un importante elemento en la neurotransmisión, la membrana densificada. Si

bien la densificación del sarcolema no está íntimamente ligada a ninguna morfología en concreto, sí que permite explicar la variabilidad observada para ciertos parámetros de densificación postsináptica como es el **% de crestas densificadas**.

El análisis de las morfologías crestales en la serie control indica, en conjunto, la existencia de una marcada relación entre la morfología que adoptan las bulbosidades crestales con la presencia del componente presináptico (axonal o glial) o ausencia total de este, y también es un indicador del grado de diferenciación del componente postsináptico.

VII.3.2. MORFOLOGIA DE LAS CRESTAS EN MUSCULOS ENTRENADOS.

En líneas generales, el incremento fisiológico de actividad no distorsiona excesivamente las preferencias descritas en la serie control de determinadas morfologías crestales por determinados sarcolemas (Tabla V). Así por ejemplo, el incremento de actividad acentúa la preferencia de la morfología del tipo III por el sarcolema de las sinapsis normales, paralelamente en este sarcolema disminuye significativamente la morfología más inespecífica (Tipo V). Al igual que en la serie control, en el sarcolema de las sinapsis normales de la serie de incremento de actividad hay una predominancia de las morfologías de los tipos II y IV. Estos datos corroboran el hecho comentado anteriormente de que las sinapsis normales prácticamente no se alteran por el incremento del nivel de actividad.

En todos los sarcolemas de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.; sarcolema subaxonal, subglial y abandonado) de la serie de incremento de actividad aparece un

persistente incremento significativo de la tipología crestal IV. En el sarcolema subaxonal, este hecho junto con la disminución significativa de la morfología crestal V (la más indiferenciada) indica que existe una mayor diferenciación crestal al aumentar la actividad.

El aumento de diferenciación de la morfología crestal de las sinapsis A.A.S. se observa también en los sarcolemas subgliales y abandonados. En estos sarcolemas se aprecia un incremento significativo de la morfología crestal del tipo IV con disminución de la morfología V. Curiosamente, en el sarcolema totalmente abandonado se observa además un ligero incremento significativo de la morfología crestal del tipo III. Estos resultados indican claramente que, en los sarcolemas de las sinapsis A.A.S. que no están en relación directa con el axón, existe un aumento en la diferenciación de la morfología crestal. Este aumento de la diferenciación puede sugerir un abandono reciente por parte del axón y reforzar la idea comentada anteriormente de que las sinapsis A.A.S. de la serie actividad provengan de sinapsis M.A.S. que han incrementado su abandono recientemente. Por otro lado, se refuerza la idea, también avanzada anteriormente, de que la diferenciación crestal es axón-dependiente. La actividad neurotransmisora que supone la presencia del axón podría inducir, indirectamente, determinadas modificaciones en el citoesqueleto crestal bien por la participación del ión Ca^{2+} (el ión Ca^{2+} es indispensable para que se produzca despolarización pre- y postsináptica - Delbono, 1992-, interviene además en la motilidad y estructura presináptica - Reichardt y Tomaselli, 1991, para revisión- y en el mantenimiento de la estructura postsináptica -Sanes, 1989 para revisión-) o en relación a la presencia de moléculas de receptor AChR (estas moléculas son axón-dependiente, Lockerbie, 1987) o por la capacidad organizativa de determinadas proteínas de la lámina basal sináptica (por ejemplo agrinas -Lieth y cols., 1992; y ver también el apartado VII.5.2.2.-).

El comportamiento de la morfología crestal del tipo I es independiente de las tendencias generales descritas en los músculos control y entrenados. Es muy probable que el tipo I de morfología crestal corresponda a secciones oblicuas de cualquiera de los otros tipos crestales que, por cualquier motivo, presenten su bulbosidad apical fuera del plano de corte.

Del análisis de los resultados de este estudio se desprende que la densificación crestal es, aparentemente, refractaria a las modificaciones en el nivel de actividad locomotora (ejercicio fisiológico). Las densificaciones de membrana son membranas postsinápticas ricas en proteínas relacionadas con la neurotransmisión (por ejemplo canales iónicos, AChR, proteínas de la matriz extracelular) que las hace más electrón-densas que la simple capa bilipídica (ver Salpeter, 1987b para revisión). La estabilidad de las membranas densificadas crestales frente a el incremento de actividad locomotora puede indicar una permanencia de estas proteínas de membrana lo que puede suponer un recambio muy lento de estas membranas (sin embargo ver discusión de los apartados VII.4.2. y VII.5.2.2.).

En resumen, el incremento de actividad induce a un aumento en la diferenciación de las morfologías crestales de las sinapsis A.A.S.. Indirectamente, este hecho refuerza la hipótesis de la existencia de un "flujo de conversión plástica actividad-dependiente" de los diferentes tipos de sinapsis con algún grado de abandono.

VII.4. ANALISIS DE LAS SINAPSIS NORMALES EN MUSCULOS ENTRENADOS.

VII.4.1. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE PRESINAPTICO.

En el presente estudio se ha observado cierta estabilidad de las sinapsis de aspecto normal en relación al incremento de actividad. Ya se ha comentado que estas sinapsis no modifican su porcentaje (ver Tabla II) ni su característica morfología crestal (ver Tabla V) con el tipo de ejercicio aplicado. El estudio de los parámetros presinápticos de estas sinapsis normalmente inervadas confirma esta idea.

El estudio morfométrico ultraestructural entre axones de las sinapsis normales de los músculos EDL control y entrenados pone de manifiesto que existen muy pocas variaciones significativas y, sin embargo, las escasas variaciones observadas (Tabla VI) responden al incremento de actividad introducido. Se ha observado que aumentan significativamente los parámetros de las organelas relacionadas con el soporte metabólico de la terminación nerviosa (**% de axoplasma ocupado por mitocondrias**) y algunos de los parámetros relacionados con la neurotransmisión (**Diámetro de V.S. y Número de V.S. por μm de axolema sináptico**). Así, la mayor presencia de vesículas sinápticas en contacto con el axolema sináptico puede ser indicativo de una mayor disponibilidad de éstas para su exocitosis durante la neurotransmisión (Newman y Severs, 1990). Sin embargo, el incremento del diámetro de las vesículas sinápticas no implica necesariamente un mayor grado de exocitosis. En estos axones no varía la densidad de vesículas sinápticas, de vesículas *core* ni *coated* lo que puede indicar que no está incrementado el reciclaje de material relacionado con la neurotransmisión (ver Heuser 1989a y b, y apartado VII.5.5.1. para una mayor discusión). Las variaciones de los

parámetros relacionados con las vesículas sinápticas pueden sugerir una mayor predisposición a la neurotransmisión pero ésta, desde el punto de vista morfométrico, parece no ser muy elevada en estos axones de las sinapsis normales.

Los parámetros relacionados con las densificaciones del axolema (zonas activas) indican la existencia del mismo grado de diferenciación de estas estructuras en las sinapsis normales de la serie control y de la serie de incremento de actividad. Dado que las zonas activas también suelen estar implicadas en la neurotransmisión (Trimble y cols, 1991) se puede interpretar que la neurotransmisión no se ve excesivamente afectada en las sinapsis normales por el incremento de actividad locomotora.

Así, en el presente estudio no queda descartada la posibilidad de que realmente exista un incremento de liberación de neurotransmisor (hay un incremento del aparato relacionado con el metabolismo) y, de ser así, esta mayor neurotransmisión estaría dentro de los márgenes habituales de un axón normal, dado que no tiene, prácticamente, trascendencia morfométrica.

VII.4.2. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE POSTSINÁPTICO.

A diferencia de lo observado en el componente presináptico, el incremento de actividad modifica substancialmente la arquitectura de los pliegues postsinápticos de las sinapsis normales. Estos cambios están orientados a favorecer una mayor superficie crestal ya que las membranas densificadas de las crestas son en este sarcolema muy prominentes (ver Tabla VII). El incremento de actividad no afecta a la proporción de crestas densificadas y sin

embargo se observa un marcado incremento métrico (en longitud) de las membrana densificadas preexistentes.

Las densificaciones en la membrana postsináptica son debidas, como en el axolema, a acúmulos de proteínas intramembranas tales como canales iónicos y también proteínas de superficie como moléculas de AChR y están íntimamente relacionadas con la neurotransmisión (ver Salpeter, 1987a y b para revisión). Así, pese a no haber evidencias morfométricas en el axón de una exacerbada neurotransmisión, a nivel postsináptico se observan, en cambio, indicios de una mayor actividad neurotransmisora.

En este sentido, estudios electrofisiológicos demuestran la existencia de un "margen de seguridad" en la liberación cuántica del neurotransmisor en las sinapsis neuromusculares de manera que se libera un grandísimo volumen de neurotransmisor para un proporcionalmente reducido número de receptores (AChR) (Anderson y Stevens, 1973; Hartzel y cols., 1975; Magleby y Terrar, 1975). Por ejemplo, la concentración de acetilcolina alcanzada en la hendidura sináptica durante un impulso es, en promedio, de 0.0003M para una densidad media de moléculas de AChR de 10000 moléculas / μm^2 (Hartzel y cols, 1975). Alternativamente, se puede sugerir que debido al incremento de demanda de neurotransmisión (actividad locomotora) el componente postsináptico puede incrementar el número de receptores (membrana densificada) para un mayor provecho del "margen de seguridad" del neurotransmisor liberado.

Por otro lado, parece haber un mayor recambio de membrana mediado por vesículas *coated* y lisosomas. En este sentido, el incremento de estos organoides en el componente postsináptico de las sinapsis normales también puede estar relacionado con el incremento de

membrana densificada (síntesis y recambio de proteínas de membrana; Pumplin y Bloch, 1990). El sarcoplasma de las sinapsis normales no parece precisar de un mayor aporte de energía oxidativa (no varía la densidad mitocondrial) para suplir el incremento de actividad aplicado. Cabe suponer que el nivel de actividad infligido está dentro de los niveles fisiológicos que puede absorber la dotación mitocondrial preexistente. Alternativamente, se puede sugerir que el incremento de actividad (neurotransmisión, síntesis y recambio proteico) no precisa del metabolismo mitocondrial en el sarcoplasma de las sinapsis normales.

En resumen, el axón de las sinapsis normales no se ve prácticamente afectado por el incremento de actividad aplicada y, sin embargo, se observa un importante incremento métrico en la membrana postsináptica densificada. En conjunto, se puede sugerir que, con el incremento de actividad, el componente postsináptico de las sinapsis normales aumenta el provecho del "margen de seguridad" del neurotransmisor liberado por el axón.

VII.5. ANALISIS DE LAS SINAPSIS AMPLIAMENTE ABANDONADAS (A.A.S.).

VII.5.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS A.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.

VII.5.1.1. COMPONENTE PRESINAPTICO.

Retracción axonal en las sinapsis A.A.S.

Los axones de las sinapsis parcialmente abandonadas están descritos en la literatura como de menor calibre que los de las sinapsis normalmente inervadas (Wernig y cols, 1980a y b) bien porque se trata de retoños axonales (*sprouts*) que están reinervando un componente postsináptico abandonado o bien por que se trata de axones en retracción (Wernig y Dorlöchter, 1989). En el presente estudio, los axones de las sinapsis ampliamente abandonadas también son menores que los de las sinapsis normales (ver Tabla VIII), y, por otro lado, la mayor anfractuosidad (*Ratio* perímetro / área) observada en estos axones apunta hacia la retracción axonal más que a la reinervación sináptica. Se ha sugerido que, tanto durante el desarrollo embrionario (Thompson, 1985) como en la edad adulta (Herrera y Werle, 1990), la eliminación sináptica (previa retracción) puede estar mediada por la pérdida de producción de algún factor trófico de origen muscular (ver también Slack y cols, 1983) de tal manera que la retracción axonal puede iniciarse en el axoplasma por la acción de determinadas proteasas (Vrbová y cols., 1988; ver apartado VII.6.1.1. para mayor discusión). La pérdida inicial del axoplasma puede obligar al axolema a plegarse de forma parcial, como es el caso del incremento de anfractuosidad observado en los axones de las sinapsis A.A.S. del presente estudio (ver Tabla VIII).

Participación glial en los procesos de retracción axonal.

En la Tabla II se observa como la presencia glial aumenta en función del grado de abandono. Esta circunstancia puede indicar la existencia de cierta relación entre la retracción axonal y la participación de la célula de Schwann. En relación a la presencia glial en las sinapsis A.A.S., se destacó en el capítulo de resultados que las proporciones de axolemas glial y sináptico se modifican uno a favor del otro con gran exactitud (disminución del perímetro sináptico y aumento del perímetro glial del orden de un 20% en ambos dos casos, ver Tabla VIII). Estos datos indican cierta relación entre la célula glial y el axón en fase de retracción. No se puede descartar una participación activa por parte de la célula de Schwann en el proceso de retracción axonal bien porque exista un "secuestro" activo del axón o, de forma más secundaria, porque ocupe activamente el intersticio entre el componente pre- y postsináptico conforme el axón se vaya separando en su proceso de retracción.

En la literatura está descrito como en el período de pérdida de motoneuronas y de eliminación sináptica perinatal los axones son "fagocitados" por la célula de Schwann (Chuwang y Oppenheim, 1978). Este precedente reforzaría la posibilidad de un secuestro activo del axón por parte de la glía en las sinapsis con retracción axonal, es decir en las sinapsis A.A.S. y, ver más adelante, también en las sinapsis M.A.S..

Por otro lado, durante el período embrionario (Lockerbie, 1987) y en la edad adulta (Covault y Sanes, 1985) se ha descrito la presencia de moléculas de adhesión específicas para el axón en la lámina basal glial (*Neuron-glia cell adhesion molecule* o Ng-CAM). Se puede adelantar la hipótesis de que al separarse el axón del componente postsináptico deje vacantes moléculas de adhesión celular (N-CAM), tanto en el axolema como en el sarcolema. Estas moléculas de adhesión celular podrían ser reocupadas por las propias de la membrana basal glial (Ng-CAM) lo que impulsaría a la membrana glial a cubrir el axolema recién retraído y

el sarcolema recién abandonado. Cualquiera de las dos alternativas expuestas (participación activa o pasiva de la célula glial) podrían ser aplicables a los resultados observados en el presente estudio. Sin embargo, las dos posibilidades implican que todas las sinapsis con retracción axonal deberían presentar procesos gliales sobre el sarcolema abandonado y, como se muestra en la Tabla II y Figuras 11 y 12, esto no sucede, lo que indica una participación secundaria de la célula glial. Pese a todo lo expuesto, está documentada una amplia gama de situaciones en que la célula glial interviene, positiva o negativamente, en el comportamiento axonal (ver para revisión Carbonetto, 1991; y McMahan y Reichardt, 1991).

Por otro lado, no se han observado signos de ninguna acción directa de la célula glial sobre el axón y, como se ha indicado anteriormente, la retracción axonal parece iniciarse en el axoplasma y no en el axolema en contacto con la membrana glial. En conjunto, todo parece indicar que la retracción axonal es independiente de la participación glial. En cualquier caso, el papel que pueda jugar la célula glial en estos procesos no tiene porqué ser necesariamente el mismo en relación al axolema que en relación al sarcolema (ver apartados VII.5.1.2. y VII.6.1.2.).

Diferenciación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión en los axones de las sinapsis ampliamente abandonadas.

Los axones de las sinapsis ampliamente abandonadas (axones en fase de retracción) presentan, en los músculos control, signos de un marcado incremento de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas) respecto a los axones de las sinapsis de aspecto normal (ver Tabla VIII). La pérdida de axoplasma y axolema observada para estos axones (A.A.S.) no se produce por simple supresión parcial de

membrana y citosol sino que todo parece indicar que posiblemente se haya producido una redistribución de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión tanto del axoplasma (por ejemplo, vesículas sinápticas) como del axolema (por ejemplo, zonas activas). El resultado de esta redistribución supera, incluso, el grado de diferenciación observado en las sinapsis normales. Alternativamente, se puede avanzar la idea de que en el músculo EDL control la dotación de estas estructuras relacionadas con la neurotransmisión no está homogéneamente repartida en todas las ramas de una misma arborización nerviosa o que puedan existir motoneuronas con diferentes grados de capacidad neurotransmisora (ver apartado VII.6.1.1 para mayor discusión).

En las sinapsis A.A.S. de la serie control se observan vesículas sinápticas (V.S.) de mayor tamaño que en las sinapsis normales y una población de V.S. cercanas al axolema sináptico también mayor que en las sinapsis normales (ver Tabla VIII). Curiosamente, el valor de estos parámetros (**Diámetro medio de V.S. y Número de V.S por μm de axolema sináptico**) en los axones normales de la serie de incremento de actividad también están más elevados respecto a sus homólogos de la serie control (ver Tabla VI). Estos resultados pueden indicar una mayor eficacia en los axones de las sinapsis A.A.S. o, alternativamente, un relativo acercamiento de las sinapsis normales de la serie de incremento de actividad a ciertas características de las sinapsis A.A.S. de la serie control.

Pese a que los axones A.A.S. de los músculos control presentan una mayor diferenciación de las vesículas sinápticas y de las zonas activas, los indicios de que en estos axones haya un nivel de neurotransmisión también mayor son muy vagos.

