

ELS MECANISMES D'ALLIBERACIÓ DE L'ACETILCOLINA *

JORDI MARSAL, CONXA FIOL, JOSEP E. ESQUERDA

INTRODUCCIÓ. — La descoberta, relativament recent, de la influència de les drogues que actuen sobre el sistema colinèrgic en moltes de les funcions del sistema nerviós central, com la son, l'agressivitat, la memòria, l'aprenentatge i el comportament, ha fet que molts investigadors demanessin als que ens dediquem a l'estudi del funcionament de la transmissió sinàptica colinèrgica més informació sobre els processos elementals que hi tenen lloc.¹⁻⁵

El mateix ha passat amb els estudiosos de les malalties neuromusculars, algunes d'elles localitzades específicament a la sinapsi mioneural, la sinapsi colinèrgica més ben estudiada del nostre organisme.⁶

Certament, el millor coneixement dels mecanismes elementals de l'activitat sinàptica colinèrgica ens permetrà el descobriment d'accions farmacològiques que, algun dia, contribuiran a guarir moltes de les malalties del sistema nerviós central o perifèric relacionades amb un trastorn de la transmissió sinàptica.

Però ens manca encara un bon tros de camí per arribar a aquests resultats esperats per tots, sobretot perquè encara coneixem malament quins són els mecanismes fisiològics del pas d'informació en el sistema nerviós d'una cèl·lula a l'altra.

La morfologia de l'estructura on té lloc aquest pas d'informació és avui ben coneguda gràcies al treball i a la visió, que no dubtaríem de qualificar de genial, de Ramón y Cajal, confirmada per les tècniques ultraestructurals modernes desenvolupades a partir de la utilització del microscopi electrònic.

Recapitulant breument podem dir que en el sistema nerviós la informació circula en forma d'impulsos elèctrics anomenats potencials d'acció. La seva freqüència depèn de la intensitat d'un estímul o d'una sensació, és a dir, l'estímul que imposa a la cèl·lula excitable un corrent

* Sessió del dia 6 d'abril de 1979.

elèctric local desencadena un potencial d'acció propagat. El sistema nerviós, doncs, participa en la percepció del món exterior convertint els corrents locals produïts per estímuls exteriors en potencials d'acció. Una neurona d'aquest sistema nerviós comunica amb una altra neurona o amb una altra cèl·lula efectora gràcies a un contacte especialitzat: la sinapsi.

La funció principal de la sinapsi és precisament la de convertir la informació que rep en un corrent local la cèl·lula receptora, anomenada potencial sinàptic o de placa segons el cas, que podrà desencadenar un potencial d'acció propagat a la cèl·lula receptora.

La immensa majoria de les sinapsis transmeten aquesta excitació gràcies a la intervenció d'una substància química, el mediador segregat per la terminació nerviosa i capaç de generar un corrent local en la cèl·lula postsinàptica. Les sinapsis poden ésser classificades, doncs, segons el tipus de mediador utilitzat, en colinèrgiques, adrenèrgiques, dopaminèrgiques, etc. El mediador modifica la permeabilitat de la membrana postsinàptica per a diferents ions que entren o surten de la cèl·lula en forma de fluxos iònics, com per exemple l'entrada de Na^+ i Cl^- i la sortida de K^+ .

Aquests fluxos iònics permeten d'enregistrar en la cèl·lula postsinàptica una despolarització de la membrana, o bé una hiperpolarització o, simplement, un canvi de conductància per un ió.

El sistema de propagació del potencial d'acció que regenera el potencial en cada porció de la membrana excitable, no modifica la informació i la transmet amb gran fidelitat. En canvi, la sinapsi rep aquesta informació i li dona les característiques pròpies de la seva especificitat química. La sinapsi reelabora la informació que rep, de tal manera que podem dir amb MONOD que «no es pot comprendre el funcionament del sistema nerviós central sense conèixer el seu element lògic primari que és la sinapsi».⁷ La regulació d'aquest funcionament dependrà també de les interaccions recíproques entre la terminació nerviosa i la cèl·lula receptora.

Si ens referim a la sinapsi colinèrgica, la regulació del seu funcionament vindrà determinada, a més de la informació rebuda que ja hem esmentat, pel triple equilibri de la producció i l'alliberament del mediador en la terminació nerviosa. En la sinapsi en repòs aquest equilibri és determinat per:

a) La captació dels precursors del mediador, la colina i l'acetat, produïts a l'espai intersinàptic per l'acció de l'acetilcolinesterasa. Aquests precursors estan destinats a nodrir els sistemes de síntesi que proporcionen el mediador necessari per a fer funcionar l'alliberació espontània responsable dels potencials miniatura registrats en repòs.^{8,9}

b) Els enzims implicats en la síntesi del mediador, principalment la colinacetiltransferasa i la acetilCoA sintetasa que tindran la seva activi-

tat regulada per la concentració dels seus substracts i dels productes de la síntesi.¹⁰

c) Finalment, per l'equilibri dels diferents compartiments del mediador i la seva dependència de la concentració de calci, fet sobre el qual tornarem més endavant.¹¹ Veiem, doncs, que la regulació de la transmissió sinàptica depèn no solament de la informació rebuda sinó també d'una sèrie de processos metabòlics que influiran en el funcionament de la sinapsi colinèrgica.

Aquest triple equilibri manté, en la situació de repòs, una gran estabilitat de la quantitat d'Ach. de la terminació nerviosa. L'estimulació dels nervis i els fluxos iònics que provoca desencadenaran una modificació d'aquests equilibris cap a un augment de l'alliberació del transmissor. Per exemple, la hidròlisi de l'Ach. a l'espai intersinàptic per l'acetilcolinesterasa provocarà un desplaçament important de la quantitat de precursors, la colina i l'acetat i, per tant, una modificació de les activitats enzimàtiques de síntesi per modificació dels seus substrats,⁹ o bé l'entrada de calci en la cèl·lula modificarà la compartimentació intracel·lular de l'acetilcolina.^{12, 13}

Hem de trobar, doncs, un mecanisme capaç d'integrar aquests fenòmens metabòlics en l'activitat de la sinapsi. Una imatge dinàmica de la regulació de l'activitat sinàptica haurà de completar necessàriament la concepció d'aquesta activitat fins ara exposada pels electrofisiòlegs i consistent en la presència dins la terminació nerviosa d'un capital de *quanta* d'acetilcolina preformats que són consumits quan l'exocitosi els allibera a l'espai sinàptic. Aquesta concepció unilateral subestima els fenòmens metabòlics ja esmentats i la retroacció reguladora de la cèl·lula postsinàptica.

MATERIAL. — Però abans de continuar en l'exposició d'alguns d'aquests factors estudiats al nostre laboratori, voldríem presentar el material que utilitzem per comprendre més bé els resultats que presentarem.