En una reciente revisión de la dinámica de las vesículas sinápticas en las terminaciones nerviosas, Bonzelius y Zimmermann (1990) indican que las V.S. se originan a nivel del soma neural y juntamente con vesículas *core* son transportadas hasta las terminaciones nerviosas por

transporte axoplásmico lento; las V.S. recién llegadas no pueden ser inmediatamente excitadas y precisan de un período de maduración en el que intervienen las vesículas *core*. Zimmermann y colaboradores (1989) (ver también Bonzelius y Zimmermann, 1990), consideran que en toda terminación nerviosa existen dos subpoblaciones de vesículas sinápticas: VP1 si son vesículas originadas, básicamente, en el soma neural y VP2 si proceden exclusivamente del reciclaje distal de membrana y del neurotransmisor recién excitado. Las VP2 pueden madurar y pasar a formar parte, eventualmente, de la población de VP1. Según estos autores, las VP1 son de un calibre mayor que las VP2 pero ambas poblaciones presentan idéntica capacidad neurotransmisora aunque son preferentemente excitadas las VP2 (ver también Betz y cols., 1992). Adoptando estos criterios, se puede avanzar la hipótesis de que los axones de las sinapsis A.A.S. sufren un importante aporte de VP1 (de mayor diámetro) y de vesículas *core* desde el soma neural. Refuerza esta hipótesis el hecho de observar un incremento de lisosomas y de cisternas del R.E.L. (ver Tabla VIII) ya que se ha propuesto la participación de estas estructuras en la maduración de las vesículas sinápticas a nivel de la terminación (ver Heuser, 1989b).

Esta hipótesis de que en los axones de las sinapsis A.A.S. de los músculos control exista un incremento de vesículas sinápticas recién llegadas desde el soma neural no implica necesariamente un incremento en la neurotransmisión. Heuser (1989 a y b) demuestra que después de un estímulo axonal aumentan el número de vesículas *core* y *coated*, ya que estas estructuras están relacionadas con el reciclaje de la membrana y del neurotransmisor (ver también Betz y Betwick, 1993). Los resultados obtenidos del estudio de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) no muestran ningún incremento de vesículas *coated* ni disminución del diámetro de las vesículas sinápticas (V.S. recicladas -VP2- son de menor calibre que las originarias -VP1-) que avalen un incremento de reciclaje. Por tanto, no parece

probable la existencia de una neurotransmisión incrementada en las sinapsis A.A.S. de los músculos EDL control.

Se puede sugerir la participación de algún factor trófico neural (ver apartado VII.6.1.1.) responsable del aporte de vesículas sinápticas desde el soma neural hacia la unión mioneural e inductor del incremento de zonas activas (ver Tabla VIII) en estas sinapsis con axones en retracción (A.A.S.).

En resumen, los resultados obtenidos del estudio ultraestructural presináptico de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) en músculos EDL control indican un incremento de los organoides y estructuras relacionadas directa e indirectamente con la neurotransmisión, sin que se observen evidencias de un incremento en la actividad neurotransmisora.

VII.5.1.2. COMPONENTE POSTSINAPTICO.

En las sinapsis A.A.S. de la serie control, la **longitud de sarcolema total** es el mismo que el observado en las sinapsis normales (Tabla IX). Este dato es altamente sugestivo de que el abandono se ha producido por simple retracción axonal (ver apartado VII.7.1.). El componente postsináptico de estas sinapsis tiene, en promedio, unas dimensiones "estándar", donde no varían ni el número total de oberturas por sección (de 10.12 ± 5.79 en sinapsis normales a 12.21 ± 6.32 en las sinapsis A.A.S., $P > 0.05$, datos no mostrados en Tablas), ni el número total de secciones de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático (29, tanto en sinapsis normales como en las sinapsis A.A.S.).

Diferenciación del sarcolema subaxonal en las sinapsis A.A.S..

Este estudio ha evidenciado que el comportamiento de las porciones del sarcolema subaxonal es diferente del de las porciones abandonadas (subglial y abandonada). En el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S., la amplitud tanto de crestas como de oberturas decrece respecto a las sinapsis normales (Tabla IX). Esta circunstancia se podría interpretar como un fenómeno de relativa atrofia, sin embargo, la *ratio* entre estas amplitudes se mantiene (***Ratio* amplitud crestas/oberturas**) lo cual implica que no varíe el **% del pliegue primario ocupado por crestas** respecto al componente postsináptico normal (N-S.). La membrana densificada subaxonal disminuye sus valores métricos (**Longitud media de las densificaciones y Penetración de las densificaciones por la obertura**) en concordancia con unas crestas más delgadas que las normales, pero en contrapartida incrementa el porcentaje de crestas que presentan este tipo de densificaciones (ver Tabla IX). Todos estos datos son más sugestivos de un proceso de "compactación" (o reducción proporcionada) que de "atrofia" del componente postsináptico subaxonal de las sinapsis A.A.S.. A favor de la propuesta de "compactación", también se observa que la *ratio* entre densificaciones pre y postsinápticas no varía en absoluto en las sinapsis A.A.S. respecto a las sinapsis normales (Tabla IX).

En resumen, los cambios postsinápticos observados bajo el axón de las sinapsis A.A.S. (Tabla IX) como un proceso de aparente desdiferenciación pero en el que existe un factor de compensación importante como es un mayor **% de crestas densificadas**. Así, globalmente, se puede decir que proporcionalmente este componente postsináptico tiene la misma cantidad de membrana densificada que en las sinapsis normales y que está en total concordancia con la dotación de zonas activas presinápticas (***Ratio* longitudes de densificaciones pre-/postsinápticas inalterada**).

Está bien documentada la estrecha relación trófica existente entre la motoneurona y los miocitos que inerva, de tal manera que modificaciones en la motoneurona de tipo estructural y/o funcional (frecuencia y amplitud del impulso nervioso) inducen a modificaciones en el tipo de miofibrillas musculares e incluso puede modificarse el tipo de metabolismo muscular (de oxidativo a anaeróbico y viceversa; Días y Simpson, 1974; Foehring y cols., 1987a), asimismo, modificaciones en el patrón de contracción muscular varían las características estructurales y funcionales de la motoneurona que las inerva (Foehring y cols., 1987b; Wilson, 1988; ver Brown y Lunn, 1988 para revisión). En el presente trabajo se observan indicios de una posible influencia axonal sobre el componente postsináptico.

En conjunto, el área que ocupan los pliegues secundarios postsinápticos de las sinapsis ampliamente abandonadas decrece, pero esta reducción es menor que la observada para su axón (*Ratio* área pre- /post- , Tabla IX). Este hecho parece indicar la existencia de una reducción inicial del área axonal (retracción) y a su vez, esta pérdida puede inducir a la reducción del área postsináptica. Como se ha comentado anteriormente (en este apartado y en el capítulo de Resultados) se observan otros indicios sugestivos de pérdida de la acción trófica en estas sinapsis A.A.S. (por ejemplo, la porción subaxonal sufre reducciones de sus parámetros arquitecturales; Tabla IX). Sin embargo, pese a estos signos de pérdida de trofismo también se observa un incremento del número de porciones de sarcolema relacionadas con la neurotransmisión (% de crestas densificadas) lo que podría indicar que las variaciones observadas en el componente postsináptico subaxonal de las sinapsis A.A.S. pueden ser previas a la retracción axonal (ver concepto de predeterminismo en apartado VII.6.1.1.). Se puede argumentar, apoyando esta segunda propuesta, que muchas de las características estructurales observadas en el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S. también se producen en los sarcolemas abandonados (por ejemplo crestas más estrechas, características métricas de

las densificaciones de membrana).

Tanto si el axón en retracción está relacionado o no con los cambios postsinápticos como si estos son previos a la retracción axonal, parece evidente la necesidad de una mayor cantidad de membrana densificada postsináptica en situación subaxonal que, por otro lado, puede responder a la mayor diferenciación axonal de estructuras relacionadas con la neurotransmisión.

Desdiferenciación del sarcolema abandonado en las sinapsis A.A.S..

Para una mejor interpretación y análisis de los resultados del estudio las dimensiones de las crestas y de las oberturas conviene analizarlas junto con la *ratio* de sus amplitudes ya que, como se ha visto en el apartado anterior, pueden modificar sus amplitudes substancialmente aunque de una manera proporcionada. Por otro lado no hay que olvidar que, para una misma longitud de pliegue primario, las variaciones en las dimensiones de las crestas repercuten directamente en las dimensiones de las oberturas y viceversa. Así, en conjunto, crestas y oberturas adoptan un comportamiento diferente en función del grado de abandono del sarcolema en que estén, de manera que el análisis morfométrico de estas estructuras puede ilustrar acerca del grado de diferenciación postsináptica de las sinapsis A.A.S.. En este sentido, este estudio (Tabla IX) ha revelado que: (1) en el componente postsináptico subaxonal de las sinapsis A.A.S., respecto al de las sinapsis normales, disminuyen tanto la amplitud de crestas como de oberturas pero no se modifica la *ratio* entre ellas; (2) en el componente postsináptico subglial no se modifica significativamente ninguna de las dos amplitudes (aunque sí sus valores medios) y la *ratio* incrementa significativamente a favor de unas oberturas mayores; (3) el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. es el más desdiferenciado ya

que, respecto a las sinapsis normales, aumenta la amplitud de las oberturas y disminuye la de las crestas, de manera que la *ratio* decrece en un 25% a favor de las oberturas, en mayor potencia que bajo la glía (20 %, Tabla IX). Detectándose por tanto una tendencia general: siempre que el axón no está presente, se altera la relación de amplitudes entre cresta y obertura, a favor de oberturas mayores. Esta alteración de la *ratio* a favor de oberturas mayores parece ser el principal signo de desdiferenciación.

En las porciones de sarcolema abandonado (no cubiertas por el axón ni por la glía) de las sinapsis A.A.S., respecto a las sinapsis normales, también se observa que decrece el % de pliegue primario ocupado por cresta y las dimensiones de las densificaciones del sarcolema (Longitud media de las densificaciones y Penetración de las densificaciones por la obertura) (Tabla IX). En resumen, los signos de aparente desdiferenciación hallados bajo el axón están activamente compensados y, sin embargo, en condiciones de abandono esto no sucede. Por otro lado, se observa un comportamiento similar en las sinapsis con mínimo abandono (M.A.S., ver apartado VII.6.1.2). En conjunto, estos resultados indican claramente la existencia de una acción trófica del axón sobre el componente postsináptico, aunque este axón esté en fase de retracción. En la literatura se pueden encontrar múltiples evidencias de la acción trófica del axón sobre el músculo, que refuerzan las interpretaciones de los resultados expuestos en este trabajo (Días y Simpson, 1974; Foehring y cols., 1987a y b; Wilson, 1988). Por ejemplo, Foehring y colaboradores (1987a) intervinieron quirúrgicamente a roedores para crear una reinervación cruzada (*cross-reinnervation*) entre músculos de contracción rápida y lenta, y observaron cómo el axón nuevo provocó cambios sustanciales tanto de las características puramente musculares (conversión de un tipo de miocito en otro) como a nivel sináptico.

Posible acción trófica de la célula de Schwann sobre el sarcolema subglial.

A nivel del sarcolema subglial la desdiferenciación observada no es tan acusada como la del sarcolema abandonado. Este hecho podría interpretarse como si la célula de Schwann tuviese cierta capacidad para mantener algunas características postsinápticas. El **% del pliegue primario ocupado por crestas** y las amplitudes de crestas y de oberturas no varían significativamente en el sarcolema subglial en comparación con los valores de estos parámetros en las sinapsis normales. Sin embargo, estas amplitudes presentan una suficiente variación en sus medias como para variar la *ratio* entre crestas y oberturas (como sucede en condiciones de total abandono; ver Tabla IX). La presencia de procesos gliales sobre el sarcolema de las sinapsis A.A.S. también induce una cierta capacidad de mantenimiento dentro del rango de los valores de los parámetros de las sinapsis normales a algunas características de las densificaciones postsinápticas (como por ejemplo la **Longitud media de las densificaciones**). Sin embargo, los parámetros **Penetración de las densificaciones** y el grado de densificación de las crestas (**% crestas densificadas**) escaparían al control glial (Tabla IX). La posible acción trófica de la célula de Schwann sobre el componente postsináptico es motivo de controversia, sin embargo está ampliamente documentada (Birks y cols., 1960; Krause y Wernig, 1985; Somasekhar y Ko, 1991; Reynolds y Woolf, 1992). En este sentido, en músculos de anfibio denervados experimentalmente se ha podido comprobar que la morfología del componente postsináptico abandonado por el axón (el axón degenera y desaparece tras la denervación) pero cubierto por procesos gliales puede mantener hasta 130 días un aspecto cualitativamente similar al observado a los 15 días de la denervación (Birks y cols., 1960). Esta capacidad trófica de la célula glial sobre el componente postsináptico es extensiva a las moléculas de la matriz extracelular, como por ejemplo las aglutininas (Somasekhar y Ko, 1991). Krause y Wernig (1985) que atribuyen claramente a la célula de

Schwann capacidades tróficas, propias del axón, en músculos denervados de anfibio ya que se mantiene la agregación de las moléculas de receptor de la acetilcolina (AChR) únicamente en los sarcolemas subgliales. Es interesante resaltar que las moléculas de AChR son parcialmente responsables de las densificaciones de las membranas crestales (Salpeter, 1987b). Así, la propuesta de Krause y Wernig queda corroborada con el presente estudio, en cuanto a las características de las membranas densificadas subgliales.

Del estudio de los parámetros de las membranas densificadas en situación subglial, sorprende la disminución de penetración de las densificaciones descrita, sobretudo porque estas densificaciones tienen una longitud media inalterada y están localizadas sobre unas crestas que tampoco han variado su anchura media. Posiblemente este fenómeno esté relacionado con la diferente morfología que adoptan estas crestas en situación subglial respecto a la situación subaxonal (ver Tabla V). Las crestas situadas bajo la célula de Schwann son fundamentalmente de los tipos II y V con disminución relativa de las III y IV. La morfología crestal II parece ser la más específica de esta forma de abandono sináptico, y es precisamente esta morfología la que presenta una cúpula más abombada o convexa (anteriormente -apartado VII.3.- se ha comentado que el tipo I no corresponde a una morfología real) (ver Figura 6 en el capítulo de Material y Métodos). Posiblemente, debido a esta extrema convexidad, para una misma longitud media de las densificaciones y para una misma anchura de cresta, estas densificaciones penetran relativamente menos por el pliegue secundario que si estas crestas tuviesen una morfología menos convexa. De momento, no es posible contrastar estos resultados, dado que el análisis de las crestas es, hasta la fecha, un aspecto no analizado de la ultraestructura neuromuscular.

Características de los pliegues secundarios de las sinapsis A.A.S. en función del grado de abandono axonal.

Habitualmente los pliegues secundarios de las uniones mioneurales de mamíferos son tortuosos y, sobre todo, en músculos de contracción rápida como lo es el músculo E.D.L. (Ogata y cols, 1967; Ellisman y cols, 1976). Así pues, es frecuente encontrar pliegues secundarios seccionados longitudinalmente a nivel de la obertura y seccionados transversal y/o oblicuamente en niveles más profundos, eso mismo ocurre en las posibles ramificaciones laterales al eje principal del pliegue. Por este motivo el valorar el número de secciones (longitudinales, oblicuas y transversales) que presentan los pliegues secundarios puede dar una idea aproximada del grado de tortuosidad-complejidad-ramificación de estos. Parece haber cierta relación entre el grado de abandono y la cantidad de secciones de los pliegues secundarios (ver Tabla IX). Respecto a las sinapsis normales, en el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S. el número de secciones por obertura se incrementa ligera pero significativamente, sin embargo hay un decremento importante tanto bajo la glía como a nivel del sarcolema abandonado. Este indicador del grado de tortuosidad o complejidad de los pliegues muestra que cuando el sarcolema no se relaciona directamente con el axón los pliegues tienen un recorrido más lineal (son más simples), y solo la presencia del axón les imprime tortuosidad. El grado de tortuosidad de los pliegues secundarios podría estar relacionado con la activación del citoesqueleto de estos durante la neurotransmisión o por alguna proteína de membrana con capacidad organizativa que precise del axolema (por ejemplo agrinas -Lieth y cols., 1992-; ver también apartado VII.5.2.2.). En cualquier caso, la simplicidad de estos pliegues secundarios puede ser un elemento más del fenómeno de diferenciación descrito para el componente postsináptico subaxonal en las sinapsis A.A.S. de la serie control. De momento, no es posible contrastar los resultados referentes a la "tortuosidad-complejidad" de

los pliegues secundarios dado que el estudio cuantitativo de este fenómeno es, hasta la fecha, un aspecto no analizado de la ultraestructura neuromuscular.

Por otro lado, respecto a las sinapsis normales, la **longitud media de los pliegues secundarios** en las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.) no varía en situación subaxonal y decrece en todas las situaciones de abandono (aunque sólo de forma significativa en la situación subglial) (Tabla IX). En cuanto al comportamiento de los pliegues secundarios en las sinapsis A.A.S. se puede generalizar que siempre que el axón está ausente (subglial y abandonado), tanto la tortuosidad como la profundidad de los pliegues disminuye. Este hecho es un signo más de desdiferenciación postsináptica. Inexplicablemente, este decremento es más intenso en el sarcolema relacionado con la célula glial (Tabla IX)

Organoides del sarcoplasma de las sinapsis A.A.S.