La majoria dels aspectes metabòlics del funcionament de la sinapsi colinèrgica han pogut ésser estudiats gràcies a un material únic a la natura: els òrgans elèctrics dels peixos i, en particular, l'òrgan elèctric del Torpedo marmorata. Aquests òrgans elèctrics són els homòlegs dels músculs estriats esquelètics dels vertebrats que, com passa en el Torpedo, han perdut el seu material contràtil.¹⁴ És un òrgan purament colinèrgic en el qual els nervis alliberen acetilcolina quan són estimulats, que conté una gran quantitat d'acetilcolina, colinesterases i colinacetyltransferasa, substàncies que caracteritzen la sinapsi colinèrgica.^{15, 16} Des del punt de vista electrofisiològic té les mateixes característiques de la sinapsi mioneural ja que la membrana postsinàptica no presenta potencial d'acció propagat i la descàrrega elèctrica correspon a l'addició

dels potencials de placa de la membrana postsinàptica produïts per l'acció de l'acetilcolina alliberada. La quantitat de teixit nerviós és mil vegades més important que en un múscul estriat i no presenta sinapsis que utilitzin altres mediadors químics.¹⁷

Aquesta estructura homogènia, la gran quantitat de terminacions nervioses i l'absència de miofilaments faciliten molt la preparació de fraccions cel·lulars determinades morfològicament. Finalment, els estudis fisiològics es troben molt facilitats pel fet que es pot enregistrar la descàrrega elèctrica en un òrgan elèctric denervat durant més de 48 hores si es conserva en una solució fisiològica adequada.

Les terminacions nervioses cobreixen totalment la cara ventral de les cèl·lules electrògenes i presenten la morfologia general de l'element pre-sinàptic (fig. 1).

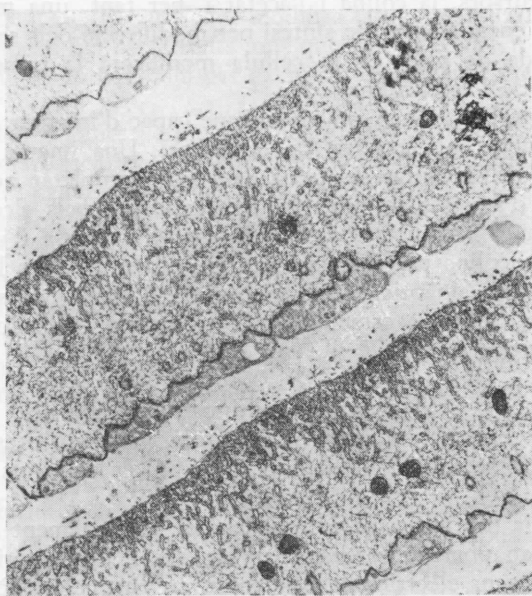


FIG. 1. — Ultraestructura del teixit electrogen de Torpedo M. Dues electroplaques amb nombroses terminacions nervioses X. 9.100.

LA HIPÒTESI VESICULAR. — Aquest model experimental ha permès estudiar molts dels factors metabòlics que eren encara desconeguts a l'època en què els peoners de l'estudi de la fisiologia de la sinapsi varen proposar un mecanisme d'alliberació de l'acetilcolina que avui coneixem

com a hipòtesi vesicular, ensenyada als alumnes de les nostres facultats com una teoria ben establerta.

La hipòtesi vesicular es basa en la teoria quàntica de l'alliberació d'acetilcolina, formulada per FATT i KATZ.¹⁸ Aquests autors, col·locant microelectrodes intracel·lulars a la cèl·lula muscular de la granota aprop de la placa motora varen enregistrar salves de potencials miniatura espontanis. Aquest potencial miniatura tenia la forma de potencial de placa però la seva amplitud corresponia a estimulacions nervioses de 0,5 a 1,0 mV. Aquesta amplitud només era afectada pel curare o els anticolinesteràsics o bé per l'hemicolini o les estimulacions prolongades. La freqüència d'aquests potencials miniatura augmentava proporcionalment al voltatge de la despolarització electrònica o bé a l'augment de la concentració de potassi extracel·lular. També podien modificar la freqüència les diferents concentracions de calci o magnesi extracel·lulars que se sabia que modificaven l'amplitud del potencial de placa. Fent un estudi estadístic d'aquestes dades varen comprovar que el potencial sinàptic estava compost per la integració múltiple dels potencials miniatura espontanis i es podia preveure la seva distribució aplicant la llei de probabilitats de POISSON.

El descobriment que el potencial sinàptic estava format per la suma de potencials miniatura d'amplitud constant va portar a DEL CASTILLO i KATZ a enunciar la teoria quàntica de la transmissió sinàptica.¹⁹

Segons aquesta teoria, el potencial miniatura és el fenomen unitari de la transmissió i està provocat per l'alliberació d'un paquet, d'una quantitat constant d'acetilcolina, el *quantum*. El potencial sinàptic seria doncs el resultat de l'alliberació simultània d'un gran nombre de *quanta* com a conseqüència de la despolarització de la terminació nerviosa. La natura quàntica del potencial de placa només ha pogut ésser demostrada a la sinapsi mioneural, a les sinapsis colinèrgiques ganglionars, a les sinapsis mioneurals dels crustacis i a les sinapsis de les neurones motores.²⁰

Encara que la teoria quàntica no implica necessàriament que l'acetilcolina (Ach) és magatzemada dins de la terminació en forma de paquets preformats, l'enunciat d'aquesta teoria va coincidir amb el descobriment de les vesícules sinàptiques dins l'element pre-sinàptic²¹ i va portar a DEL CASTILLO i KATZ²² i a PALAY²³ a la formulació de la hipòtesi vesicular que deia que el *quantum* d'acetilcolina era el contingut de les vesícules sinàptiques, i que l'alliberació de l'acetilcolina vesicular o *quantum* es feia, com en altres tipus de secreció (per exemple la secreció de catecolamines al moll de la suprarenal),²⁴ per exocitosi del contigut de la vesícula, seguit de la fusió de la membrana vesicular amb la membrana pre-sinàptica.

Veiem, doncs, que la hipòtesi vesicular es basa en dos pressupòsits

fonamentals, l'equivalència entre un *quantum* i el contingut de la vesícula i l'exocitosi com a mecanisme d'alliberació de l'acetilcolina.

Alguns fets posteriors varen afermar aquesta teoria: D'una banda l'isolament de les vesícules sinàptiques de l'òrgan elèctric de Torpedo marmorata²⁵ que confirmava la presència d'Ach dins de les vesícules, i, d'altra banda, durant l'estimulació es produeix un recanvi de l'acetilcolina intravesicular.²⁶

Encara que l'alliberació quàntica no hagi pogut ésser demostrada en les sinapsis muscaríniques i que existeixi una alliberació no quàntica a la sinapsi mioneural en certes condicions experimentals o en la deneració,^{27, 28} en les sinapsis nicotíniques en condicions fisiològiques l'alliberació quàntica està ben establerta, així com el recanvi d'Ach vesicular. En canvi, de moment no han pogut ésser demostrats els pressupostos que assimilen un *quantum* al contingut vesicular i l'exocitosi del mediador.

L'existència d'una gran heterogeneïtat dels *quanta* en les sinapsis mioneurals de ratolí i de granota així com la presència en algunes condicions de potencials de placa «gegants» o inversament subpotencials de placa i, sobretot, la descoberta recent de subunitats dels *quanta* a la sinapsi mioneural de granota,²⁹ fan difícil la identificació entre el *quantum* i el contingut fix estable i preformat d'acetilcolina vesicular. D'altra banda ZIMMERMANN i WHITTAKER³⁰ han demostrat que després d'estimulacions llargues en què desapareixen les vesícules de la terminació de l'electroplaca, quan es recupera la transmissió gairebé no hi ha vesícules al citoplasma, i en aquest cas pensen que el contingut en Ach vesicular ha variat. Aquests fets han portat els autors esmentats a admetre dos tipus d'exocitosi, una exocitosi total i una exocitosi parcial on només una part del contingut vesicular seria buidat.³¹

Quant a l'exocitosi, hem d'assenyalar que un fenomen tan considerable com l'exocitosi de diversos centenars de vesícules en una fracció curta de temps no ha estat mai posada en evidència morfològicament, excepte algunes imatges de R. COUTEAUX.³²

Més recentment, HEUSER i REESE³³ han aconseguit carregar les vesícules de peroxidasa en el curs de l'estimulació. ZIMMERMANN,³¹ utilitzant dextrà ha fet el mateix. Aquets fets que posen en evidència l'existència d'un cicle vesicular d'endoexocitosi que a la peroxidasa o per al dextrà no han pogut malauradament demostrar que l'Ach era el producte exocitat.

Però deixant de banda aquesta insuficiència de proves per a demostrar la hipòtesi vesicular existeixen alguns fets experimentals que la contradiuen i que es basen en els fenòmens metabòlics abans esmentats.

Resumirem breument alguns d'aquests fets experimentals a la sinapsi de l'electroplaca:



a) L'acetilcolina alliberada a l'espai sinàptic és hidrolitzada en acetat i colina per l'acetilcolinesterasa i els acumula l'espai sinàptic.

b) Es produeix un reciclatge de la colina i de l'acetat a les sinapsis mioneurals o similars.^{8, 9}

c) L'acetilcoasintetasa transforma l'acetat en acetilCoA amb consum d'ATP en les sinapsis mioneurals. En l'òrgan elèctric de Torpedo, el 100 per 100 de l'acetat extracel·lular és incorporat a l'Ach de la terminació.³⁴

d) La colinacetiltransferasa que acetila la colina i partir de l'acetilCoA és un enzim citoplasmàtic i per tant és previsible que la síntesi d'Ach sigui citoplasmàtica.³⁵

e) L'Ach format en l'element pre-sinàptic es troba distribuït en dos compartiments:

- 1) Un compartiment «lligat» que es troba quan s'extreu l'Ach després d'homogeneïtzar el teixit. És a dir, un compartiment d'Ach protegit de les colinesterases. Aquest «pool lligat» en l'òrgan elèctric correspon al 50 % de l'Ach total i la seva quantitat coincideix amb l'acetilcolina vesicular. Aquest compartiment només es pot modificar si es fa un xoc osmòtic que, com se sap, és eficaç per alliberar l'Ach vesicular.
- 2) Un compartiment «lliure», no protegit per cap membrana i que per tant és hidrolitzat després de l'homogeneïtzació del teixit, fa suposar que es tracta d'un compartiment citoplàsmic d'Ach.

Si estudiem la radioactivitat específica de cada un dels compartiments quan es posa acetat marcat a l'espai extracel·lular i s'estimula la sinapsi, ens adonarem que el compartiment «lliure» és el de radioactivitat específica més alta i, en canvi, molt més feble al «lligat». És a dir l'Ach citoplàsmica seria la novament sintetitzada.³⁶

f) Quan s'estimula l'òrgan elèctric en condicions fisiològiques i en temps curts es pot comprovar que l'Ach alliberada és justament la novament sintetitzada, és a dir la del compartiment «lliure» i, en canvi, hi ha una gran estabilitat de l'acetilcolina lligada.³⁶

g) Quan en un temps llarg o en condicions no fisiològiques s'estimula el funcionament de la sinapsi assegurat, en les condicions precedents, pel compartiment lliure, és insuficient en les noves condicions i ha d'utilitzar l'Ach del magatzem vesicular.³⁶

h) Durant l'estimulació es produeix una oscil·lació en fase de la quantitat d'Ach (fig. 2) i d'ATP de la terminació nerviosa a l'òrgan elèctric que té un període de 5 segons.³⁷

i) Hem pogut demostrar que quan l'òrgan elèctric és rentat en solucions fisiològiques sense Ca^{++} , es produeix una disminució d'ATP intracel·lular i un augment considerable del compartiment vesicular d'Ach

i la desaparició del compartiment lliure. Aquest fenomen és reversible quan s'afegeix Ca^{++} a la preparació, és a dir es buida el compartiment vesicular i augmenta l'ATP intracel·lular.

El Ca^{++} , doncs, és capaç de mobilitzar l'Ach vesicular.^{12, 13}

Aquesta sèrie de fets invaliden doncs un dels pressupòsits de la hipòtesi vesicular, és a dir, l'existència d'un magatzem de paquets d'Ach preformats que serien utilitzats per l'alliberació. Al contrari, existeix un acoblament síntesi-alliberació en el qual l'Ach utilitzat és el novament sintetitzat que precisament no es troba a l'interior de les vesícules. Aquest acoblament es tradueix per una oscil·lació que suggereix la intervenció d'un o diversos enzims en la fisiologia de la sinapsi i finalment el Ca^{++} pot mobilitzar l'Ach vesicular en els homogeneïtzats.

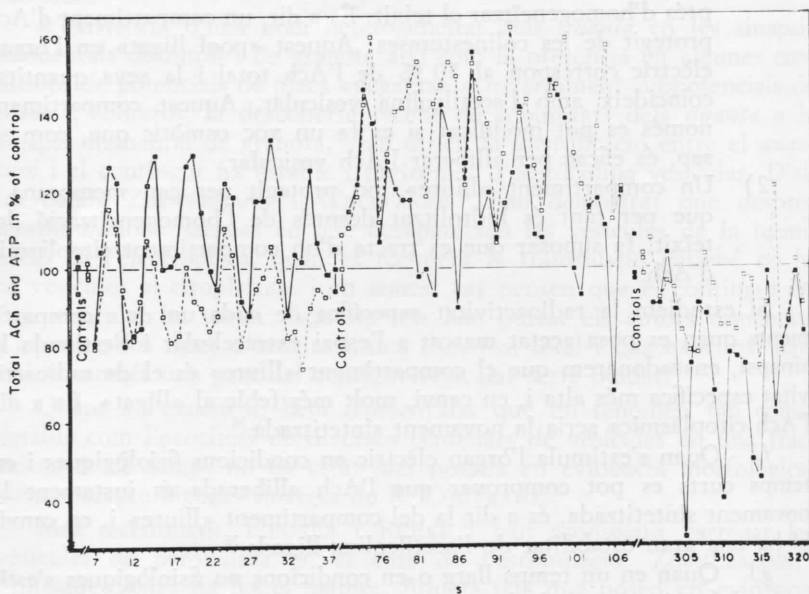


FIG. 2. — Oscil·lacions en «fase» de la quantitat d'acetilcolina i d'ATP en l'òrgan elèctric durant l'estimulació.