La presencia de vesículas *coated* postsinápticas supone la existencia de recambio de membrana, aporte de proteínas neosintetizadas o recicladas y secuestro de las proteínas desgastadas (Pearse y Bretscher, 1981). En este sentido, se ha propuesto (ver Pumplín y Bloch, 1990) que, tanto en el período embrionario como en la edad adulta, las vesículas *coated* postsinápticas participan en la internalización de muchas proteínas de membrana y la inserción de moléculas de AChR neosintetizadas. El sistemático incremento de vesículas *coated* en los tres sarcolemas de las sinapsis ampliamente abandonadas (subaxonal, subglial y abandonado) de la serie control puede estar relacionado con los cambios descritos en los pliegues secundarios (amplitud de crestas, longitud de pliegues, variaciones en longitud y presencia de membranas densificadas, etc.).

En las sinapsis A.A.S. no se modifica la dotación de la maquinaria relacionada con el metabolismo del componente postsináptico, que vendría representada en el presente estudio por las mitocondrias y los lisosomas presentes en el sarcoplasma subsináptico. Estas organelas, aunque incrementan sus valores medios respecto a lo normal, no lo hacen de forma significativa. A nivel del componente presináptico tampoco se detecta una variación significativa de organelas relacionadas con el metabolismo axonal respecto al axón normal. Este hecho se podría interpretar como que el fenómeno de abandono no comporta un significativo incremento de actividad metabólica a ningún nivel de las sinapsis A.A.S. o, indirectamente, puede reforzar la hipótesis que sugiere la existencia de un predeterminismo sináptico en que estos cambios observados en las sinapsis A.A.S. sean previos al proceso de abandono axonal.

VII.5.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS A.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.

VII.5.2.1. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE PRESINAPTICO.

Este trabajo ha permitido evidenciar que el axón de las sinapsis A.A.S. prácticamente no modifica su estructura con el incremento de actividad aplicado en el presente trabajo (ver Tabla X). Este dato podría indicar que la diferenciación de la maquinaria de neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas) descrita en los axones de las sinapsis A.A.S. de la serie control podría ser suficientemente adecuada para absorber el incremento de actividad fisiológico aplicado.

Por otro lado, como se ha sugerido anteriormente en el apartado VII.2.1., la población de sinapsis A.A.S. cuantificada en la serie control puede no ser la misma que se estudia en

la serie de actividad. Se ha sugerido anteriormente la posible existencia de un "flujo de conversión sináptica en dirección hacia el mayor abandono" en relación con el incremento de actividad locomotora. Según este "flujo" la población de sinapsis A.A.S. que se estudia en este apartado (serie I.F.A.) puede provenir, en parte, de determinadas sinapsis M.A.S. y de sinapsis A.A.S. preexistentes; mientras que las sinapsis A.A.S. amplia y extensivamente abandonadas (con más de 9 pliegues abandonados) cuantificadas en la serie control pueden ya no pertenecer a la población A.A.S. en la serie de incremento de actividad. Pese a estos posibles cambios de la población de sinapsis ampliamente abandonadas en la serie de incremento de actividad, la marcada analogía de los parámetros que definen a los axones de las sinapsis A.A.S. en la serie control y en la serie de incremento de actividad sugiere la existencia de un determinado "status" que caracteriza a estos axones en el músculo EDL de rata.

En estos axones (A.A.S.) se observa un decremento del diámetro de las vesículas sinápticas así como un importante decremento en la densidad de las vesículas *core* respecto a sus homólogos de la serie control (Tabla X). Siguiendo la hipótesis avanzada en el apartado VII.4.1.1 (análisis del componente presináptico en las sinapsis A.A.S. de la serie control) referente a las subpoblaciones de vesículas sinápticas, en los axones de las sinapsis A.A.S. de los músculos entrenados ya no se puede suponer la existencia de un mayor aporte desde el soma neural de V.S., los resultados que se analizan en este apartado parecen indicar, indirectamente, un incremento en la actividad neurotransmisora, el cual se ve reflejado en la existencia de vesículas sinápticas de menor diámetro presumiblemente procedentes del reciclaje del material neurotransmisor (VP2) (ver Heuser, 1989 a y b).

VII.5.2.2. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE POSTSINÁPTICO.

Este estudio revela, a nivel del componente postsináptico de las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad, la existencia de signos de una mayor actividad metabólica que en la serie control. Ya que, respecto al sarcoplasma homólogo de la serie control, se observa un incremento del 1200% de densidad mitocondrial y del 2500% de densidad lisosomal (Tabla XI). Este masivo incremento de las estructuras relacionadas con el metabolismo postsináptico en las sinapsis A.A.S. puede reflejar, indirectamente, un incremento en la actividad neurotransmisora y suplir además las necesidades derivadas (recambio de membranas, proteínas). Este hallazgo no tiene relación con el habitual incremento de mitocondrias en un miocito entrenado: (1) el músculo EDL no precisa del metabolismo oxidativo mitocondrial para su contracción, por poseer mayoritariamente fibras musculares del tipo I; ver Both y Thomason, 1991 para revisión) y, por otro lado, (2) el sarcolema sináptico es relativamente autónomo del resto del miocito, confirma esta autonomía el hecho de que no todos los componentes postsinápticos de la serie de incremento de actividad presenten un aumento significativo de densidad mitocondrial (ver Tablas VII, XVIII y XXI).

Por otro lado, la existencia de cambios estructurales postsinápticos está relacionado con el número de vesículas *coated* asociadas a los pliegues secundarios (Pearse y Bretscher, 1981). Así por ejemplo, se observa un incremento de estas vesículas en el sarcolema subaxonal y abandonado, y precisamente en estos sarcolemas es donde se observan unos mayores cambios estructurales (Tablas XI y XII). Esta asociación está reforzada por el hecho de que en el sarcolema subglial de estas sinapsis A.A.S., donde no se observan cambios trascendentales, el número de vesículas *coated* no varía significativamente (Tabla XII).

Componente postsináptico subaxonal en las sinapsis A.A.S de músculos entrenados.

Contrariamente a lo descrito para el axón de las sinapsis A.A.S. en la serie de incremento de actividad, el componente postsináptico situado bajo estos axones sufre sustanciales modificaciones estructurales orientadas, en términos generales, hacia una magnificación de las densificaciones de las membranas crestales. En este sentido, la amplitud de las crestas subaxonales de la serie de incremento de actividad es mayor que en la serie control, así la alteración de la *ratio* entre amplitud de crestas y oberturas en este sarcolema indica una reestructuración de los pliegues secundarios orientada a ofrecer una mayor superficie crestal. La redistribución mencionada incluye un incremento de la longitud de los pliegues secundarios así como una simplificación en su recorrido intra-sarcoplasmático (ver Tabla X). Como se ha mencionado, el marcado incremento de vesículas *coated* asociadas a los pliegues secundarios puede también estar relacionado con los cambios observados en el sarcolema subaxonal que se está considerando.

Por otro lado, es bien conocida la dinámica de las moléculas de receptor de acetilcolina (AChR) en relación al estímulo axonal. Así por ejemplo, la denervación o axotomía provoca la dispersión de estas moléculas por la superficie del miocito y viceversa, la reinervación los agrupa (Lomo y Rosenthal, 1972). Ligado a este proceso está descrita la existencia de ciertas moléculas de la lámina basal sináptica con determinada capacidad organizativa (Salpeter, 1987 a y b, para revisión). Se han identificado algunas de estas moléculas, las más relevantes parecen ser de la familia de las agrinas (Reist y cols, 1987, para revisión). En el período embrionario las agrinas pueden ser las responsables del fenómeno de agregación de las moléculas de AChR a nivel sináptico y ya en la edad adulta contribuyen a su mantenimiento (Ferns y Hall, 1992).

Lieth y colaboradores proponen en un reciente trabajo (1992) que la capacidad organizativa de las agrinas puede tener imbrincaciones con la arquitectura postsináptica además de la reconocida capacidad de agregación de las moléculas de AChR.

En las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad se observa un marcado incremento de membrana densificada a nivel subaxonal. Como se ha comentado anteriormente, las moléculas de AChR contribuyen a conformar estas densificaciones (Salpeter, 1987b). En base a los trabajos de los equipos de Reist y de Lieth anteriormente comentados, se puede sugerir que el incremento de densificaciones de membrana en este sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S. esté mediado por moléculas del tipo de las agrinas y posiblemente estas moléculas intervengan también en los cambios arquitecturales hallados a este nivel.

Por otro lado, los cambios del sarcolema subaxonal también pueden responder al incremento de actividad neurotransmisora detectado a nivel presináptico. Como se ha señalado, refuerza esta alternativa la masiva presencia de mitocondrias y lisosomas detectada en el sarcoplasma de las sinapsis A.A.S..

Componente postsináptico subglial en las sinapsis A.A.S. en músculos entrenados.

El componente postsináptico en situación subglial de las sinapsis A.A.S. prácticamente no presenta variaciones, respecto al sarcolema homólogo de la serie control, ni en su arquitectura ni en el sarcolema densificado (Tabla XII). Estos datos refuerzan la idea avanzada anteriormente de que la glía puede desarrollar determinadas acciones tróficas o de estabilización del componente postsináptico (apartado VII.5.1.2.).

En cuanto a la membrana densificada subglial, el incremento de la penetración de las

densificaciones por la obertura de los pliegues es el único parámetro que varía (véase Tabla XII). Por ejemplo, con el incremento de actividad no se ve alterada ni la **amplitud de las crestas** ni la **longitud media de las densificaciones**. Esta aparente incongruencia cuantitativa puede ser razonada en base del estudio cualitativo de la morfología de las crestas (ver Tabla V). Como se comentó anteriormente (apartados VII.3.1. y VII.3.2.), en condiciones de **incremento de actividad**, en la situación subglial predomina la morfología crestal del tipo IV. Se comentó anteriormente también (ver Figura 6 en capítulo de Material y Métodos) que la morfología IV presenta una convexidad apical menos pronunciada que la morfología II, y, por otro lado, la morfología II es la predominante en situación subglial en la serie control. Así, para una misma amplitud crestal y longitud media de las densificaciones, la menor convexidad de las crestas subgliales en la serie de incremento de actividad podría justificar la mayor penetración de las densificaciones en este sarcolema.

Así el único parámetro, con trascendencia funcional, que varía en el sarcolema subglial de las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad puede ser justificable por variaciones meramente mecanicistas sin que esto sea indicativo de una modificación real de las características métricas de las membranas densificadas subgliales.

Componente postsináptico abandonado en las sinapsis A.A.S. en músculos entrenados.

En el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. de la serie de incremento de actividad se observa una desdiferenciación (ver Tabla XII) que no es tan acusada como la descrita para este sarcolema en la serie control. Al igual que en el sarcolema subaxonal, en este sarcolema también se observa un incremento de los parámetros de arquitectura crestal (**Amplitud crestas** y **Ratio amplitud crestas/oberturas**) y de las características métricas de

la membrana densificada (**Longitud media densificaciones y Penetración de las densificaciones por la obertura**). Esta asociación (parámetros crestaes y de membrana densificada) es similar a la descrita en el sarcolema subaxonal en estas sinapsis y puede estar relacionado con las proteínas de la lámina basal sináptica con capacidad organizativa del tipo de las agrinas. La circunstancia de encontrar un sarcolema abandonado con características subaxonales puede ser debida a la relativa celeridad en la conversión plástica actividad-dependiente comentada anteriormente (apartado VII.2.1.). Según este razonamiento, el sarcolema subglial que se estudia en este apartado puede estar recientemente abandonado por el axón, lo cual justificaría las características morfométricas que lo asemejan a un sarcolema subaxonal.

VII.6. ANALISIS DE LAS SINAPSIS MINIMAMENTE ABANDONADAS (M.A.S.).

En el presente estudio se ha seguido un criterio ultraestructural de clasificación de las sinapsis neuromusculares que, a diferencia de la clasificación convencional (ver Wernig y Herrera, 1986) contempla el grado de abandono axonal en función del número de pliegues secundarios abandonados. Así, las "sinapsis parcialmente abandonadas" del concepto convencional quedan subdivididas en dos tipos: sinapsis mínimamente abandonadas o M.A.S. (uno o dos pliegues abandonados) y ampliamente abandonadas o A.A.S. (más de uno o de dos pliegues secundarios abandonados) (ver apartado V.6. en el capítulo de Material y Métodos). Este concepto de clasificación en función del número de pliegues secundarios abandonados no ha sido documentado hasta la fecha, así los resultados morfométricos obtenidos del estudio de las sinapsis M.A.S. no es posible contrastarlos con otros estudios.

VII.6.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS M.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.

VII.6.1.1. COMPONENTE PRESINAPTICO.

Similitud entre los axones de las sinapsis A.A.S. y M.A.S. de la serie control.

Analizados en conjunto, los resultados del análisis morfométrico de los axones de sinapsis M.A.S. y A.A.S. en el músculo EDL control, muestran evidentes similitudes (Tabla XIII), esta similitud se da tanto a nivel estructural (**Area, Perímetro, Ratio perímetro/área** o anfractuosidad) como a nivel de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas). Solamente la **longitud media de las Z.A.** (zonas activas) es igual a la observada en las sinapsis normales, pero este hecho está compensado,

incluso superado, por un incremento en el número de Z.A. (similar al observado en las sinapsis A.A.S.) que provoca un aumento muy importante (en más del 100%) de los parámetros que relacionan las zonas activas con el perímetro axonal (% del perímetro ocupado por Z.A. y % del axolema sináptico ocupado por Z.A.). Dichos parámetros superan, incluso, los valores obtenidos en los axones de las sinapsis A.A.S. (ver Tabla XIII).

Esta marcada similitud entre los axones de las sinapsis M.A.S. y A.A.S. indica también que las formas mínimamente abandonadas presentan su axón en fase de retracción. Alternativamente, la importante amplitud observada en la hendidura sináptica puede sugerir que estas sinapsis presentan un axón en fase de crecimiento o reinervación (*sprout*) (ver Wernig y Dorlöchter, 1989). En estos axones de las sinapsis mínimamente abandonadas se observa un grado de anfractuosidad similar al de las sinapsis A.A.S., y tal como ya se argumentó en su momento (apartado VII.5.1.1.), este parámetro apunta a favor de la retracción axonal. La importante amplitud de la hendidura sináptica podría estar relacionada con los mecanismos que conducen a la retracción axonal. Sin embargo, la marcada diferenciación de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión en los axones de las sinapsis M.A.S. (vesículas sinápticas y zonas activas) no avala tampoco que se trate de axones en fase de crecimiento (*sprout*) dado que es conocido que la ultraestructura de los *sprout* maduros presenta de forma característica una importante densidad de vesículas *core*, pobreza de vesículas sinápticas y ausencia de agregados de vesículas sinápticas en las proximidades del axolema (Burmeister y cols, 1988; ver también Dailey y Bridgman, 1991). En resumen, los axones de las sinapsis M.A.S., al igual que los de las sinapsis A.A.S., están en fase de retracción.

Posibles mecanismos relacionados con el proceso de retracción axonal en los músculos control.

Existe una marcada analogía entre los procesos que conducen a la eliminación de sinapsis redundantes en el período perinatal y los que conducen a la retracción axonal en el adulto normal (Herrera y Werle 1990). En el proceso de eliminación sináptica perinatal intervienen unas proteasas calcio-dependientes (Calcium-Activated Neutral Proteasa o CANP) que pueden justificar en gran medida este fenómeno. En relación a este proceso de eliminación sináptica, Gerta Vrbová y colaboradores (1988) proponen un interesante modelo que, dentro del campo de la hipótesis, puede explicar como se eliminan las sinapsis redundantes. Este modelo, de forma sumariada, es el siguiente: al inicio de la actividad motora perinatal aparecen iones K^+ de origen muscular que activan los canales de calcio voltaje-dependiente del axón lo que ocasiona la entrada de calcio (Ca^{2+}) al axoplasma; el incremento de calcio intra-axonal activa las proteasas CANP que digieren parte del citoesqueleto de la terminación provocando la retracción axonal y en último extremo la eliminación del contacto sináptico. Estos autores argumentan también, que una mayor rapidez de "empapamiento" del axolema por calcio en determinadas terminaciones (con una *ratio* superficie del axolema/ volumen del axoplasma que lo favorezca como es el caso de las terminaciones más pequeñas) puede ser el responsable de la eliminación preferente de las terminaciones de menor calibre durante el período perinatal. En los músculos adultos control estudiados en el presente trabajo se confirman varios puntos de la propuesta formulada por Vrbová y colaboradores, concretamente: (1) Los axones en fase de retracción (los de las sinapsis A.A.S. y los de las sinapsis M.A.S.) en la serie control son más pequeños que en las sinapsis normales; (2) el aumento de anfractuosidad descrito en estos axones podría responder a la destrucción parcial del citoesqueleto axonal con el subsiguiente plegamiento del axolema. (3) La entrada de ión calcio

podría estar favorecida por la importante dotación de zonas activas observada en estos axones, las zonas activas son agregados de canales de calcio (Robitaille y cols, 1990). Pese a estas analogías, la propuesta de Vrbová y colaboradores no justifica la importante diferenciación de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión observadas en el presente trabajo para los axones en retracción (M.A.S. y A.A.S.).

Cabe la posibilidad de que, en un momento dado, exista un fracaso en las interacciones tróficas entre el axón y el componente postsináptico (ver Wernig y Dorlöchter, 1989). A nivel somato-sensorial esto provocaría un incremento en la producción de NGF (factor de crecimiento neural). A nivel neuromuscular se ha especulado la participación de sustancias con características similares al NGF (ver Slack y cols, 1983 para revisión). La participación de un factor neurotrófico en las sinapsis M.A.S. y A.A.S. podría ser el responsable de la diferenciación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión. En relación a esto, se ha comentado en el estudio de los axones de las sinapsis A.A.S. la posibilidad de un reciente aporte de vesículas sinápticas (VP1) y de vesículas *core* (apartado VII.5.1.1.), y sin embargo no se detectan indicios concluyentes de una mayor actividad neurotransmisora; estos datos podrían interpretarse en base a la participación de alguna sustancia neurotrófica. En la literatura abundan los trabajos que apuntan hacia una modificación en la producción de factores de crecimiento o trofismo neural en relación al nivel de actividad neuromuscular (Brown y cols., 1981b; Slack y cols., 1983; Wernig y Herrera, 1986; Wernig y Dorlöchter, 1989; Herrera y Werle, 1990). Por ejemplo Tomas y colaboradores (1989a) en un estudio previo al aquí expuesto, proponen la participación de alguna sustancia similar al *Motor Nerve Growth Factor* (MNGF) en los cambios estructurales en el patrón de ramificación de las sinapsis neuromusculares observadas en músculos EDL de ratas adultas sometidas a

variaciones en el nivel de actividad locomotora (tanto incremento como decremento) dentro de umbrales de lo fisiológicos. De forma similar, Rosenheimer y Smith (1990) en un estudio realizado con músculos de mamíferos seniles, atribuyen las modificaciones observadas en la morfología sináptica a la producción de alguna sustancia trófica derivada del músculo; estos autores sugieren también que el incremento de producción de este agente neurotrófico es debido a una alteración en la relación entre la motoneurona y el músculo. A nivel del sistema nervioso central, Needels y colaboradores (1986) sugieren también la participación de algún agente neurotrófico relacionado con el nivel de actividad sináptico y postulan que por ese motivo están más exacerbados los signos de remodelación sináptica en animales seniles (menor actividad nerviosa) que en animales jóvenes (nivel de actividad nerviosa mayor). Esta asociación entre el nivel de actividad locomotora y la plausible producción de algún agente neurotrófico se puede intuir en otros modelos experimentales (ver Peretz, 1992 para revisión).

En resumen, las ramas axonales en retracción podrían haber interrumpido, eventualmente, su influencia sobre el componente postsináptico y este, al ver disminuido su nivel de actividad, podría responder con un incremento de producción de sustancias inductoras del crecimiento o trofismo neural.

Por último, cabe proponer que la dotación previa, tanto enzimática como estructural, de las diferentes ramas axonales o de las diferentes motoneuronas que inervan un determinado músculo no sea idéntica y que hayan substanciales diferencias predeterminadas en un músculo dado. En el período embrionario están descritas muchas evidencias acerca de este posible predeterminismo. Los estudios de LeDouarin (1980) son un buen ejemplo de ello, tras demostrar una marcada predeterminación genética en la migración de las neuronas simpáticas y

parasimpáticas desde la cresta neural a su destino concreto. En los músculos adultos (sobretudo de anfibios) está demostrada la existencia de diferente "eficacia sináptica" (número de impulsos por minuto) entre diferentes ramas de una misma terminación y diferentes motoneuronas (Tremblay y cols., 1984; ver también Robitaille y Tremblay, 1987). Grinnell y Herrera (1980) no hallan diferencias morfométricas en la ultraestructura de las sinapsis neuromusculares de dos músculos muy similares (*Sartorius* y *Cutaneous pectoris*) y en cambio observan importantes diferencias en cuanto al grado de neurotransmisión. Posteriormente, Banner y Herrera (1986) en un estudio similar al anterior, proponen que las discrepancias en cuanto a la efectividad sináptica pueden ser debidas a un diferente nivel de aporte metabólico desde el soma neural, además correlacionan un mayor grado de eficacia sináptica con una mejor dotación de zonas activas. En este sentido, son abundantes los trabajos que señalan hacia un diferente grado de eficacia sináptica o capacidad de liberar el neurotransmisor según determinadas regiones de una misma arborización, generalmente relacionado con importantes variaciones ultraestructurales (ver Robitaille y Tremblay, 1987 para revisión). A la luz de estos trabajos se puede sugerir que la dotación de proteasas calcio-dependientes (CANP) propuestas por Vrbová y colaboradores (1988) presentes en diferentes axones muestren una grandísima variabilidad que justifique la retracción axonal de determinados axones (A.A.S. y M.A.S.) para un mismo nivel de actividad y/o una diferente dotación previa de las estructuras relacionadas con la neurotransmisión y/o un diferente nivel de eficacia sináptica de tal forma que los axones menos efectivos entren en la dinámica de los factores tróficos anteriormente comentados. En este sentido, Robitaille y Tremblay (1987) en una revisión del tema, sugieren que la no-uniformidad en la liberación del neurotransmisor en una misma arborización nerviosa motora puede ser la base de la plasticidad morfológica de las sinapsis neuromusculares. Los resultados obtenidos en el presente estudio entrarían en la línea de esta

propuesta.

Nivel de diferenciación de los axones de las sinapsis M.A.S. ¿superior al de los axones de las sinapsis A.A.S.?

El análisis de los resultados del estudio morfométrico ultraestructural de las sinapsis M.A.S. del músculo EDL de la serie control ha permitido, en el capítulo de Resultados (ver apartado VI.5.1.1.) establecer una serie de parámetros que se han considerado como "característicos" de las formas M.A.S. (Separación axón-postsináptico, Separación glía-postsináptico, % de axoplasma ocupado por V.S. y % de perímetro axonal ocupado por Z.A.) por adoptar niveles máximos o bien mínimos de entre los tres axones de la serie control (normales, A.A.S. y M.A.S.). De entre estos parámetros cabe destacar el % de axoplasma ocupado por V.S. y el número de Z.A. por μm de axolema ya que adoptan los valores mas altos de los tres axones considerados; y estableciendo una gradación de los valores de estos dos parámetros, de menor a mayor, se obtiene que: en el axón de las sinapsis normales adoptan el valor mínimo, en el axón de las sinapsis A.A.S. adoptan un valor intermedio y en el axón de las sinapsis M.A.S. adoptan el valor máximo. Esto podría indicar una mayor dotación en la maquinaria relacionada con la neurotransmisión para las formas con mínimo abandono (M.A.S.), maquinaria que se desgastaría al pasar a un abandono más amplio (A.A.S.), como se ha sugerido anteriormente. Otro grupo de parámetros característicos de las formas M.A.S. son los referentes a la hendidura sináptica. La importante separación entre el axón y la célula glial del componente postsináptico podría estar también relacionado con los mecanismos de retracción presináptica comentados anteriormente (ver apartado VII.5.1.1.).

Por otro lado, los axones A.A.S. y M.A.S. (en retracción) presentan una mejor dotación de la maquinaria de la neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas) que los axones de las sinapsis normales. Esta mejor dotación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión es la característica que define la "diferenciación presináptica". En este punto se plantea la siguiente cuestión, avanzada en parte anteriormente, ¿los axones más diferenciados son los que se retraen o es el proceso de retracción el que induce además estas especificidades?. En la serie control, los cambios postsinápticos observados bajo el axón A.A.S. (ver Tabla IX) tienden a confirmar una aparente desdiferenciación, tanto meramente estructural (reducción de la amplitud de las crestas y de las oberturas) como de algunas de las características de la membrana densificada (parámetros de longitud de las densificaciones) pero con un importante factor de compensación como es el aumento del % de crestas densificadas. Así globalmente, estos resultados sugieren que el componente postsináptico subaxonal de las sinapsis A.A.S. en la serie control pueda tener la misma membrana densificada que el de las sinapsis normales, y que ésta sea totalmente acorde con la dotación de zonas activas presinápticas (*Ratio longitud densificaciones pre-/post-* invariada). Así pues, al igual que en el componente presináptico, las sinapsis A.A.S. de la serie control también podrían presentar una mayor diferenciación postsináptica de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión, que la observada en las sinapsis normales.

El axón de las formas con mínimo abandono (M.A.S) presenta una extraordinaria similitud con el axón de las sinapsis A.A.S. que se acaba de describir (ver Tabla XIII). Esta similitud sería sugestiva de un grado de diferenciación análogo entre estas dos categorías de presináptico sino fuese porque algunos parámetros de los axones M.A.S. superan a los axones A.A.S. en esta tendencia diferenciadora. En este sentido es de resaltar el importantísimo incremento del % de axolema ocupado por Z.A. (zonas activas) en los axones con mínimo

abandono (M.A.S.) (trascendente desde el punto de vista de la neurotransmisión -Linstedt y Kelly, 1991; Trimble y cols, 1991). Teniendo presente que las sinapsis M.A.S. representan la mínima expresión de abandono axonal, y que además, desde el punto de vista de la neurotransmisión, están más diferenciadas que las sinapsis normales e incluso que las A.A.S., se podría sugerir que las sinapsis normales (previamente más diferenciadas), podrían evolucionar hacia formas sinápticas de mínimo abandono (M.A.S.) y posteriormente, hacia un abandono mayor (A.A.S.). Las sinapsis con amplio abandono (A.A.S.) podrían estar relativamente desgastadas o envejecidas y, aunque más diferenciadas que la media de las sinapsis normales, lo serían menos que las de mínimo abandono (M.A.S.). Este proceso podría estar relacionado con la dotación presináptica previa de CANP (Vrbová y cols., 1988; ver apartado VII.6.1.1.), en donde, para un mismo nivel de actividad, el diferente comportamiento de los axones normales podría estar predefinido por una posible dotación previa, cuantitativamente diferente, de estas enzimas.

Sin embargo, aún existen algunos parámetros ultraestructurales de las sinapsis M.A.S. que no han llegado a ser iguales (de $P > 0.05$) a los de las sinapsis con amplio abandono (A.A.S.). Por ejemplo, las densidades tanto de vesículas sinápticas (Número de V.S./ μm^2 de axoplasma) como de vesículas *core* (Número de vesículas *core*/ μm^2) posiblemente aún no adoptan los valores de las sinapsis A.A.S. debido a que estas vesículas tiene una mas lenta evolución ya que su dinámica depende, en gran medida, de una aportación independiente por el transporte axoplásmico desde el soma neural (Bonzelius y Zimmermann, 1990). La existencia de unas zonas activas con una longitud media igual en los axones de las sinapsis normales y M.A.S., es decir que aún no adopta valores de las sinapsis A.A.S., puede apuntar también hacia una gran estabilidad de estas estructuras (zonas activas), que por otro lado sí

que incrementan su número (Tabla XIII). Así las zonas activas de los axones M.A.S. de la serie control parecen más modificables en número que en longitud.

A la luz de los anteriores resultados se puede deducir que los cambios axonales son previos a las modificaciones en el componente postsináptico. Estos resultado corroboran la existencia, bien documentada, de interacciones tróficas del axón sobre el componente postsináptico (Días y Simpson, 1974; Foehring y cols., 1987a y b; Brown y Lunn, 1988; Wilson, 1988) (ver también el apartado VII.5.1.2.).

En este contexto, Tomás y colaboradores (1989a) en un trabajo previo al que aquí se discute, observaron a nivel óptico como el componente presináptico sufre una "compactación" de sus arborizaciones por pérdida de ramas axonales y acortamiento global de la terminación con el incremento de actividad fisiológico. Presumiblemente, para el nivel de actividad locomotora de los animales control del presente estudio también se puedan producir fenómenos similares a la "compactación". En función del nivel de actividad sináptica, y para un mismo grado de "actividad control" (el cotidiano para los animales control estabulados en condiciones estándar), se producirían ciertos cambios presinápticos y estos cambios vendrían seguidos de una posterior acomodación postsináptica, inicialmente a un nivel mínimo (M.A.S.) y posteriormente, con el progresivo aumento del grado de abandono (A.A.S.), avanzando hacia una desdiferenciación postsináptica mayor (T.A.S.).

Estructuras y organoides estables en los axones de la serie control.

El análisis de los resultados de este estudio ultraestructural neuromuscular no sólo pretende conocer con exactitud los cambios que se producen en función de los mecanismos

que gobiernan el remodelamiento sináptico en condiciones fisiológicas, sino también detectar cuales son, si las hay, las estructuras y organoides presinápticos mas estables, es decir, que no varían.

En los tres axones estudiados (normales, M.A.S. y A.A.S.) del músculo EDL control no existe ninguna variación significativa en el **% de axoplasma ocupado por mitocondrias** (aunque el resto de parámetros relativos a la actividad metabólica del axón -lisosomas, retículo endoplasmático liso- muestran determinadas variaciones -comentadas en su momento-). Cabe indicar que el hecho de que las mitocondrias no sean autóctonas de la terminación nerviosa, si no que dependen de un transporte axoplásmico relativamente lento desde el soma neural (Dailey y Bridgman, 1991), contribuya a esta constancia. Aunque todo apunta hacia la existencia de una determinada especificidad o diferenciación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión en los axones de las formas con abandono (A.A.S. y M.A.S.), podría ocurrir que la dotación de mitocondrias estuviese dentro de un margen suficiente como para suplir las necesidades metabólicas que pueda suponer esta diferenciación axonal.

En cuanto a la maquinaria relacionada con la neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas), se han observado importantes cambios de arquitectura presináptica. Por ejemplo, la reducción de área y perímetro axonal de las formas con abandono (A.A.S. y M.A.S.) respecto a las normales. Sin embargo, el grado de encaramiento de las zonas activas con las oberturas postsinápticas se mantiene invariable en todos axones estudiados (**% de Z.A. encaradas**; Tabla XIII). El hecho de que en las formas de abandono (A.A.S. y M.A.S.) se observen unos axones más pequeños con un componente postsináptico globalmente de igual longitud podría indicar una simple supresión de porciones del axón. Si esto fuese así no solo se observaría un grado de encaramiento inalterado si no que también serían invariables el resto de parámetros referentes a zonas activas (como por ejemplo, el **% del axolema sináptico**

ocupado por Z.A. o el número de Z.A. por μm de axolema). Se puede interpretar que la reducción de dimensiones del axón no ha sido meramente estructural y que las densificaciones del axolema (Z.A.) se han acomodado a la nueva situación incrementando su número al tiempo que manteniendo activamente la orientación respecto al componente postsináptico.

VII.6.1.2. COMPONENTE POSTSINÁPTICO.

Como se argumentaba a nivel presináptico, se puede sugerir que para que tengan lugar los cambios estructurales postsinápticos observados tampoco se precisa de un mayor apoyo energético o, dicho de otra forma, que estos cambios tienen lugar dentro del margen de capacidad de las mitocondrias preexistentes. Ya que todos los componentes postsinápticos estudiados hasta el momento en la serie control (sinapsis normales, A.A.S. y M.A.S.) presentan, al igual que en sus axones, una gran constancia en cuanto a la dotación mitocondrial (Número de mitocondrias por μm^2 de C. postsináptico).

Componente postsináptico subaxonal.

El estudio individual y comparativo de los tres sarcolemas subaxonales postsinápticos (sinapsis normales, A.A.S. y M.A.S.) ha revelado que el sarcolema subaxonal de las sinapsis M.A.S. de los músculos EDL control presentan características morfométricas que lo sitúa en un estadio intermedio entre el sarcolema de las sinapsis normales y el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S. (ver Tabla XIV). Como se ha comentado los axones de las sinapsis M.A.S. y A.A.S. presentan una gran similitud entre ellos y, sin embargo, bajo estos axones

el sarcolema subaxonal no presenta un tan importante grado de similitud. Dicho con otras palabras, el sarcolema subaxonal de las sinapsis M.A.S. no ha completado las modificaciones estructurales que corresponden a un componente postsináptico cubierto por un axón muy diferenciado. Estos datos confirman que las variaciones observadas a nivel postsináptico son un reflejo de los cambios iniciados a nivel del componente presináptico (ver apartado anterior). Por otro lado, este componente postsináptico subaxonal (M.A.S.) no presenta un suficiente grado de abandono (ni el axón está suficientemente retraído) que justifique una mayor similitud con el sarcolema subaxonal de las sinapsis A.A.S..

El estadio intermedio en que parece estar el sarcolema subaxonal puede reforzar la idea avanzada anteriormente de una posible conversión de determinadas sinapsis de aspecto normal en M.A.S. y, por otro lado, también de determinadas sinapsis M.A.S. en A.A.S.

Todo componente postsináptico situado bajo el axón presenta una serie de características morfométricas invariables en los tres tipos de sinapsis considerados hasta el momento (sinapsis normales, A.A.S. y T.A.S.) (Tabla XIV). Por ejemplo el **% de pliegue primario ocupado por crestas**, **longitud del pliegue secundario**, **número de secciones por obertura**. Así, pese a la variabilidad observada en los parámetros de amplitud de crestas, oberturas y de su *ratio*, el **% de pliegue primario ocupado por crestas** se mantiene invariable bajo todos los axones estudiados. Esta constancia aún está presente bajo la glía. Estos resultados refuerzan la hipótesis, comentada anteriormente (apartado VII.5.1.2.), de que la glía tiene cierta capacidad de mantenimiento de algunas características postsinápticas atribuibles al axón (ver Reynolds y Woolf, 1992). En situación subaxonal siempre se observa una misma longitud de pliegue secundario así como también un mismo número de secciones de este por obertura (Tabla XIV). Sin embargo, el estudio de las otras formas de sarcolema,

en diferente grado de abandono, revela que estos pliegues adoptan una determinada variabilidad (ver Tablas XV y XVI). En términos generales, estos parámetros parecen ser, en su mayoría, característica exclusiva de la presencia axonal. Estos resultados sugieren que el axón es responsable, directa o indirectamente, de algunas características ultraestructurales postsinápticas (Brown y Lunn, 1988, para una mayor discusión) o que alguna proteína del sarcolema con capacidad organizativa precise del axolema (por ejemplo agrinas -Lieth y cols., 1992-; ver también apartado VII.5.2.2.).