Però els sustentadors de la hipòtesi vesicular oposen a aquests arguments la possibilitat de que l'Ach citoplàsmica sigui un artefacte de fraccionament i que correspongui a una població làbil de vesícules que es perdrien durant l'homogeneïtzació. Recentment, ZIMMERMANN i WHITTAKER han isolat dues poblacions de vesícules. Una població menys

densa (VP₁) sense contaminació de membranes que correspondria a la coneguda fins ara, i una població més densa (VP₂) associada a fragments de membrana i que diuen derivada de la regió pre-sinàptica pròxima a l'espai sinàptic.

Segons aquests autors, el mediador novament sintetitzat estaria a VP₂ i aquest procés seria incrementat per l'estimulació.³⁸

Com podem constatar aquesta polèmica centra avui un dels capítols més importants de la neurobiologia i recorda per la seva duració i pel seu apassionament la polèmica entre neuronisme i reticularisme de l'època de Cajal.

El nostre laboratori ha volgut sortir del marc estricte de la polèmica i, d'una banda, hem començat a estudiar sense prejudicis el transport, la distribució del Ca⁺⁺ a l'element pre-sinàptic i la seva relació amb l'alliberament d'Ach. D'altra banda, l'acció dels nucleòtids sobre la transmissió i l'activitat de les ATP-asas de la sinapsi en la seva activitat.

Finalment, estem estudiant el cicle vesicular i la seva possible relació amb l'alliberació del transmissor.

TRANSPORT I DISTRIBUCIÓ DEL CALCI A LES TERMINACIONS NERVIOSES COLINÈRGiques. — Exposarem avui els nostres resultats sobre el transport i la distribució del Ca⁺⁺ i el paper dels nucleòtids en l'activitat sinàptica.

Una vegada més descriurem breument el material amb el qual treballam i els mètodes utilitzats.

Quan volem estudiar els fenòmens fisiològics en l'òrgan elèctric sencer, efectuem l'estimulació en camp, tenint sempre la precaució de mantenir el teixit submergit en la solució fisiològica per evitar la dissipació de l'energia de la descàrrega en el propi teixit.

L'estimulació i el registre de la resposta electrofisiològica ens permet mesurar la quantitat d'Ach alliberada, així com també ens ho permet la incubació del teixit amb acetat marcat i la recollida dels perfusats després de rentar l'acetat de l'espai extracel·lular i estimulant el teixit.

Aquesta alliberació d'Ach es pot produir també augmentant la concentració de K⁺ de la perfusió que, com se sap, és un despolaritzant de la membrana sinàptica. Però, darrerament, utilitzem un material molt més específic per als nostres treballs que és l'element pre-sinàptic aïllat i funcional en una fracció de gran puresa i homogeneïtat, que ens ha permès l'estudi del transport del Ca⁺⁺ en les terminacions nervioses colinèrgiques.³⁴

Finalment l'isolament d'una fracció relativament concentrada i morfològicament homogènia de vesícules sinàptiques de l'òrgan elèctric ens facilita l'estudi de les distribucions intracel·lulars.¹³

Els estudis electrofisiològics i bioquímics fins ara publicats demostren l'entrada de Ca^{++} extracel·lular a la terminació nerviosa i la necessitat d'aquesta entrada de Ca^{++} per l'alliberació del mediador.³⁹

Nosaltres hem volgut comprovar aquest fet i estudiar-ne les seves característiques en un material homogeni, colinèrgic pur i pre-sinàptic com són els sinaptosomes d'òrgan elèctric (fig. 3). Però això, hem utilitzat ^{45}Ca i hem estudiat la seva incorporació a la terminació nerviosa en condicions de repòs i d'estimulació amb K^+ o amb drogues despolaritzants.

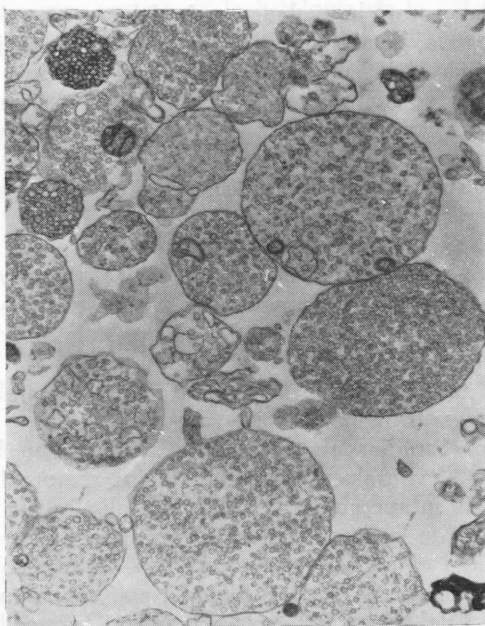


FIG. 3. — Terminacions nervioses aïllades (sinaptosomes) de Torpedo M. X. 35.000.

1) Això ens ha permès demostrar que l'entrada de Ca^{++} és una funció de la concentració de K^+ extracel·lular fins a un màxim de 100 mM K^+ en què hi ha una saturació o inactivació del sistema d'entrada (fig. 4).

2) Quan l'entrada de Ca^{++} és una funció del temps entre 10'' i 2' on es troba també una saturació del sistema (fig. 5).

3) Que es produeix una entrada de Ca^{++} en la situació de repòs de 0,07 p mol/cm²/s⁻¹ que es veu incrementada a 0,16 p mol/cm²/s⁻¹ en la despolarització potàssica.

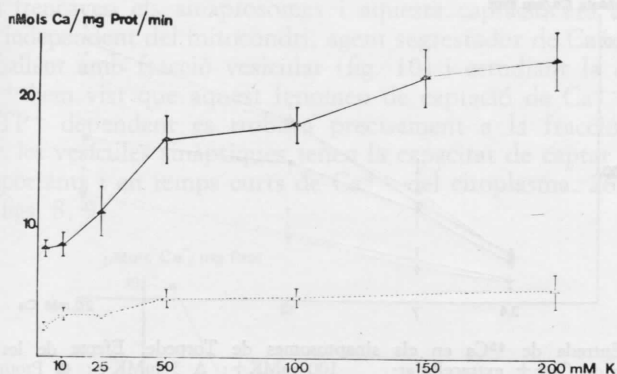


FIG. 4. — Entrada de ^{45}Ca en els sinaptosomes en funció de distintes concentracions de potassi extracel·lular.

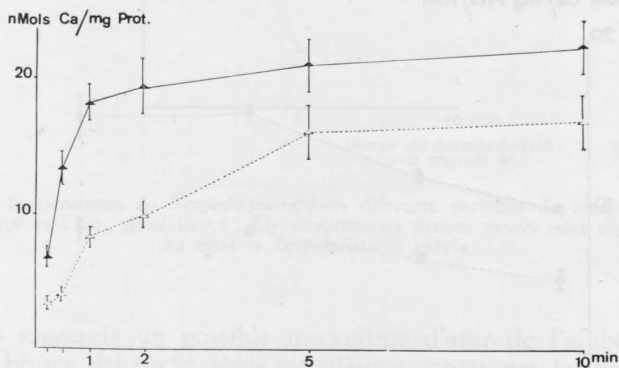


FIG. 5. — Entrada de ^{45}Ca en els sinaptosomes de Torpedo en funció del temps, Els sinaptosomes foren despolaritzats amb 100 mM K^+ .