Componente postsináptico subglial.

En los pliegues secundarios bajo la célula glial de las sinapsis con mínimo abandono (M.A.S.) existen una única característica morfométrica similar a las sinapsis normales ($P > 0.05$) que es la **penetración de las densificaciones por la obertura**; y únicamente el **número de secciones por obertura** (tortuosidad de los pliegues secundarios) y el **% de crestas densificadas** ya tienen los valores de las formas con amplio abandono (A.A.S.) en situación subglial (ver Tabla X). El resto de características ultraestructurales son indistinguibles (no existen diferencias significativas) de las de sinapsis normales y de las sinapsis A.A.S.. Pero adoptan, como viene siendo habitual, valores intermedios entre estos dos tipos de sarcolema (sarcolema subaxonal de las sinapsis normales y subglial de las sinapsis A.A.S.).

Tal como sucedía con el sarcolema cubierto de glía de las formas A.A.S., la célula glial en las formas M.A.S. tiene cierta capacidad para mantener algunas de las estructuras comunes bajo el axón, ya que aquí son muy pocos los cambios de desdiferenciación (Tabla XV). La mayoría de las estructuras se revelan como aparentemente estables en estas

condiciones de abandono. La glía, como se ha comentado anteriormente, tiende a mantener la acción diferenciadora del axón sobre el componente postsináptico (Birks y cols., 1960; Krause y Wernig, 1985; Somasekhar y Ko, 1991; Reynolds y Woolf, 1992). Aún y así, ciertos parámetros como el % de crestas densificadas o el número de secciones por obertura, se escapan al control glial tanto en las sinapsis amplia (A.A.S.) como mínimamente abandonadas (M.A.S.). Esta capacidad trófica atribuible a la célula de Schwann puede reforzar la propuesta de que las formas M.A.S. son un estadio intermedio de abandono en donde los pliegues recién ocupados por la glía aún están casi completamente diferenciados. Cuando el abandono sea más amplio (A.A.S.) la célula glial puede perder parcialmente esta capacidad diferenciadora (ver apartado .VII.6.1.1.).

Componente postsináptico abandonado.

En las formas con mínimo abandono (M.A.S.) los pliegues postsinápticos que no están cubiertos ni por el axón ni por la célula glial pierden toda la diferenciación estructural (oberturas amplias, crestas estrechas, pocas crestas densificadas y con densificaciones muy cortas), incluso aparece una marcada tendencia a superar el nivel de desdiferenciación descrito para el sarcolema abandonado de las sinapsis A.A.S. (Tabla XVI; apartado VII.5.1.2.).

Estos resultados pueden sugerir que, en los músculos EDL control, la sinapsis con mínimo abandono (M.A.S.) tengan una vida muy prolongada, de tal manera que sus pliegues abandonados (uno o dos) acusen muy intensamente la deprivación trófica (axonal o glial) que supone su estado de abandono. Alternativamente, se puede sugerir que la pérdida inicial de diferenciación de estos pliegues secundarios pueda ser la responsable de la retracción axonal. En este sentido, Rich y Litchman (1989) describen que la retracción axonal está precedida por

una disminución en la densidad postsináptica de moléculas de AChR. Sin embargo está más comunmente aceptado un mayor protagonismo presináptico en el proceso de retracción axonal (ver Brown y Lunn, 1988 para revisión).

A los pliegues abandonados de las sinapsis M.A.S. de los músculos EDL control se asocia un importante número de vesículas *coated*, que es incluso superior al observado en su sarcolema homólogo de las sinapsis A.A.S. (ver Tabla XVI). Posiblemente este hecho esté relacionado con la importante pérdida de membranas densificadas que se detecta a este nivel ya que las vesículas *coated* son responsables del "secuestro" de membrana densificada (Pearse y Bretscher, 1981; Pumplin y Bloch, 1990).

A este nivel del estudio se pueden resumir los signos ultraestructurales observados en la desdiferenciación del componente postsináptico y comunes a los tres tipos de sinapsis analizados hasta este momento (sinapsis normales, A.A.S. y M.A.S.) en: (1) aumento de la amplitud de las oberturas y/o disminución de la amplitud de las crestas y/o alteración de la *ratio* entre estas amplitudes con oberturas mayores y, (2) simplificación de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático. Estos cambios pueden ir asociados con una disminución de las longitudes de las densificaciones de membrana y disminución en la proporción de crestas densificadas.

VII.6.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS M.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.

VII.6.2.2. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE PRESINAPTICO.

Del estudio de las variaciones morfométricas neuromusculares que ha supuesto el incremento de actividad locomotora en las sinapsis M.A.S. se desprende la existencia de una tendencia general: el axón de la sinapsis mínimamente abandonadas (M.A.S.) en la serie de incremento de actividad (I.F.A.) pierde, aparentemente, las diferenciaciones estructurales y de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión (vesículas sinápticas y zonas activas) de que disfrutaba en la serie control (ver Tabla XVII), y adopta características morfométricas globalmente similares a las observadas en los axones de las sinapsis normales (tanto de la serie control como de la serie IFA). Por otro lado, en esta serie (IFA) se observa una disminución significativa del porcentaje de sinapsis M.A.S. respecto de la serie control (ver Tabla II). Estos resultados refuerzan la hipótesis, adelantada anteriormente (apartado VII.2.1.), de la posible existencia de una "conversión plástica actividad-dependiente", que en el presente caso convertiría determinadas sinapsis M.A.S. en ampliamente abandonadas (A.A.S.).

Se puede avanzar la hipótesis de que en la serie control pueden existir dos subpoblaciones de sinapsis M.A.S.: (1) subpoblación de sinapsis M.A.S. "indiferenciadas" o estables, constituida por determinadas formas de mínimo abandono con axones poco diferenciados y globalmente similares a los axones de las sinapsis normalmente inervadas (N.S.) y (2) subpoblación de sinapsis M.A.S. "diferenciadas" (estructuras relacionadas con la neurotransmisión prominentes), formada por aquellas que sus axones presentan una marcada similitud con los axones de las sinapsis ampliamente abandonadas (A.A.S.). Formarían parte de este segundo grupo ("diferenciadas"), las sinapsis M.A.S. que hubieran persistido más tiempo

(necesario para aumentar el grado de diferenciación) en el estado de mínimo abandono. El incremento fisiológico de actividad puede haber acelerado la conversión plástica de la subpoblación M.A.S. con mayor grado de diferenciación hacia las sinapsis A.A.S. (retracción axonal). Y, presumiblemente, la subpoblación de sinapsis M.A.S. "indiferenciadas" o similares a las formas normales sea la que se haya valorado en el capítulo de resultados como sinapsis M.A.S. en la serie de incremento fisiológico de actividad (Tabla XVII). Además, las sinapsis normales se han evidenciado como "refractarias", en gran medida, al incremento de actividad (ver apartado VII.4.1.), por tanto es razonable que la subpoblación "indiferenciada" de sinapsis M.A.S. (similares a las sinapsis normales) no muestre variaciones ultraestructurales indicativas del incremento de actividad (Figura 18).

Esta hipótesis justificaría la incongruencia entre la existencia de unos axones (M.A.S.) con características morfométricas de indiferenciación (existe una maquinaria relacionada con la neurotransmisión muy pobre) y que estos axones estén en músculos entrenados.

VII.6.2.3. MODIFICACIONES EN EL COMPONENTE POSTSINÁPTICO.

Del estudio de las variaciones morfométricas neuromusculares a nivel postsináptico subaxonal de las sinapsis M.A.S. en músculos entrenados se desprende la existencia de una tendencia general muy similar a la observada para el componente presináptico: muchas de las características ultraestructurales observadas en esta porción del componente postsináptico (subaxonal) son similares a las habituales en las sinapsis normales (tanto de la serie control como de la serie IFA), así como una casi inexistente similitud con su sarcolema homólogo de la serie control (ver Tabla XVIII). Estos datos refuerzan la hipótesis avanzada en el apartado

anterior de la preexistencia de dos subpoblaciones de sinapsis con mínimo abandono (M.A.S.) en la serie control. Según se ha indicado anteriormente, en este apartado se está estudiando probablemente la subpoblación más cercana a la situación normal (subpoblación "indiferenciada").

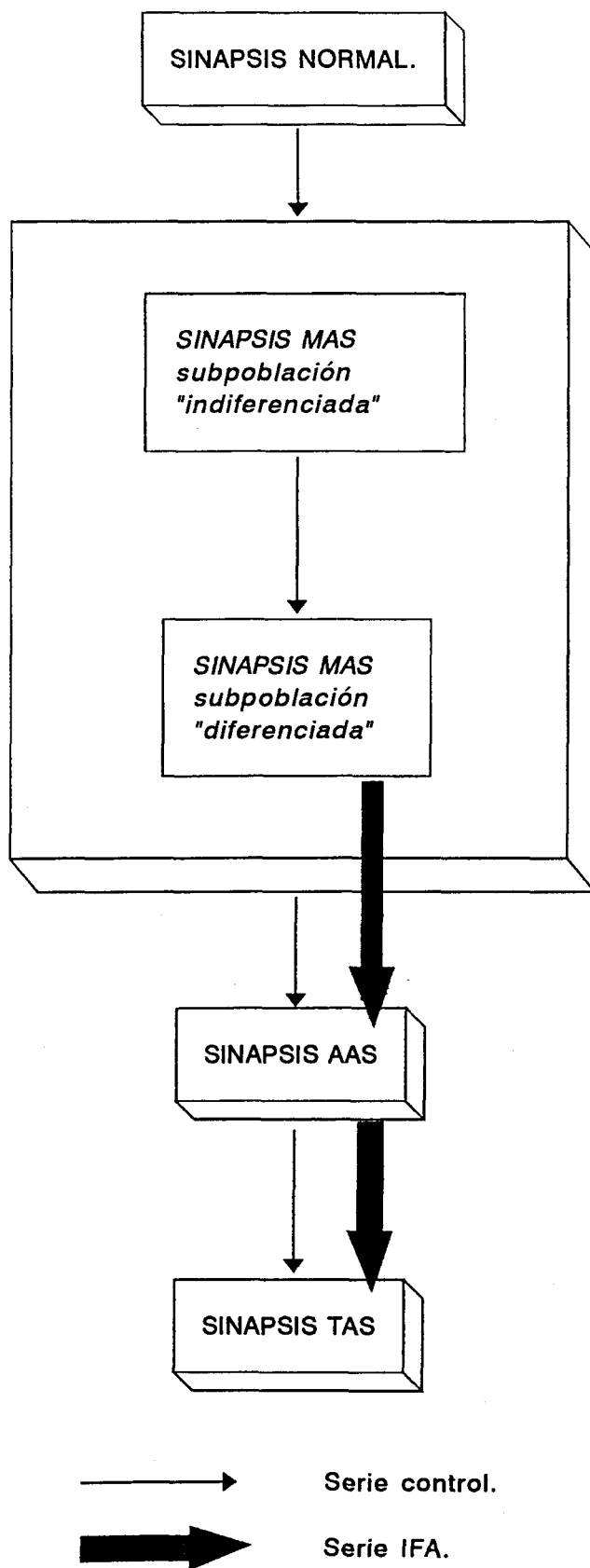
Por otro lado, pese a esta indiferenciación que se acaba de describir, la membrana crestal densificada subaxonal de las sinapsis M.A.S. de los músculos entrenados (I.F.A.) es más prominente (**más % de crestas densificadas, mayor penetración de las densificaciones y mayor longitud media de las densificaciones**) que en los músculos control. También en este sarcolema se aprecia la asociación anteriormente señalada, entre la **amplitud de las crestas y la longitud media de las densificaciones**. Así, en este sarcolema se puede proponer también la participación de determinadas moléculas con capacidad organizativa (por ejemplo agrinas; Lieth y col., 1992; ver apartado VII.5.2.). Estos resultados sugieren, indirectamente, que en las sinapsis M.A.S. de los músculos EDL entrenados hay un mayor aprovechamiento de los "márgenes de seguridad" de liberación de la acetilcolina (Anderson y Stevens, 1973; Hartzel y cols., 1975; Magleby y Terrar, 1975) dado que la maquinaria relacionada con la neurotransmisión a nivel presináptico (vesículas sinápticas y zonas activas) no está tan desarrollada como a nivel postsináptico (membranas densificadas). Una situación similar se ha sugerido que puede ocurrir en las sinapsis normales de esta serie (ver apartado VII.4.2.).

Respecto de la serie control, los tres sarcolemas subaxonales estudiados en esta serie de incremento de actividad (normal, A.A.S. y M.A.S.) tienen en común un marcado incremento en los parámetros referentes a las densificaciones crestales. Este fenómeno puede ser una consecuencia del incremento de actividad locomotora aplicado. Indicando, indirectamente, un acúmulo de moléculas de AChR a este nivel (Salpeter, 1987b).

Las estructuras morfométricas estudiadas de las porciones de sarcolema subglial y abandonado no muestran ninguna modificación atribuible al incremento de actividad (ver Tabla XIX). Este fenómeno puede reforzar la idea comentada anteriormente de la preexistencia de dos subpoblaciones M.A.S. ("indiferenciadas" y "diferenciadas"). Según este argumento, estas porciones de sarcolema ya estaban abandonadas en la serie control (pertenecían a la subpoblación de sinapsis M.A.S. "indiferenciadas"), de tal manera que no se han visto afectadas por el incremento de la actividad neurotransmisora.

Por último, es conveniente recalcar que en el sarcoplasma de las sinapsis M.A.S. de la serie de incremento de actividad locomotora no se aprecia un tan marcado incremento de organoides relacionados con el metabolismo (mitocondrias y lisosomas) ni relacionados con el recambio de membrana (vesículas *coated*) como el observado en las sinapsis A.A.S de esta serie. Este hecho refuerza también que estas sinapsis forman la subpoblación de sinapsis M.A.S. más indiferenciadas de la serie control.

Figura 18: "Flujo de conversión sináptica".



VII.7. ANALISIS DE LAS SINAPSIS TOTALMENTE ABANDONADAS (T.A.S.).

VII.7.1. ANALISIS DE LAS SINAPSIS T.A.S. EN MUSCULOS CONTROL.

A este nivel del estudio se ha detectado una tendencia general común a todos los componentes postsinápticos estudiados en el músculo EDL control: en todas las sinapsis de los músculos control (sinapsis normales, A.A.S., M.A.S. y T.A.S.) hay la misma **longitud de sarcolema total**. De este hallazgo se puede deducir que hay una importante estabilidad de membrana postsináptica en la serie control y que esta es independiente de la presencia axonal (ver Tablas XIV y XX), pero este no es un dato nuevo. Por ejemplo, en el período embrionario está descrita la formación de componente postsináptico en músculos aneurados (sin participación nerviosa)(Sohal,1988), o, en período postnatal, una larga persistencia del componente postsináptico en músculos denervados (Moss y Schuetze, 1987), y en músculos de animales adultos también existen múltiples estudios que remarcan la prolongada permanencia del componente postsináptico tras ser denervados (por ejemplo Birks y cols, 1960) incluso durante períodos de tiempo extraordinariamente largos (Krause y Wernig -1985- refieren una permanencia de hasta 500 días post-denervación). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el axón podría desaparecer, retrayéndose completamente, de una sinapsis A.A.S. y esta, desde el punto de vista de longitud total de sarcolema, quedar transformada en sinapsis T.A.S.. Esta observación indica claramente que el grado de abandono no es otro que el grado de retracción del axón. Aún y así se observan una serie de cambios profundos que matizarían mucho esta aparente estabilidad de membrana.

En las sinapsis totalmente abandonadas (T.A.S.) no es posible que exista ningún efecto

tráfico directo por parte del axón puesto que no existe. Sin embargo, la influencia de la célula glial (presente en el 50% de las sinapsis T.A.S.), desde el punto de vista de su capacidad diferenciadora sobre el sarcolema que cubre, puede no ser tan efectiva como en las situaciones en que acompañe al axón. Además, los resultados reflejados en la Tabla XX muestran unos valores con una gran variabilidad que no siguen ninguna pauta razonable de desdiferenciación equiparable a la observada en otros sarcolemas abandonados por el axón (sinapsis M.A.S. y A.A.S.) estudiados en este trabajo (apartados VII.5.1.2. y VII.6.1.2.)

El estudio morfométrico de las características ultraestructurales del sarcolema de las sinapsis T.A.S. sugiere que está en una fase de degradación o degeneración (fusión de oberturas, desmesurado número de secciones por obertura, crestas con una amplitud aberrante). Miriam Salpeter (1987b) describe en sinapsis abandonadas de músculos denervados en vertebrados un engrosamiento de la luz de los pliegues secundarios, un colapso de las oberturas y una gran abundancia de cisternas y perfiles saculares en el sarcoplasma. Estas observaciones en músculos denervados son totalmente solapables con las aquí expuestas. Dado el mínimo porcentaje de sinapsis T.A.S. en la serie control (3,7%, Tabla II) sólo se han podido cuantificar 6 sinapsis T.A.S., ello dificulta en gran medida su estudio estadístico y una interpretación veraz y extrapolable. La escasa presencia de estas sinapsis T.A.S. en músculos de animales adultos es un hallazgo corriente en diferentes modelos experimentales (ver Wernig y Herrera 1986 para revisión).