4) Que l'entrada de Ca^{++} és una funció de la concentració de Ca^{++} extracel·lular i que la proporció es lineal (fig. 6 a).

5) Que la protoveratrina i la titiustoxina, drogues despolaritzants, provoquen una entrada de Ca^{++} inhibida per la tetrodotoxina que bloqueja el Canal Na^+ (fig. 6 b).

6) La tetrodotoxina no inhibeix l'entrada de Ca^{++} quan la despolarització és fa amb K^+ .

Aquests resultats confirmen l'entrada de Ca^{++} a la terminació en la despolarització en un sistema colinèrgic i la seva quantificació en el nostre material, i ens indiquen també que aquesta entrada de Ca^{++} no

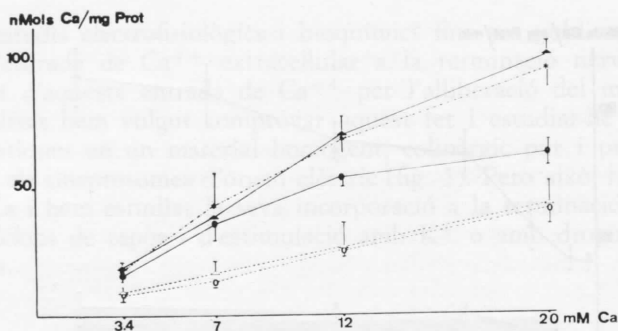


FIG. 6 a.—Entrada de ^{45}Ca en els sinaptosomes de Torpede. Efecte de les diferents concentracions de Ca^{++} extracel·lular: 100 mM K $^{+}$; Δ 3 mM K $^{+}$; $\bullet$ Protoveratrina; $\circ$ Protoveratrina més tetrodotoxina; * mM K $^{+}$ més tetrodotoxina.

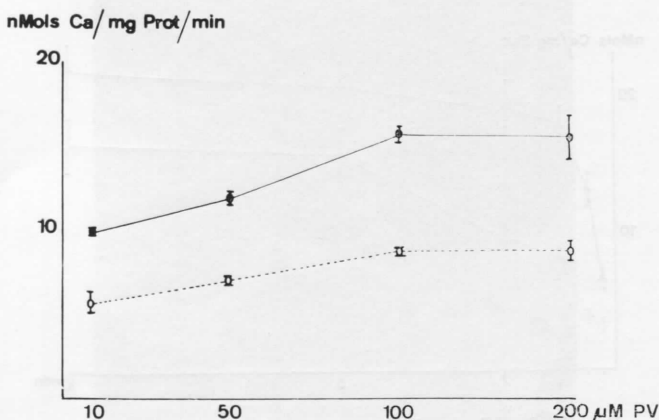


FIG. 6 b.—Entrada de ^{45}Ca en funció de distintes concentracions de Protoveratrina. L'efecte d'aquesta droga és inhibït en presència de tetrodotoxina (TTX).

és estrictament dependent del canal Na^{+} i més aviat suggereix l'existència d'un canal Ca^{++} específic. Finalment, i com a resultats preliminars, hem trobat que aquesta entrada de Ca^{++} per la despolarització amb K^{+} és transitòria, cosa que ens porta a pensar en una inactivació del canal Ca^{++} potser per un excés de Ca^{++} intracel·lular (fig. 7). Buscant la distribució d'aquest Ca^{++} que entra en la terminació nerviosa, hem descobert un fenomen que pot explicar els fets descrits per BLASTEIN⁴¹ el qual, mentre treballava amb sinaptosomes de cervell va veure que la captació ATP^{-} dependent de Ca^{++} era molt més important

quan es trencaven els sinaptosomes i aquesta captació era en la seva majoria independent del mitocondri, agent segrestador de Ca^{++} conegut.

Treballant amb fracció vesicular (fig. 10) i estudiant la distribució del Ca^{++} hem vist que aquest fenomen de captació de Ca^{++} intracel·lular ATP- dependent es trobava precisament a la fracció vesicular. És a dir, les vesícules sinàptiques tenen la capacitat de captar quantitats molt importants i en temps curts de Ca^{++} del citoplasma. 265 p mols/g/min (figs. 8, 9).

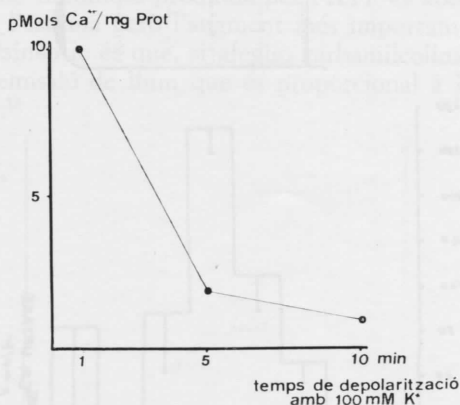


FIG. 7. — Sinaptosomes de Torpedo preincubats diferents períodes de temps amb mitjà fisiològic 100 mM K⁺, sense Ca⁺⁺. Els sinaptosomes prenen menys calci com més llarga ha estat la despolarització prèvia.

Això suggereix un possible mecanisme d'atur de l'alliberació per retirada brusca del Ca^{++} iònic citoplàsmic captat per les vesícules sinàptiques.

Sabem també que el Ca^{++} «deslliga» l'Ach vesicular i aquest podria ser el mecanisme d'alimentació del compartiment «lliure».

L'entrada de Ca^{++} pot ser efectuada per una bomba de Ca^{++} atès que BREER i col.⁴² han descobert una ATP-asa Ca^{++} , Mg^{++} a la membrana de la vesícula sinàptica.

Fins aquí els nostres resultats i les nostres hipòtesis de treball en aquest camp; passarem ara a veure quin és el paper dels nucleòtids en la transmissió sinàptica.

ACCIÓ DELS NUCLEÒTIDS SOBRE L'ALLIBERACIÓ D'ACETILCOLINA I MEDIACIÓ RETRÒGRADA. — La presència d'ATP a les vesícules sinàptiques en proporció de 1/5 amb l'Ach,¹³ l'oscil·lació de la quantitat d'ATP en fase amb l'Ach ens va portar a estudiar el paper de l'ATP durant

l'alliberació d'Ach. Ja sabíem que durant l'estimulació en moltes terminacions nervioses hi havia una alliberació d'ATP i també en l'òrgan elèctric, però gràcies a un muntatge fet amb ISRAEL i col. varem poder demostrar que la major part de l'ATP alliberat a l'òrgan elèctric era postsinàptic.¹³

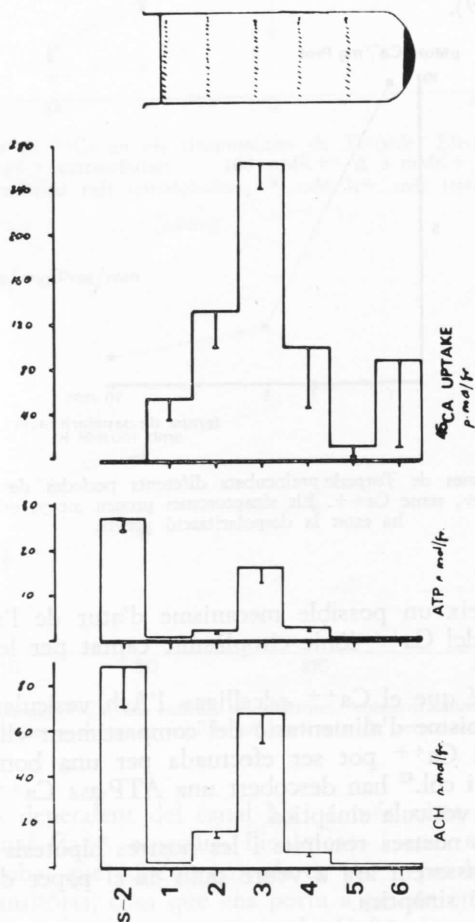


FIG. 8. — Contingut d'acetilcolina, d'ATP i capacitat per captar i retenir calci en presència d'ATP, en les distintes fraccions que s'obtenen de l'homogeneïtat d'òrgan elèctric en els gradients discontinus de sacarosa. La capa 3 correspon a la fracció vesicular. Conté la màxima quantitat d'acetilcolina i d'ATP, així com és la que reté més quantitat de calci en presència d'ATP.

Per això varem perfundir l'òrgan elèctric amb un extracte de Firefly que conté un sistema enzimàtic luciferin-luciferasa que emet fotons en presència d'ATP de tal manera que és el mètode més utilitzat per dosificar l'ATP per la seva especificitat i gran sensibilitat. Si es col·loca davant del teixit un fotomultiplicador es pot enregistrar l'emissió de fotons i la resposta electrofisiològica alhora. Doncs bé, cada estimulació del nervi va acompanyada per una emissió de llum que augmenta segons el nombre de pulsos (fig. 11).

Aquesta emissió lluminosa produïda per l'ATP és abolida pel curare i augmentada per l'eserina però l'augment més important que demostra el seu origen postsinàptic és que, si afegim carbamilcolina a la perfusió, es desencadena l'emissió de llum que és proporcional a la concentració de carbamilcolina.¹³

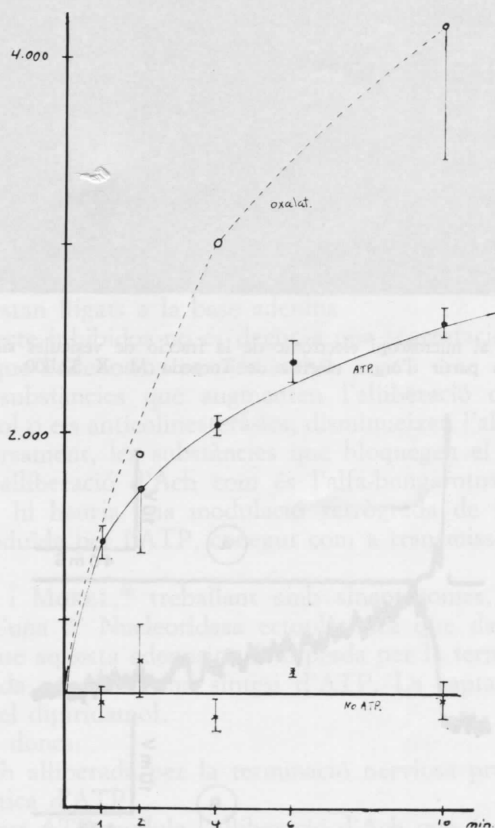


FIG. 9.— Entrada de ^{45}Ca a les vesícules aïllades de Torpedo. Les vesícules capten molt més calci en presència d'ATP. L'oxalat potàssic fixa a l'interior de les vesícules el calci que han captat i aquest és un fenomen ATP-dependent.

Així doncs:

a) L'alliberació d'ATP és una conseqüència de l'acció despolaritzant de l'Ach.

b) Els sinaptosomes també alliberen ATP, cosa que demostra que és un fenomen general en la despolarització de les membranes.

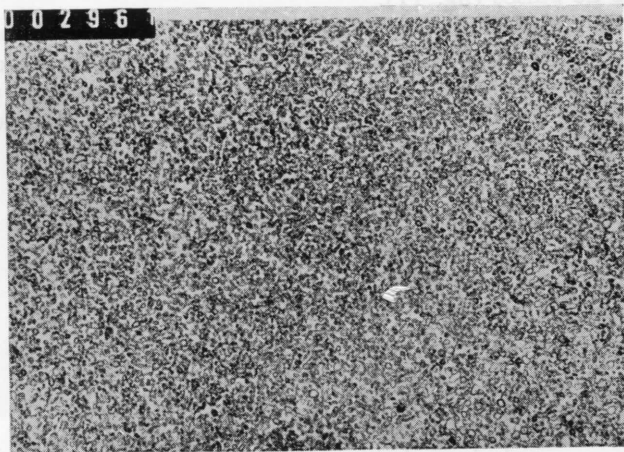


FIG. 10. — Aspecte al microscopi electrònic de la fracció de vesícules sinàptiques aïllades a partir d'òrgan elèctric de Torpedo M. X 32.000.

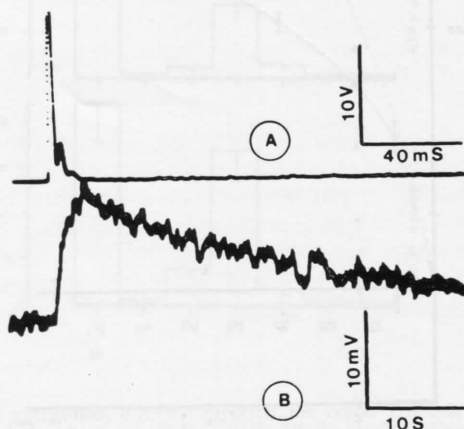


FIG. 11. — Registre simultani de la descàrrega de l'òrgan elèctric i de l'alliberació d'ATP. A) Descàrrega. B) Emissió de llum deguda a l'acció de l'ATP alliberat sobre el «firefly» present en el líquid de perfusió.

c) La major part d'ATP alliberat a l'òrgan elèctric durant l'activitat sinàptica ve de la membrana postsinàptica; l'alliberació pre-sinàptica representa el 2,5 % de l'ATP alliberat.⁴³

d) L'augment de K^+ extracel·lular provoca una alliberació d'ATP postsinàptic.

Davant d'aquest fenomen hi veiem dos problemes:

1) Per quin mecanisme es produïa aquesta alliberació d'ATP?

2) Quina era la seva funció?

Vàrem abordar el segon problema i vàrem intentar descobrir quina era l'acció de l'ATP sobre l'alliberació del mediador.