En resumen, los datos obtenidos del estudio de las sinapsis totalmente abandonadas en la serie control indican claramente la consecuencia de la privación trófica del axón durante un período presumiblemente prolongado.

VII.7.2. ANALISIS DE LAS SINAPSIS T.A.S. EN MUSCULOS ENTRENADOS.

Los resultados obtenidos del análisis morfométrico ultraestructural del componente postsináptico de las sinapsis T.A.S. en los músculos con incremento fisiológico de actividad (I.F.A.) muestra la existencia de una diferenciación estructural mayor que en la serie control, manteniendo muchos de los rasgos de trofismo habituales para la situación subaxonal o subglial en las sinapsis A.A.S. y M.A.S. (amplitud de crestas y oberturas, *ratio* entre estas amplitudes, parámetros referentes a la membrana densificada; ver Tabla XXI). Estas observaciones pueden indicar un abandono axonal reciente. Además, la población de sinapsis T.A.S. aumenta en los músculos entrenados (ver Tabla II) presumiblemente por un mayor grado de retracción axonal. El aumento del grado de abandono sináptico en relación al nivel de actividad neuromuscular es un hecho ampliamente documentado (Wernig y cols., 1980a; Rosenheimer y Smith, 1985; Andonian y Fahim, 1987; Wernig y Herrera, 1986; Jans y cols., 1986; Cardasis y LaFontaine, 1987). En este contexto, Wernig y colaboradores (1980a) observaron un mayor número de pliegues abandonados en "sinapsis parcialmente abandonadas" (*partially occupied gutters*, en el presente estudio vienen representadas por las sinapsis M.A.S. y A.A.S.) en músculos de anfibios durante el verano (nivel de actividad normal) que durante el invierno (hibernación). A nivel del sistema nervioso central (SNC) está muy pobremente documentada la repercusión de un incremento en el nivel de actividad sobre la morfología sináptica. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que en el hipocampo (porción del SNC muy relacionada con el aprendizaje), el proceso de aprendizaje en roedores adultos puede aumentar el número de sinapsis (Wenzel y cols., 1980) y/o aumentar el área media de contacto sináptico (Altschuler, 1979). Cabe la posibilidad de que los mecanismos neurales que conducen a variaciones morfométricas y estructurales del sistema neuromuscular y del

sistema nervioso central, pese a tener mucho en común, estén modulados por factores diferentes.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis morfométrico ultraestructural del componente postsináptico de las sinapsis T.A.S. en los músculos con incremento fisiológico de actividad (I.F.A.), en conjunto, refuerzan la hipótesis de la existencia de transformaciones plásticas actividad-dependiente a nivel sináptico (Figura 18). Según esta hipótesis, se puede sugerir que determinadas sinapsis A.A.S. (presumiblemente las más extensivamente abandonadas, por ejemplo con más de nueve pliegues abandonados, ver Tablas III y IV) hayan perdido recientemente su axón (retracción axonal completa) y en consecuencia estas sinapsis se transformen de categoría y se conviertan en totalmente abandonadas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

VIII. CONCLUSIONES.

VIII.1. CONCLUSIONES. SERIE CONTROL.

1. Se confirma la hipótesis de que el diferente grado de abandono axonal en las sinapsis neuromusculares del adulto normal está asociado a cambios ultraestructurales de adaptación plástica pre- y postsináptica de posible trascendencia funcional.
2. El abandono del componente postsináptico en las sinapsis amplia- y mínimamente abandonadas no se produce por degeneración sino por retracción del axón que las inerva.
3. Las sinapsis amplia- y mínimamente abandonadas presentan una mayor dotación y diferenciación de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión (vesículas sinápticas, zonas activas y membrana densificada postsináptica) que las sinapsis normalmente inervadas, tanto a nivel presináptico como en el componente postsináptico subaxonal.
4. Las porciones del componente postsináptico abandonadas por el axón presentan desdiferenciación de sus características estructurales. Los principales signos de esta desdiferenciación son: (1) alteración de la relación entre la amplitud de las crestas y de las oberturas con oberturas mas amplias, (2) desdiferenciación de la morfología de las crestas postsinápticas y (3) simplificación de los pliegues secundarios en su recorrido sarcoplasmático.

5. La presencia de la célula de Schwann sobre una porción del sarcolema abandonado por el axón inhibe substancialmente la desdiferenciación de su ultraestructura.

VIII.2. CONCLUSIONES. SERIE INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

1. Se confirma la hipótesis de que el incremento moderado, fisiológico, de corta duración, en la actividad de las conexiones neuromusculares modifica la proporción de los diferentes tipos de sinapsis con algún grado de abandono axonal y la ultraestructura de la maquinaria relacionada con la neurotransmisión para acomodarse a la nueva situación.
2. El patrón de incremento de actividad utilizado en el presente trabajo no provoca ninguna lesión muscular ni nerviosa.
3. En las sinapsis neuromusculares normalmente inervadas el incremento fisiológico de actividad locomotora induce cambios esenciales en la ultraestructura del componente postsináptico.
4. La sinapsis con algún grado de abandono axonal (sinapsis mínima- y ampliamente abandonadas) se producen cambios plásticos actividad-dependientes que se concretan en un mayor grado de abandono axonal.

5. En todas las sinapsis neuromusculares estudiadas la acomodación de la ultraestructura sináptica al incremento de actividad se produce esencialmente por incremento de los valores métricos de las membranas densificadas postsinápticas.

6. Tanto en la serie control como en la serie de incremento fisiológico de actividad se observa: (1) la morfología de las crestas postsinápticas está relacionado con el tipo de sarcolema del que forman parte: sarcolema subaxonal, subglial o abandonado; (2) la presencia o ausencia de densificación en la membrana crestal es independiente de la morfología de la cresta; (3) la longitud media de las densificaciones crestales y la amplitud de las crestas que las sustentan están directamente relacionadas.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Altschuler A. 1979.**
Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus.
J. Histochem. Cytochem., 27: 1548-1550.
- Anderson CR, Stevens CF. 1973.**
Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (London), 235: 655- 691.
- Andonian MH, Fahim MA. 1987.**
Effects of endurance exercise on the morphology of mouse neuromuscular junctions during ageing.
J. Neurocytol., 16: 549-599.
- Angaut-Petit D, Mallart A. 1979.**
*Dual innervation of endplate sites and its consequences for neuromuscular transmission in muscles of adult *Xenopus laevis*.*
J. Physiol. (London), 289: 203-218.
- Anzil AP, Bieser A, Wernig A. 1984.**
Light and electron microscopic identification of nerve terminal sprouting and retraction in normal adult frog muscle.
J. Physiol. (London), 350: 393-399.
- Arizono N, Koneto O, Iwai Y, Hidaka T, Taekoka O. 1984.**
Morphometric analysis of human neuromuscular junction in different ages.
Acta Pathol. J.P.N., 34: 1243-1249.
- Balicegordon RJ, Lichtman JW. 1993.**
In vivo observations of presynaptic and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions.
J. Neurosci., 13: 834-855.
- Banner LR, Herrera AA. 1986.**
Differences in synaptic efficacy at neuromuscular junctions frog twitch muscles.
J. Physiol. (London), 379: 205-215.
- Barker D, Ip MC. 1966.**
Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and de-afferentated skeletal muscle.
Proc. Roy. Soc. B.: 163: 538-554.
- Barton SB, Cohen IS. 1982.**
Facilitation and impulse propagation failure at the frog neuromuscular junction.
Pflüger's Arch., 392: 327-334.

Bennett MR, Lavidis NA. 1979.

The effect of calcium ion on the secretion of quanta by an impulse at nerve terminal releases sites.

J. Gen. Physiol., **74**: 429-456.

Bennett MR, Lavidis NA. 1982.

Variation in quantal secretion at different release sites along developing an mature motor terminal branches.

Dev. Brain Res., **5**: 1-9.

Bennett MR. 1983.

Development of neuromuscular synapses.

Physiol. Rev., **63**: 915-1048.

Bennett MR, Lavidis NA. 1984.

Development of the topographical projection of motor neurons to a rat muscle accompanies loss of polyneuronal innervation.

J. Neurosci., **4**: 2204-2212.

Bennett MR, Jones P, Lavidis NA. 1986a.

Transmitter secretion varies between visualized release sites at amphibian neuromuscular junctions.

NSL, **65**: 311-315.

Bennett MR, Jones P, Lavidis NA. 1986b.

*The probability of quantal secretion along visualized terminal branches at amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular synapses.*

J. Physiol. (London), **379**: 257-274.

Benoit P, Changeaux J-P. 1975.

Consequences of tenotomy on the evolution of multiinnervation in developing rat soleus muscle.

Brain Res., **99**: 354-358.

Benoit P, Changeaux J-P. 1978.

Consequences of blocking the nerve with a local anaesthetic on the evolution of multiinnervation at the regenerating rat neuromuscular junction.

Brain Res., **149**: 89-96.

Betz WJ. 1987.

Motoneuron death and synapse elimination in vertebrates.

En "*The vertebrate neuromuscular junction*". MM Salpeter (Ed.), Alan R Liss Inc, pp-117-162.

- Betz WJ, Bewick GS, Ridge MAP. 1992.**
Intracellular movements of fluorescently labeled synaptic vesicles in frog motor nerve terminals during nerve stimulation.
Neuron, **9**: 805-813.
- Betz WJ, Bewick GS. 1993.**
Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (London), **460**: 287-309.
- Bieser A, Wernig A, Zucker H. 1984.**
Different quantal responses within single frog neuromuscular junctions.
J. Physiol. (London), **350**: 401-412.
- Birks R, Katz B, Miledi R. 1960.**
Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration.
J. Physiol. (London), **150**: 145-168.
- Bixby J.L, Maunsell HR, Van Essen DC. 1980.**
Effects of motor unit size on innervation patterns in neonatal mammals.
Exp. Neurol., **70**: 515-524.
- Bixby J.L, Reichardt LF. 1985.**
The expression and localization of synaptic vesicle antigens at neuromuscular junctions in vitro.
J. Neurosci., **5**: 3070-3080.
- Bonzelius F, Zimmermann H. 1990.**
Recycled synaptic vesicles contain vesicle but not plasma membrane marker, newly synthesized acetylcholine, and sample of extracellular medium.
J. Neurochem., **55**: 1266-1273.
- Both EW, Thomason DB. 1991.**
Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models.
Physiol. Rev., **71**: 541-585.
- Braun M, Schmidt RF. 1966.**
Potential changes recorded from the frog motor nerve terminal during its activation.
Pflüger's Arch., **287**: 56-80.
- Brigant JL, Mallart A. 1982.**
Presynaptic currents in mouse motor endings.
J. Physiol. (London), **333**: 619-636.

- Brimijoin S, Rakonczay Z, Mintz K. 1986.**
Immunochemistry of mammalian cholinesterase.
Fed. Proc., **45**: 2960-2986.
- Brown MC, Jansen JKS, Van Essen DC. 1976.**
Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation.
J. Physiol. (London), **261**: 387-742.
- Brown MC, Ironton R. 1977.**
Motor neurone sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potentials.
Nature, **265**: 459- 461.
- Brown MC, Holland RI, Hopkins WG, Keynes RJ. 1980a.**
An assessment of the spread of the signal for terminal sprouting within and between muscles.
Brain Res., **210**: 145-152.
- Brown MC, Holland RL, Ironton R. 1980b.**
Nodal and terminal sprouting from nerves in fast and slow muscles of the mouse.
J. Physiol. (London), **306**: 493-510.
- Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. 1981a.**
Restoration of local multiple innervation in rat muscles by transmission block during a critical stage of development.
J. Physiol. (London), **318**: 355-364.
- Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. 1981b.**
Motor nerve sprouting.
Ann. Rev. Neurosci., **4**: 17-42.
- Brown MC, Hopkins WG, Keynes RJ. 1982.**
Short- and long-term effects of paralysis on the motor innervation of two different neonatal mouse muscles.
J. Physiol. (London), **339**: 439-450.
- Brown MC, Lunn ER. 1988.**
Mechanism of interaction between motoneurons and muscles.
En: "*Plasticity of the neuromuscular system*". Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium). pp: 78-96.
- Buck CA, Horwitz AF. 1987.**
Cell surface for extracellular matrix molecules.
Ann. Rev. Cell. Biol., **3**: 179-205.

- Burmeister DW, Chen M, Bailey CH, Goldberg DJ. 1988.**
The distribution and movement of organelles in maturing growth cones: correlated video-enhanced and electron microscopic studies.
J. Neurocytol., **17**: 783-795.
- Carbonetto S. 1991.**
Facilitatory and inhibitory effects of glial cells and extracellular matrix in axonal regeneration.
Current Opinion Neurobiol., **1**: 407-413.
- Cardasis CA, Padykula HA. 1981.**
Ultrastructural evidence indicating reorganization at the neuromuscular junction in the normal rat soleus muscle.
Anat. Rec., **200**: 41-59.
- Cardasis AC. 1983.**
Ultrastructural evidence of continued reorganization at the ageing (11-26 months) rat soleus neuromuscular junction.
Anat. Rec., **207**: 399-415.
- Cardasis C, LaFontaine DN. 1987.**
Aging rat neuromuscular junction: a morphometric study of cholinesterase-stained whole mounts and ultrastructure.
Muscle-Nerve, **10**: 200-213.
- Casaburi R. 1992.**
Principles of exercise training.
Chest., **102(s)**: 263-276.
- Chiu A, Sanes JR. 1984.**
Development of basal lamina in synaptic and extrasynaptic portions of embryonic rat muscle.
Dev. Biol., **103**: 456-467.
- Chu-Wang IW, Oppenheim RW. 1978.**
Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. II. A quantitative and qualitative analysis of degeneration in the ventral roots, including evidence for axon outgrowth and limb innervation prior to cell death.
J. Comp. Neurol., **177**: 59-86.
- Cohan C, Connor JA, Kater S. 1987.**
Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones.
J. Neurosci., **7**: 3588-3599.

- Cohen MW, Greschner M, Tucci M. 1984.**
In vivo development of cholinesterase at a neuromuscular junction in the absence of motor activity in Xenopus laevis .
J. Physiol. (London), 348: 57-66.
- Colman H, Lichtmann JW. 1993.**
Interactions between nerve and muscle-synapse elimination at the developing neuromuscular junction.
Dev. Biol., 156: 1.
- Cotman CW, Pike CJ, Cummings BJ. 1993**
Adaptative versus phatological plasticity. Possible contributions to age -related dementia.
En: "Advances in neurobiology". Raven Press, New York. pp: 35-45.
- Courtney J, Steinbach JH. 1981.**
Age changes in neuromuscular junction morphology and acetylcholine receptor distribution on rat skeletal muscle fibres.
J. Physiol. (London), 320: 435-447.
- Covault J, Sanes JR. 1985.**
Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralysed skeletal muscles.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82: 4544-4548.
- Covault J, Sanes JR. 1986.**
Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle.
J. Cell. Biol., 102: 716-730.
- Covault J, Cunningham JM, Sanes JR. 1987.**
Neurite outgrowth on cryostat sections of innervated and denervated skeletal muscle.
J. Cell Biol., 105: 2479-2488.
- Creazzo TL, Sohal GS. 1979.**
Effects of chronic injections of alpha-bungarotoxin on embryonic cell death.
Exp. Neurol., 66: 135-145.
- Dailey ME, Bridgman PC. 1991.**
Structure and organization of membrane organelles along distal microtubule segments in growth cones.
J. Neurosci., 30: 242-258.
- Delbono O. 1992.**
Calcium current activation and charge movement in denervated mammalian skeletal muscle fibres.
J. Physiol. (London), 451: 187-203.

Del Castillo J, Katz B. 1956.

*Localization of active spots within the neuromuscular junction of the frog.
J. Physiol. (London), 132: 630-649.*

Dennis MJ, Ziskind-Conhaim L, Harris AJ. 1981.

*Development of neuromuscular junctions in rat embryos.
Dev. Biol., 81: 266-279.*

Diamond J, Miledi R. 1962.

*A study of foetal and new-born rat muscle fibres.
J. Physiol. (London), 162: 393-408.*

Diamond J, Cooper E, Turner C, McIntyre L. 1976.

*Trophic regulation of nerve sprouting.
Science, 193: 371-377.*

Dias PRL, Simpson JA. 1974.

*Cross-innervation on the motor end-plates of fast and slow-twitch muscles of the rabbit.
Q. J. Exp. Physiol., 59: 213-223.*

Diaz J, Pecot-Dechavaissine M. 1988.

*Electrophysiological and morphological study of polyneuronal innervation in the cutaneous pectoris muscle of adult frog.
J. Neurocytol., 17: 279-292.*

Duchen LW, Strich SJ. 1968.

*The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle of the mouse.
Q. J. Exp. Physiol., 5: 84-89.*

Duchen LW. 1973.

*The effects of tetanus toxin on the motor end-plates of the mouse: an electron microscopic study.
J. Neurol. Sci., 19: 153-167.*

Duchen LW, Tongue DA. 1973.

*The effects of tetanus toxin on neuromuscular transmission and on the morphology of motor end-plates in slow and fast skeletal muscle of the mouse.
J. Physiol. (London), 228,157-172.*

Dumas M, Schwab MF, Thoene H. 1979.