Estudiant la magnitud d'alliberació del transmissor segons l'amplitud de la resposta electrofisiològica vàrem veure que, afegint ATP al medi d'incubació, disminuïa considerablement l'amplitud de la resposta.

Vàrem provar altres nucleòtids de diferent base com el GTP i CTP i no van tenir efecte sobre la resposta.

També vàrem provar els productes de desfosforilització de l'ATP: ADP, AMP i adenosina i vàrem veure que l'activitat inhibidora de la resposta era més important com menys fosforilada estava l'adenosina, essent aquesta el nucleòtid de màxima activitat. Aquests resultats han estat comprovats amb la recollida de precursors marcats colina o acetat durant l'estimulació.¹³

D'aquests experiments n'hem tret una sèrie de conseqüències:

a) Els efectes inhibidors dels nucleòtids sobre l'alliberació del transmissor estan lligats a la base adenina.

b) L'efecte inhibidor no és degut a una segrestació del Ca^{++} per l'ATP puix que l'adenosina es més activa.

c) Les substàncies que augmenten l'alliberació d'ATP endogen com el carbacol o els anticolinesteràsics, disminueixen l'alliberació d'Ach.

d) Inversament, les substàncies que bloquegen el receptor d'Ach augmenten l'alliberació d'Ach com és l'alfa-bungarotoxina.⁴⁴

És a dir, hi hauria una modulació retrògrada de l'alliberació del mediador produïda per l'ATP, conegut com a transmissor en altres sistemes.⁴⁸

MENNIER i MOREL,⁴⁶ treballant amb sinaptosomes, han demostrat l'existència d'una 5' Nucleotidasa ectoplàsmica que degrada l'AMP a adenosina i que aquesta adenosina és captada per la terminació nerviosa i és fosforilada produint una síntesi d'ATP. La captació d'adenosina és inhibida pel dipiridamol.

Resumint doncs:

a) L'Ach alliberada per la terminació nerviosa provoca l'alliberació postsinàptica d'ATP.

b) Aquest ATP modula l'alliberació d'Ach que és capaç d'inhibir.

c) L'ATP és degradat a adenosina la qual és captada per la terminació aturant així la inhibició.

Respecte al mecanisme d'alliberació, la hipòtesi admès a avui és que l'alliberació d'ATP dependent de la despolarització es produiria gràcies a l'energia generada pels fluxos iònics, que entren a favor del seu gradient en el moment de la despolarització, tal com passa en altres sistemes (mitocondri).

Però encara queden alguns punts foscos:

On actua l'adenosina i com actua? Estem cercant un receptor a l'adenosina tal com es troba en altres teixits (múscul llís); i respecte al mode d'acció hem pogut comprovar en el nostre laboratori que l'adenosina inhibeix l'entrada de Ca^{++} a la terminació nerviosa i aquest podria ser el mecanisme d'inhibició de l'alliberació d'Ach (fig. 12).

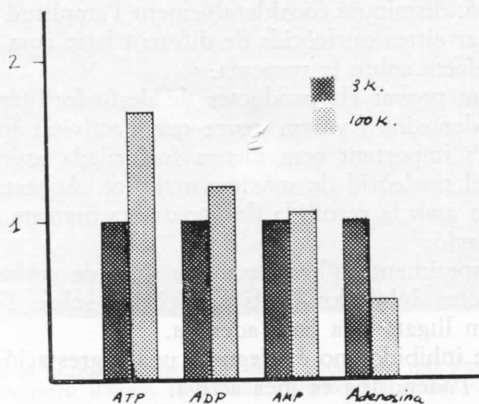


FIG. 12. — Efecte dels nucleòtids en l'entrada de ^{45}Ca en sinaptosomes en repòs i despolaritzats. Els nucleòtids no afecten el fenomen en els sinaptosomes reposats (3 mM K^{+}) mentre que inhibeixen l'entrada de calci deguda a la despolarització (100 mM K^{+}). Aquest efecte és inversament proporcional al grau de fosforilació dels nucleòtids de l'adenina.

Com podem veure aquestes dades no ens permeten encara comprendre com es produeix l'acoblament estimulació-secreció d'acetilcolina, ni el mecanisme d'aquesta secreció. No podem doncs concloure sobre el mecanisme d'alliberació de l'acetilcolina ja que no sabem encara si es fa per exocitosi, si surt per un canal membranari o si és transportada a la membrana, situació que promet nodrig encara la polèmica oberta sobre la qüestió en el món de la neurobiologia.

Universitat de Barcelona. Facultat de Medicina. Laboratori d'Histologia.
 Departament d'Anatomia Patològica. C. S. de Bellvitge.
 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona

BIBLIOGRAFIA

1. JOUVET, M.: The role of monoamines and Acetylcholine containing neurons in the regulation of the sleep waking cycle. *Ergebnisse der Physiologie*, núm. 64, ps. 166-307, 1972.
2. STEM, P., IGIC, R., MUFTIC: Cholinergic mechanisms and aggressivity. In *Cholinergic mechanisms*. Raven Press, ps. 477-482, 1975.
3. DEUTSCH, J. A.: The cholinergic synapse and the site of memory. *Science*, núm. 174, ps. 788-794, 1971.
4. MATTHIES, H., OH, T., KAMMERER, E.: Cholinergic influences on learning. In *Cholinergic mechanisms*. Raven Press, ps. 493-499, 1975.
5. KARCZMAR, A. G.: The chemical coding via the cholinergic system: Its organization and behavioral implications. In *Neurochemical coding of brain Function*. Plenum Press, ps. 399-417, 1974.
6. FARMBOROUGH, P. M., DRACHMAN, D. B., SATYAMURTI, S.: Neuromuscular junction in myasthenia gravis decreased Acetylcholine receptor. *Science*, núm. 182, ps. 293-295, 1973.
7. MONOD, J.: L'hazard i le necessitat.
8. ISRAEL, M., TUCEK, S.: Utilization of acetate and pyruvate for the synthesis of total «bound» and «free» acetylcholine in the Electric organ of Torpedo. *J. Neurochem.*, núm. 22, ps. 487-491, 1974.
9. MOREL, N.: Effect of choline on the rates of synthesis and of release of acetylcholine in the electric organ of Torpedo. *J. Neurochem.*, núm. 27, ps. 779-784, 1976.
10. DIEBLER, M. F., MOROT-GANDRY, Y.: Biosynthesis of Acetyl coenzyme A in the electric organ of Torpedo marmorata in relation to acetylcholine metabolism. *Biochem. J.*, núm. 66, ps. 447-453, 1977.
11. DUNANT, Y., GAUTRON, J., ISRAEL, M., LESBATS, B., MANARANCHE, R.: Les compartiments d'acetylcholine de l'organe électrique et leurs modifications par la stimulation. *J. Neurochem.*, núm. 19, ps. 1.987-2.002, 1972.
12. BABEL-GUERIN, E.: Metabolisme du calcium et liberation de l'acetylcholine dans l'organe électrique de la Torpille. *J. Neurochem.*, núm. 23, ps. 525-532, 1974.
13. ISRAEL, M., LESBATS, B., MANARANCHE, R., MARSAL, J., MASTOUR-FRACHON, P., MEUNIER, F. M.: Related changes in amounts of Ach and ATP in resting and active Torpedo Nerve electroplaque synapses. *J. Neurochem.*, núm. 28, ps. 1.259-1.267, 1977.
14. COUTEAUX, R.: The differentiation of synaptic areas. *Proc. Roy. Soc. B.*, núm. 158, ps. 457-480, 1963.
15. FELDBERG, W., FESSARD, A.: The cholinergic nature of the nerves of the Electric organ of The Torpedo (Torpedo Marborata). *J. Physiol. Lond.*, núm. 101, ps. 200-215, 1942.
16. ISRAEL, M., GAUTRON, J.: Cellular and subcellular localization of Acetylcholine in electric organs. *Symp. of the Int. Sec. of Cell Biol in Structure and Function of nervous tissue 3*. Acad. Press., núm. 8, ps. 137-152, 1969.
17. GRUNDFEST, H., BENNET, M.: Studies on the morphology and electrophysiology of electric organs. *Electrophysiology of marine electric fishes*. From. Bioelectrogenesis. Elsevier Publ., Amsterdam, ps. 92-104, 1961.
18. FATT, P., KATZ, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol. Lond.*, núm. 177, ps. 109-128, 1952.
19. DEL CASTILLO, J., KATZ, B.: Biophysical aspects of neuromuscular transmission. *Prog. Biophys. Chem.*, núm. 6, ps. 121-170, 1954.
20. HUBBARD, J. I.: Mechanisme of Transmitter release. *Prog. Biophys. Mol-Biol.*, núm. 21, ps. 33-124, 1970.
21. DE ROBERTIS, E. D. P., BENNET, H. S.: Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, núm. 1, ps. 47-58, 1955.
22. DEL CASTILLO, J., KATZ, B.: Local activity at a depolarized nerve-muscle junction. *J. Physiol.*, núm. 128, ps. 396-411, 1955.
23. PALAY, S. L.: Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, núm. 2, ps. 193-201, 1956.
24. DOUGLAS, W. W., POISNER, A. M.: On the relation between ATP splitting and secretion in the adrenal chromaffin cell: Extrusion of ATP during release of catecholamines. *J. Physiol.*, núm. 183, ps. 249-256, 1966.
25. ISRAEL, M., GAUTRON, J., LESBATS, B.: Isolement des vesicules synaptiques de l'organe électrique de la Torpille et localitation de l'acetylcholine à leur niveau. *CR. Acad. Sci., Paris*, núm. 266, ps. 273-275, 1968.