*Retrograde axonal transport of specific macromolecules as a tool for characterising nerve terminal membranes.
J. Neurobiol., 10: 179-197.*

Duxon MJ. 1982.

The effect of postsynaptic block on development of the neuromuscular junction in postnatal rats.

J. Neurocytol., 11: 395-408.

Duxon MJ, Vrbová G. 1985.

Inhibition of acetylcholinesterase accelerates axon terminal withdrawal at the developing rat neuromuscular junction.

J. Neurocytol., 14: 337-363.

Edelmann GM. 1990.

Topobiology: place-dependent cell adhesion in neural morphogenesis.

Comunicación oral en "Presente y futuro de las investigaciones en el cerebro". I Simposium internacional de la Fundación Ramon Areces en la Decada del Cerebro. Madrid.

Edgar D, Timpl R, Thoenen H. 1984.

The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival.

EMBO J., 3: 1463-1468.

Edström L, Larsson L. 1987.

Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units.

J. Physiol. (London), 392: 129-145.

Ellisman MH, Rash JE, Staehelin A, Porter KR. 1976.

Studies of excitable membranes. II. A comparison of specializations at neuromuscular junction and non-junctional sarcolemma of mammalian fast and slow-twitch muscle fibres.

J. Cell. Biol., 68: 752-774.

Erulkar SD, Rahaminoff R. 1978.

The role of calcium ions in tetanic and post-tetanic increase of miniature end-plate potential frequency.

J. Physiol. (London), 278: 501-511.

Fahim MA, Robbins N. 1982.

Ultrastructural studies of young and old mouse neuromuscular junctions.

J. Neurocytol., 11: 641-656.

Fahim MA, Holley JS, Robbins N. 1983.

Scanning and light microscopic study of age changes at a neuromuscular junction in the mouse.

J. Neurocytol., 12: 13-25.

Fahim MA, Robbins N. 1986.

Remodelling of the neuromuscular junction after subtotal disuse.
Brain Res., **383**: 353-356.

Ferns MJ, Hall WH. 1992.

How many agrins does it take to make a synapse?.
Cell, **70**: 1-3.

Foehring RC, Sypert GW, Munson JB. 1987a.

Motor-unit properties following cross-reinnervation of cat lateral gastrocnemius and soleus muscles with medial gastrocnemius nerve. I. Influence of motoneurons on muscle.

J. Neurophysiol., **57**: 1210-1226.

Foehring RC, Sypert GW, Munson JB. 1987b.

Motor-unit properties following cross-reinnervation of cat lateral gastrocnemius and soleus muscles with medial gastrocnemius nerve. II. Influence of muscle on motoneurons.

J. Neurophysiol., **57**: 1227-1245.

Fontaine B, Klarsfeld A, Hökfelt T, Changeux J-P. 1986.

Calcitonin gene-related peptide, present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes.
NSL, **71**: 59-65.

Froehner SC. 1986.

The role of the postsynaptic cytoskeleton in AChR organization.
TINS, **1**: 37-39.

Fugisawa K. 1976.

Some observations on the skeletal musculature of aged rats. III. Abnormalities of terminal axons found in motor end-plates.
Exp. Geront., **11**: 43-47.

Goodman CS, Shatz CJ. 1993.

Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity.
Cell **72**/ *Neuron* **10** (s): 77-98.

Gordon H, Van Essen DC. 1983.

The relation of neuromuscular synapse elimination to spinal position of rabbit and rat soleus motoneurons.
J. Physiol. (London), **339**: 591-597.

Greene EC. 1963.

Anatomy of the rat.
Hoyner Publishing Co.. Greene EC (Ed). New York.

- Grinnell AD, Herrera AA. 1980.
Physiological regulation of synaptic effectiveness at frog neuromuscular junctions.
J. Physiol. (London), 307: 301-317.
- Gundersen RW, Barrett JN. 1980.
Characterisation of turning response of dorsal root neurites towards nerve growth factor.
J. Cell. Biol., 87: 546-554.
- Gundersen RW. 1987.
Response of chick sensory growth cones to laminin and fibronectin: External morphology.
Soc. Neurosci. Abstr., 13: 1484.
- Guth L. 1969.
Effect of immobilization on sole-plate and background cholinesterase of rat skeletal muscle.
Exp. Neurol., 24: 508-513.
- Haimann C, Mallart A, Tomás i Ferré J, Zilber-Gachelin NF. 1981.
*Patterns of motor innervation in the pectoral muscle of adult *Xenopus laevis*: evidence for possible synaptic remodelling.*
J. Physiol. (London), 310: 241-256.
- Hall ZW, Sanes JR. 1993.
Synaptic structure and development: The neuromuscular junction.
Cell 72/Neuron 10(s): 99-121.
- Hamburger V. 1975.
Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo.
J. Comp. Neurol., 160: 535-546.
- Hantz-Ambroise D, Vigny M, Koenig J. 1987.
Heperan sulfate proteoglycan and laminin mediate two different types of neurite outgrowth.
J. Neurosci., 7: 2293-2304.
- Harper GP, Al-Saftar AM, Pearce FL, Vernon CA. 1980.
The production of nerve growth factor in vitro by tissues of the mouse, rat and embryonic chick.
Dev. Biol., 77: 379-390.
- Hartzel HC, Kuffler SW, Yoshicami D. 1975.
Postsynaptic potentiation: interaction between quanta of acetylcholine at the skeletal neuromuscular synapse.
J. Physiol. (London), 251: 427-463.

Hebel R, Stromberg MW. 1986.

Anatomy and embryology of the laboratory rat.
Ed. Biomed. Verlag. FRG.

Herrera AA. 1984.

Polyneuronal innervation and quantal transmitter release in formamide treated frog sartorius muscles.
J. Physiol. (London), 355: 267-280.

Herrera AA, Grinnell AD, Wolowska B. 1985.

Ultrastructural correlates of experimentally altered transmitter release efficacy in frog motor nerve terminal.
Neurosci., 16: 491-500.

Herrera AA, Banner LR, Nagaya N. 1990.

Repeated, in vivo observation of frog neuromuscular junctions: Remodelling involves concurrent growth and retraction.
J. Neurocytol., 19: 85-99.

Herrera AA, Werle J. 1990.

Mechanism of elimination, remodelling and competition at frog neuromuscular junctions.
J. Neurobiol., 21: 73-98.

Heuser JE. 1989a.

Review of electron microscopic evidence favouring vesicle exocytosis as the structural basis for quantal release during synaptic transmission.
Q. J. Exp. Physiol., 74: 1051-1069.

Heuser JE. 1989b.

The role of coated vesicles in recycling of synaptic vesicle membrane.
Cell. Biol. Int. Rep., 13: 1063-1076.

Hoffman H. 1950.

Local reinnervation in partially denervated muscle: a histophysiological study.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 28: 383-397.

Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer R, Rutishauser U, Cunningham BA, Edelmann GM. 1982.

Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes.
J. Biol. Chem., 257: 7720-7729.

Holland RL, Brown MC. 1980.

Postsynaptic transmission block can cause motor nerve terminal sprouting.
Science, 207: 649-651.

- Holland RL, Brown MC. 1981.**
Nerve growth in botulinum toxin poisoned muscles.
Neurosci., **6**: 1167-1179.
- Hubbard JI, Jones SF, Landau EM. 1968.**
On the mechanisms by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses.
J. Physiol. (London), **196**: 75-86.
- Jans H, Salzmann R, Wernig A. 1986.**
Sprouting and nerve retraction in frog neuromuscular junction during ontogenesis and environmental changes.
Neurosci., **18**: 773-781.
- Jansen JKS, Thompson W, Kuffler DP. 1978.**
The formation and maintenance of synaptic connections as illustrated by studies of the neuromuscular junction.
Prog. Brain Res., **48**: 3-18.
- Jansen JKS, Fladby T. 1990.**
The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals.
Prog. Neurobiol., **34**: 39-90.
- Jones R, Vrbová G. 1974.**
Two factors responsible for the development of denervation hypersensitivity.
J. Physiol. (London), **236**: 517-538.
- Juntunen J, Teravainen H. 1972.**
Structural development of myoneural junctions in the human embryo.
Histochem., **32**: 107-112.
- Karnovsky MJ, Roots L. 1964.**
A direct-colouring thiocholine method for cholinesterases.
J. Histochem. Cytochem., **12**: 219-221.
- Ko C-P. 1985.**
Formation of the active zone at developing neuromuscular junctions in larval and adult bullfrogs.
J. Neurocytol., **14**: 487-512.
- Koenig J. 1973.**
Morphogenesis of motor end-plates in vivo and in vitro.
Brain Res., **62**: 361-435.

Kovanen V, Suominen H. 1987.

Effects of age and life-time physical training on fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats.

Pflüger's Arch., **408**: 543-551.

Krause M, Wernig A. 1985.

The distribution of acetylcholine receptors in the normal and denervated neuromuscular junction of the frog.

J. Neurocytol., **14**: 765-780.

Landmesser LT, Morris DG. 1975.

The development of functional innervation in the hind limb of the chick embryo.

J. Physiol. (London), **249**: 310-326.

Laurie RE, Tremblay JP. 1982.

Boutons originating from the same axon do not participate equally in synaptic transmission.

NLS, **29**: 134-140.

LeDouarin NM. 1980.

Migration and differentiation of neural crest cells.

Curr. To. Dev. Biol., **16**: 31-85.

Letinsky MS, Fischback KH, McMahan UJ. 1976.

Precision of reinnervation of original postsynaptic sites in frog muscle after a nerve crush.

J. Neurocytol., **5**: 691-718.

Letourneau PC. 1975.

Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation.

Dev. Biol., **44**: 92-101.

Levi A, Alemá S. 1991.

The mechanism of action of nerve growth factor.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., **31**: 205-228.

Levi-Montalcini R, Hamburger V. 1951.

Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic neuron system of the chick embryo.

J. Exp. Zool., **116**: 321-362.

Levi-Montalcini R, Booker B. 1960.

Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to nerve growth protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **46**: 384-391.

- Lewis J, Chevaller A, Kienv M, Wolpert L. 1981.
Muscle nerves do not develop in chick wings devoid of muscle.
J. Embryol. Exp. Morphol., **64**: 221-232.
- Lichtman JW, Magrassi L, Purves D. 1987.
Visualization of neuromuscular junctions over periods of several months in living mice.
J. Neurosci., **7**: 1215-1222.
- Lieth E, Cardasis CA, Fallon JR. 1992.
Muscle-derived agrin in cultured myotubes: expression in the basal lamina and at induced acetylcholine receptor clusters.
Dev. Biol., **149**: 41-54.
- Linstedt AD, Kelly RB. 1991.
Molecular architecture of the nerve terminal.
Current Opinion Neurobiol., **1**: 382-387.
- Lockerbie RO. 1987.
The neuronal growth cone: a review of its locomotory, navigational and target recognition capabilities.
Neurosci., **3**: 719-729.
- Lomo T, Rosenthal J. 1972.
Control of ACh-sensitivity by muscle activity in the rat.
J. Physiol. (London), **221**: 493-513.
- Lomo T. 1976.
The role activity in the control of membrane and contractile properties of skeletal muscle.
En: "Motor Innervation of muscle", Thesleff S (Ed.). London. Academic Press. pp 289-316.
- Lomo T, Westgaard RH. 1976.
Control of AChR sensivity in rat muscle fibres.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **40**: 236-274.
- Lomo T, Westgaard RH, Engebretsen L. 1980.
Different stimulation patterns affect contractile properties of denervated rat soleus muscles.
En: "Plasticity of muscle", Pette D (Ed.). Berlin: Walter de Gruyter and Co., pp: 297-309.
- Magleby KL, Terrar DA. 1975.
Factors affecting the time course of delay of end-plate currents: a possible co-operative action of acetylcholine on receptors of the neuronuscular junction.
J. Physiol. (London), **244**: 467-495.

- Mallart A. 1984.**
Presynaptic currents in frog motor endings.
Pflüger's Arch., **400**: 8-13.
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S. 1983.**
Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons.
J. Cell. Biol., **97**: 1882-1890.
- Marsal J, Esquerda JE, Fiol C, Solsona C, Tomás J. 1980.**
*Calcium fluxes in isolated pure cholinergic nerve endings from the electric organ of *Torpedo marmorata*.*
J. Physiol. (Paris), **76**: 443-457.
- Martin RE, Bazan NG. 1992.**
Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis.
J. Neurochem., **59**: 318-325.
- Matthew WD, Patterson PH. 1983.**
The production of a monoclonal antibody that blocks the action of a neurite outgrowth-promoting factor.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**: 625-631.
- Matthews G, Wickelgren WO. 1977.**
On the effect of calcium on the frequency of miniature end-plate potentials at the frog neuromuscular junction.
J. Physiol. (London), **266**: 91-101.
- Matthies H. 1989.**
Neurobiological aspects of learning and memory.
Ann. Rev. Psychol., **40**: 381-404.
- McMahan UJ, Reichardt L. 1991.**
Neuronal and glial cell biology.
Current Opinion Neurobiol., **1**: 337-338.
- Miller JB, Stockdale FE. 1987.**
What muscle cells know that nerves don't tell them?.
TINS, **10**: 325-329.
- Mitchinson T, Kirchner M. 1988.**
Cytoskeletal dynamics and nerve growth factor.
Neuron, **1**: 761-772.
- Moss BL, Schuetze SM. 1987.**
Development of rat soleus end-plate membrane following denervation at birth.
J. Neurobiol., **18**: 101-118.

- Mussini I, Carraro U. 1991.*
Modulations of synapse and miofiber during muscle conditioning to fatigue resistance.
En: "Plasticity of motoneural connections", A Wernig (Ed.). Elsevier Sci Publishers.
pp: 27-35.
- Needels RL, Nieto-Sanpedro M, Cotman CW. 1986.*
Induction of a neurite-promoting factor in rat brain following injury of deafferentation.
Neurosci., 18: 517-526.
- Newman TM, Severs NJ. 1990.*
Arrested exocytosis of synaptic vesicles at a glutamaergic synapse, the insect fast excitatory neuromuscular junction.
Cell. Biol. Int. Rep., 14: 849-863.
- Noakes PG, Phillips WD, Hanley TA, Sanes JR, Merlie JP. 1993.*
43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapses formation in vivo.
Dev. Biol., 155: 275-280.
- Nudell BM, Grinnell AD. 1982.*
Regulation of synaptic position, size and strength in anuran skeletal muscle.
J. Neurosci., 3: 161-176.
- O'Brien R, Östberg A, Vrbová G. 1978.*
Observations on the elimination of polyneuronal innervation in developing muscle.
J. Physiol. (London), 282: 571-582.
- Ogata T, Hondo T, Seito T. 1967.*
An electron microscopic study on differences in the fine structures of motor end-plate in red, white, and intermediate muscle. A preliminary study.
Acta Med. Okayama. 21: 327-338.
- Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottons Ch L. 1988.*
Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise.
American J. Anat., 182: 335-346.
- Olwin BB, Hall ZW. 1985.*
Developmental regulation of laminin accumulation in the extracellular matrix of a mouse muscle cell line.
Dev. Biol., 112: 359-367.
- Oppenheim RW. 1981.*
Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis: a selective review and progress report.
En: "Studies in developmental neurobiology: essays in honour of Victor Hamburger", MW Cowan (Ed.). Oxford UP, New York. pp: 74-133.

- Oppenheim RW, Nunez R. 1982.**
Electrical stimulation of hindlimb increases neuronal cell death in chick embryo.
Nature, 295: 57-59.
- Oppenheim RW, Powell JA, Standish LJ. 1984.**
Reduction of naturally-occurring motoneuron death in the spinal cord of the mouse mutant, muscular dysgenesis.
Soc. Neurosci. Abstr., 10: 1081.
- Oppenheim R. 1991.**
Cell death during development of the nervous system.
Ann. Rev. Neurosci., 14: 453-501.
- Pachter BC, Eberstein A. 1984.**
Neuromuscular plasticity following limb immobilization.
J. Neurocytol., 13: 1013-1024.
- Patel NB, Poo M-M. 1982.**
Orientation of neuritic growth by extracellular fields.
J. Neurosci., 2: 483-496.
- Patel NB, Xie Z-P, Young SH, Poo M-M. 1985.**
Response of nerve growth cone to focal electric currents.
J. Neurosci. Res., 13: 245-256.
- Peretz B. 1992.**
Introductory remarks: age-induced plasticity in nervous systems of diverse species.
Exp. Gerontol., 27: 1-6.
- Pestronk A, Drachman DB, Griffin JW. 1976.**
Effects of muscle disuse on acetylcholine receptors.
Nature, 20: 352-353.
- Pearse BMF, Bretscher MS. 1981.**
Membrane recycling by coated vesicles.
Ann. Rev. Biochem., 50: 85-101.
- Pittman RH, Oppenheim RW. 1978.**
Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo.
Nature, 271: 364-366.
- Pittman RH, Oppenheim RW. 1979.**
Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord: Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses.
J. Comp. Neurol., 187: 425-446.

Pockett S, Slack JR. 1982.

Source of the stimulus for nerve terminal sprouting in partially denervated muscle.
Neurosci., 7: 3173-3176.

Pocock JM, Osborne MP, Nicholson RA. 1990.

The effect of in vivo stimulation of the cytology of neuromuscular junctions of locus flight muscles.
J. Neurocytol., 19: 566-573.

Pumplin DW. 1983.

Normal variations in presynaptic active zones of frog neuromuscular junctions.
J. Neurocytol., 12: 317-323.

Pumplin DW, Bloch RJ. 1990.

Clathrin-coated membrana: a distinct membrane domain in acetylcholine receptor clusters of rat myotubes.
Cell. Motility Cytoskeleton, 15: 121-134.

Purves D, Litchman JW. 1985.

Neural death during development.
En: "Principles of neural development", Purves D y Litchman J.W (Eds.), Sinauer Associates Inc, Cap 6, Box A, pp :132.

Redfern PA. 1970.

Neuromuscular transmission in new-born rats.
J. Physiol. (London), 209: 701-709.

Reichardt CF, Tomaselli KS. 1991.

Extracellular matrix molecules and their receptors: function in neural development.
Ann. Rev. Neurosci., 14: 531-570.

Reichmann H. 1990.

Is there metabolic homogeneity in muscle fibres belonging to the same motor unit?.
En: "The motor unit: physiology, diseases, regeneration", Dengler R (Ed.). FRG. Urban and Schwarzenberg. pp: 7-12.

Reist N, Magill C, McMahan VJ. 1987.

Agrin-like molecules at synaptic sites in normal dennervated and damaged skeletal muscles.
J. Cell. Biol., 105: 2457-2469.

Reynolds ML, Woolf CJ. 1992.

Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate.
J. Neurocytol., 21: 50-66.

- Ribchester RR, Taxt T. 1983.**
Motor unit size and synaptic competition in rat lumbrical muscles reinnervated by active and inactive motor axons.
J. Neurocytol., 344: 89-111.
- Rich MM, Litchman JW. 1989.**
In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle.
J. Neurosci., 9: 1781-1805.
- Richarson PM, Ebendal I. 1982.**
Nerve growth activities in rat peripheral nerve.
Brain Res., 246: 57-64.
- Ridge RMAP, Betz WJ. 1984.**
The effect of selective chronic stimulation on motor unit size in developing rat muscle.
J. Neurosci., 4: 2614-2620.
- Rieger F, Raymond-Pincon M. 1981.**
Muscle and nerve in dysgenesis in the mouse at birth: sprouting and multiple innervation.
Dev. Biol., 101: 285-293.
- Rieger F, Grumet M, Edelmann GM. 1985.**
N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction.
J. Cell. Biol., 101: 285-293.
- Robbins N, Fahim A. 1985.**
Progression of age changes in mature mouse motor nerve terminals and its relation to locomotor activity.
J. Neurocytol., 14: 1019-1036.
- Robitaille R, Tremblay JP. 1987.**
Non-uniform release at the frog neuromuscular junctions: evidence of morphological and physiological plasticity.
Brain Res. Rev., 12: 95-116.
- Robitaille R, Adler EM, Charton MP. 1990.**
Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses.
Neuron, 5: 773-779.
- Rosenheimer JL. 1985.**
Effects of chronic stress and exercise on age-related changes in the end-plate architecture.
J. Neurophys., 53: 1582-1589.

- Rosenheimer JL, Smith DO. 1985.**
Differential changes in the end-plate architecture of functionally desuse muscles during aging.
J. Neurophys., **53**:1567-1581.
- Rosenheimer JL, Smith DO. 1990.**
Age-related increase in soluble and cell surface-associated neurite outgrowth factors form rat muscle.
Brain Res., **509**: 309-320.
- Rougon G, Olive S, Figarellabranger D. 1993.**
Is PSA-NCAM a marker for cell plasticity?.
En: "Advances in neurobiology". Raven Press, New York. pp: 323-333.
- Rubin LL, McMahan UJ. 1982.**
Regeneration of the neuromuscular junction: steps toward defining molecular basis of the interaction between nerve and muscle.
En: "Disorders of the motor unit". DL Scotland (Ed.). New York: Wiley. pp 187-196.
- Rutishauser U. 1992.**
N-CAM and its polysialic acid moiety. A mechanism for pull/push regulation of cell interactions during development.
Dev., *suppl.*: 99-194.
- Rutishauser U. 1993.**
Regulation of cell-cell interactions by N-CAM and its polysialic acid moiety.
En: "Advances in neurobiology". Raven Press, New York. pp: 215-227.
- Salmons S, Sreter FA. 1976.**
Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type.
Nature, **263**: 30-34.
- Salpeter MM. 1987a.**
Development and neural control of the neuromuscular junction and of the junctional acetylcholine receptor.
En: "The vertebrate neuromuscular junction", MM Salpeter (Ed.). Alan R Liss, Inc. New York. pp: 55-115.
- Salpeter MM. 1987b.**
Vertebrate neuromuscular junctions: general morphology, molecular organization and functional consequences.
En: "The vertebrate neuromuscular junction", MM Salpeter (Ed.). Alan R Riss Inc, New York. pp 1-55.
- Salpeter MM, Marchaterre M. 1992.**
Acetylcholine receptors in extrajunctional regions of innervated muscle have a slow degradation rate.
J. Neurosci., **12**: 35-38.

- Sanes JR. 1983.**
Roles of extracellular matrix in neural development.
Ann. Rev. Physiol., **45**: 581-600.
- Sanes JR, Chiu AY. 1983.**
The basal lamina of the neuromuscular junction.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**: 667-678.
- Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. 1984.**
Reinnervation of muscle fibre basal after removal of myofibres.
J. Cell Biol., **78**: 176-198.
- Sanes JR. 1985.**
Laminin for axonal guidance?.
Nature, **315**: 714-715.
- Sanes JR, Covault J. 1985.**
Axon guidance during reinnervation of skeletal muscle.
TINS, **8**: 525-528.
- Sanes JR. 1987.**
Cell lineage and the origin of muscle fibres types.
TINS, **10**: 219-221.
- Sanes JR. 1989.**
Extracellular matrix molecules that influence neural development.
Ann. Rev. Neurosci., **12**: 491-516.
- Schlaepfer WW, Micko S. 1979.**
Calcium-dependent alterations of neurofilament proteins of rat peripheral nerve.
J. Neurochem., **32**: 211-219.
- Sheard PW. 1992.**
Physiological properties of isolated motor units in normal and bilaterally innervated Xenopus gastrocnemius muscles.
Dev. Brain Res., **69**: 76-75.
- Silinsky EM, Hirsh JK, Vogel SM. 1987.**
Intracellular calcium mediating the actions of adenosine at neuromuscular junction.
En: "Topics and Perspectives in Adenosine Research". Gerlach E y Becker BF (Eds.). Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. pp. 537-548.
- Slack JR, Hopkins WG, Pockett S. 1983.**
Evidence for a motor nerve growth factor.
Muscle-Nerve, **6**: 243-252.

- Smalheiser NR. 1990.**
Neuronal growth cones: an extended view.
Neurosci., **38**: 1-11.
- Smith DO, Rosenheimer JL. 1982.**
Decreased sprouting and degeneration of nerve terminals of active muscles in aged rats.
J. Neurophys., **48**: 100-109.
- Smith DO. 1988.**
Muscle-specific decrease in presynaptic calcium dependence and clearance during neuromuscular transmission in aged-rats.
J. Neurophys., **59**: 1069-1082.
- Smith RG, Appel SH. 1981.**
Evidence for a skeletal muscle protein that enhances neuron survival neurite extension and acetylcholine (ACh) synthesis.
Soc. Neurosci. Abst., **7**: 144.
- Smith S. 1988.**
Neuronal citomechanics: the actin-based motility of growth cones.
Science, **242**: 708-715.
- Sohal GS. 1988.**
Development of postsynaptic specializations of the neuromuscular synapse in the absence of motor nerve.
Int. J. Dev. Neurosci., **6**: 553-565.
- Somasekhar T, Ko C-P. 1991.**
Effects of denervation on the distribution of peanut agglutinin binding molecules in frog muscles.
J. Neurocytol., **20**: 65-77.
- Sotelo C, Palay SL. 1971.**
Altered axons and axon terminals in the lateral vestibular nucleus of the rat.
Lab. Inv., **25**: 653-671.
- Stone TW. 1981.**
Physiological roles for adenosine and adenosine 5'-Triphosphate in the nervous system.
Neurosci., **6**: 523-555.
- Suarez-Isla BA, Pelto DJ, Thompson JM, Rapoport SI. 1984.**
Blockers of calcium permeability inhibit neurite extension and formation of neuromuscular synapses in cell culture.
Dev. Brain Res., **14**: 263- 270.

Sussnot NS, Campenot RB. 1986.

Influence of the extracellular potassium environment on neurite growth in sensory neurons, spinal cord neurons and sympathetic neurons.
Dev. Brain Res., **25**: 43-52.

Thoene H, Angeletti PU, Levi-Montalcini R, Keuler R. 1971.

Selective induction of tyrosine hidroxilase and dopamine b-hidroxilase in rat superior cervical ganglion by nerve growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**: 1598-1602.

Thompson W, Kuffler DP, Jansen JKS. 1979.

The effects of prolonged, reversible block of nerve impulses on the elimination of polyneuronal innervation of new-born rat skeletal muscle fibres.
Neurosci., **4**: 271-281.

Thompson W. 1983a.

Lack of segmental selectivity in elimination of synapses from soleus muscle of newborn rats.
J. Physiol. (London), **335**: 342-352.

Thompson W. 1983b.

Synapse elimination in neonatal muscle is sensitive to pattern of muscle use.
Nature, **302**: 614-616.

Thompson WJ, Sutton LA, Riley DA. 1984.

Fibre type composition of single motor units during synapse elimination in neonatal rat soleus muscle.
Nature, **309**: 709- 711.

Thompson WJ. 1985.

Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction.
Cell. Mol. Neurobiol., **5**: 167-182.

Tomás i Ferré J, Mayayo E, Fenoll i Brunet R. 1987.

Morphometric study of the neuromuscular synapses in the adult rat with special reference to the remodelling concept.
Biol. Cell, **60**: 133-144.

Tomás J. Fenoll R, Santafé M, Batlle J, Mayayo E. 1989a.

Motor nerve terminal morphologic plasticity induced by small changes in the locomotor activity at the adult rat.
NSL, **106**: 137-140.

Tomás i Ferré J, Fenoll R, Santafé M, Mayayo E. 1989b.

Changes in motor nerve terminals during bupivacaine induced postsynaptic deprivation.
J. Anat., **10**: 225-234.

- Torigoe K. 1988.**
Terminal sprouting in partially denervated muscle of the mouse: a scanning electron microscopic study.
J. Neurocytol., **17**: 563-571.
- Townes-Anderson E, Raviola G. 1978.**
Degeneration of autonomic nerve endings in the anterior part of rhesus monkey ciliary muscle.
J. Neurocytol., **7**: 583-600.
- Tremblay JP, Robitaille R, Grenon G. 1984.**
Distribution of spontaneous release along the frog neuromuscular junction.
NSL, **51**: 247-252.
- Trimble WS, Linial M, Scheller RH. 1991.**
Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal.
Ann. Rev. Neurosci., **14**: 93-122.
- Tuffery AR. 1971.**
Growth and degeneration of motor end-plates in normal cat hind limb muscles.
J. Anat., **110**: 221-247.
- Van der Kloot W, Kita H, Madden K, Cohen J. 1975.**
Estimates of sites of transmitter release at the frog neuromuscular junction.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., **34**: 404.
- Van der Kloot W, Van der Kloot E. 1985.**
Activity increases quantal size at the frog neuromuscular junction.
Experientia, **41**: 47-48.
- Verma V. 1984.**
The presynaptic active zones in three different types of fibres in frog muscle.
Proc. R. Soc. London. Ser. B., **221**: 369-373.
- Villar J. 1988.**
Recomendaciones de la declaración de Helsinki sobre investigación clínica y guías principales en el cuidado y uso de animales.
Medicina Clínica (Barna), **91**: 702-703.
- Vrbová G, Gordon T, Jones R. (Eds.). 1978.**
Nerve muscle Interactions.
Chapman and Hill. London.
- Vrbová G, Lowie MB, Evers J. 1988.**
Reorganization of synaptic inputs to developing skeletal muscle fibres.
En: "Plasticity of the neuromuscular system". Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium). pp: 131-151.

- Vrbová G, Fisher TJ. 1989.
The effect of inhibiting the calcium activated neutral protease on motor unit size after partial denervation of the rat soleus muscle.
Europ. J. Neurosci., 1: 616-625.
- Walicke PA, Patterson PH. 1981.
On the role of Ca²⁺ in transmitter choice made by cultured sympathetic neurons.
J. Neurosci., 1: 343-350.
- Wenzel J, Kammerer E, Kirsche W, Matthies H, Wenzel M. 1980.
Electron microscopic and morphometric studies on synaptic plasticity in the hippocampus of the rat following conditioning.
J. Hirnforsch., 21: 647-654.
- Werle MJ, Herrera AA, Grinnell AD. 1984.
Ultrastructural uniformity along branches of frog nerve terminals.
Soc. Neurosci. Abstr., 10: 919.
- Wernig A, Pècot-Dechavassine M, Stöver H. 1980a.
Sprouting and regression of the nerve at the frog neuromuscular junctions in normal conditions and after prolonged paralysis with curare.
J. Neurocytol., 9: 277-303.
- Wernig A, Pècot-Dechavassine M, Stöver H. 1980b.
Signs of nerve regression and sprouting in the frog neuromuscular synapse.
En: "Ontogenesis and Functional Mechanisms of Peripheral Synapses", J Taxi (Ed.).
Elsevier, Amsterdam. pp. 225-238.
- Wernig A, Anzil AP, Bieser A. 1981.
Formation and regression of synaptic contacts in the adult muscle.
En: "Lesion-induced neuronal plasticity in sensorymotor systems". H Flohr and W Precht (Eds.). Springer, Berlin. pp: 38-50
- Wernig A, Carmody JJ, Hansert E, Marciniak M, Zucker H. 1984.
Continual nerve sprouting with features of synapse remodelling in soleus muscles of adult mice.
Neurosci., 11: 241-253.
- Wernig A, Herrera AA. 1986.
Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction.
Prog. Neurobiol., 27: 251-291.
- Wernig A, Dorlöchter M. 1989.
Plasticity of the nerve muscle junction.
En: "Fundamentals of memory formation: neuronal plasticity and brain function".
Rahmann (Ed.), New York. pp: 83-99/Prog. Zool., 37: 83-89.

- Wernig A, Irintchev A, Weissaupt P. 1990.**
Muscle injury, cross-sectional area fibre type distribution in mouse soleus after intermittent wheel-running.
J. Physiol. (London), 428: 639-652.
- Wernig A. 1991.**
Plasticity of motoneuronal connections.
A Wernig (Ed.). Elsevier Science Publishers.
- Wernig A, Salvini TF, Irintchev A. 1991.**
Axonal sprouting and damages in fibres types after running-induced damage.
J. Neurocytol., 20: 903-913.
- Wigston DJ. 1989.**
Remodelling of neuromuscular junctions in adult mouse soleus.
J. Neurosci., 9: 639-647.
- Wilson CJ. 1988.**
Cellular mechanisms controlling the strength of synapses.
J. Electron Microscopy Technique, 10: 293-313.
- Young SH, Poo M-M. 1983.**
Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones.
Nature, 305: 634-635.
- Zefirov AL, Khalilov IA. 1985.**
Characteristics of electrical activity in different sections of nerve endings in the frog.
Bull. Eksp. Biol. Med., 99: 7-10.
- Zimmermann H, Volknandt W, Henkel A, Bonzelius F, Janetzko A, Kanaseki T. 1989.**
The synaptic vesicle membrane: origin, axonal distribution, protein components, exocytosis and recycling.
Cell. Biol. Int. Rep., 13: 993-1006.
- Zucker RS. 1989.**
Short-term synaptic plasticity.
Ann. Rev. Neurosci., 12: 13-31.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

ANEXO. ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS.

A.A.S.:	Sinapsis ampliamente abandonadas.
AChE:	Acetilcolinesterasa.
AChR:	Receptores de la acetilcolina.
B.A.:	Abandono bilateral,
Ca:	Calcio.
CANP:	Proteasas calcio-dependientes axonales.
EDL:	<i>Extensor digitorum longus.</i>
I.F.A.:	Incremento fisiológico de actividad.
K:	Potasio.
M.A.S.:	Sinapsis mínimamente abandonadas.
M.E.C.:	Matriz extracelular.
MEPP:	Potenciales de acción en miniatura.
MET:	Microscopio electrónico de transmisión.
M.N.G.F.:	Factor de crecimiento nervioso motor.
MO.:	Microscopio óptico.
Na:	Sodio.
N-CAM:	Moléculas de adhesión nerviosa.
Ng-CAM:	Moléculas de adhesión glial.
N.G.F.:	Factor de crecimiento nervioso.
nm:	Nanómetros.
NoSc:	Ausencia de célula de Schwann.
N.S.:	Sinapsis normales.

PNAP:	Potencial de acción presináptico.
R.E.L.:	Retículo endoplasmático liso.
SNC:	Sistema nervioso central.
Sc:	Presencia de célula de Schwann.
T.A.S.:	Sinapsis totalmente abandonada.
U.A.:	Abandono unilateral.
μm:	Micrómetros.
V.S.:	Vesículas sinápticas.
Z.A.:	Zonas activas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CAMBIOS PLÁSTICOS DE ADAPTACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CONEXIONES NERVIOSAS MOTORAS EN EL ADULTO,
EN RESPUESTA A UN INCREMENTO FISIOLÓGICO DE ACTIVIDAD.

Manuel Santafe Martinez

DL:T-1572-2009/ISBN: 978-84-692-4531-6