26. MARCHBANKS, R. M., ISRAEL, M.: The association of recently synthesized acetylcholine with synaptic vesicles. *Trans. Biochem. Soc.*, núm. 1, ps. 131-134, 1973.
27. DENNIS, M., MILEDI, R.: Lack of correspondence between the amplitudes of Spontaneous potentials and unit potentials evoked by nerve impulses at regenerating neuromuscular junction. *Nature New Biol.*, núm. 232, ps. 126-128, 1971.
28. KATZ, B., MILEDI, R.: Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, núm. 196, ps. 59-72, 1977.
29. WERNIG, A., STIRNER, H.: Quantal amplitude distributions point to functional unity of the synaptic «active zone». *Nature*, núm. 269, ps. 820-822, 1977.
30. ZIMMERMANN, H., WHITTAKER, V. P.: Effect of electrical stimulation on the field and composition of synaptic vesicles from cholinergic synapses of the electric organ of Torpedo. A combined biochemical, electrophysiological and morphological study. *J. Neurochem.*, núm. 22, ps. 435-450, 1974.
31. ZIMMERMANN, H., DEUSTON, C. R.: Recycling of synaptic vesicles in the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ during induced transmitter release. *J. Neurochem.*, núm. 2, ps. 695-714, 1977.
32. COUTEAUX, R., PECOT-DECHEVASSINE, M.: Données ultrastructurales et cytochimiques sur les mécanismes de libération de l'acetylcholine dans la transmission synaptique. *Arch. Ital. Biol.*, III, ps. 231-262, 1973.
33. HEUSER, J. E., REESE, T. S.: Evidence for recycling of synaptic vesicles membranes during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.*, núm. 57, ps. 315-344, 1973.
34. MOREL, N., ISRAEL, M., MANARANCHE, R., MASTOUR-FRACHON, P.: Isolation of pure cholinergic nerve endings from Torpedo electric organ. Evaluation of their metabolic properties. *J. Cell. Biol.*, núm. 75, ps. 43-45, 1977.
35. FONNUM, F.: The «compartmentation» of choline acetyltransferase within the synaptosome. *Biochem. J.*, núm. 103, ps. 262-270, 1967.
36. DUNANT, Y., ISRAEL, M.: Acetylcholine Turnover in the course of stimulation in Cholinergic Mechanisms. Raven Press, ps. 161-167, 1975.
37. ISRAEL, M., DUNANT, Y., LESBATS, B., MANARANCHE, R., MARSAL, J., MEUNIER, F.: Rapid acetylcholine and adenosine triphosphate oscillations triggered by stimulation of the Torpedo electric organ. *J. exp. Biol.*, núm. 63, ps. 1-11, 1979.
38. ZIMMERMANN, H., WHITTAKER, V. P.: Morphological and Biochemical heterogeneity of cholinergic synaptic vesicles. *Nature*, núm. 267, ps. 633-635, 1977.
39. KATZ, B., MILEDI, R.: The role of Calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol. Lond.*, núm. 195, ps. 481-492, 1968.
40. FIOL, C., MARSAL, J., ESQUERDA, J., DURANA, C., MESTRES, M.: ^{45}Ca uptake by pure cholinergic nerve endings from the electric organ of Torpedo marmorata. Sixth Int. Meet. of I. S. N., *Proc. ISN*, núm. 6, p. 190, 1977.
41. BLAUSTEIN, M. P., RATZLAFF, R. W., KENDRICK, N. C., SCHWEITZER, E. S.: Calcium Buffering in Presynaptic Nerve Terminals. *J. Gen. Physiol.*, núm. 72, ps. 16-40, 1978.
42. BREER, H., MORRIS, S. J., WHITTAKER, V. P.: Adenosine Triphosphatase Activity associated with purified cholinergic synaptic vesicles of Torpedo marmorata. *Eur. J. Biochem.*, núm. 80, ps. 313-318, 1977.
43. ISRAEL, M., MEUNIER, F. M.: The release of ATP triggered by transmitter action and its possible physiological significance: retrograde transmission. *J. Physiol., París*, núm. 74, ps. 485-490, 1978.
44. MILEDI, R., MOLENAAR, P. C., POLAK, R. L.: Bungarotoxin enhances transmitter «released» at the neuromuscular junction. *Nature*, núm. 272, ps. 641-643, 1978.
45. BURNSTOCK, G.: Prinergeric nerves. *Pharm. Rev.*, núm. 24, ps. 509-581, 1972.
46. MEUNIER, F. M., MOREL, N.: Adenosine uptake by cholinergic synaptosomes from Torpedo electric organ. *J. Neurochem.*, núm. 54, ps. 845-851.