Universitat de Lleida

Atròfia Muscular Espinal: Mecanismes Patogènics i Estratègies Terapèutiques en Models Murins de la Malaltia

Clàudia Cerveró Cebrià

http://hdl.handle.net/10803/399028

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

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

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

A qui tot i oblidar, sempre serà recordat.

Universitat de Lleida

Atròfia Muscular Espinal: Mecanismes Patogènics i Estratègies Terapèutiques en Models Murins de la Malaltia.

Clàudia Cerveró Cebrià

Per a l'obtenció del títol de Doctora en Ciències de la Salut per la Universitat de Lleida

2016

Programa de Doctorat en Salut

Directors

Dr. Jordi Calderó Pardo

Dra. Olga Tarabal Mostazo

(Departament Medicina Experimental)

ÍNDEX

ÍNDEX

ÍNDEX vii

AGRAÏMENTS xiii

RESUM xvii

1. Resum xix

2. Resumen xxi

3. Summary xxiii

ABREVIATURES xxv

I. INTRODUCCIÓ 1

1. L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL 1

2. CLASSIFICACIÓ CLÍNICA 2

2.1. Tipus I (Malaltia de Werdnig-Hoffman) 2

2.2. Tipus II (Malaltia de Dubowitz) 2

2.3. Tipus III (Malaltia de Kugelberg-Welander) 2

2.4. Tipus IV 3

3. BASE MOL.LECULAR I GENÈTICA DE LA MALALTIA 3

3.1. Gen 3

3.2. Transcript 4

3.3. Proteïna 6

4. FUNCIÓ DE L'SMN 7

4.1. Funció housekeeping 7

4.2. FUNCIONS ESPECÍFIQUES 11

5. MODELS MURINS D'ATROFIA MUSCULAR ESPINAL 17

6. L'AME com a malaltia multisistèmica 20

6.1. Afectació del sistema neuromuscular 20

6.2. Afectació d'altres poblacions neuronals 22

6.3. Afectació de la glia 23

6.4. Afectació de cèl·lules i teixits més enllà del sistema nerviós 24

7. TERÀPIES 25

7.1. Teràpies dependents d'SMN 25

7.2. Teràpies independents d'SMN 26

II. OBJECTIUS 29

III. MATERIALS I MÈTODES 33

1. ANIMALS I MANTENIMENT DE LA COLÒNIA 35

2. PROVES D'HABILITAT MOTORA I DETERMINACIÓ DEL PES DELS ANIMALS 36

2.1. Righting Reflex (RR) 36

2.2. Tube test (TT) 36

2.3. Pen test 37

2.4. Grip test 37

2.5. Paw print 38

3. GENOTIPATGE ANIMALS 38

3.1. Obtenció DNA 38

3.2. Preparació de la PCR 38

3.3. Separació de fragments de DNA per electroforesi en gel d'agarosa 40

4. AXOTOMIA DEL NERVI CIÀTIC 40

5. Paràlisi amb toxina botulínica 40

6. TRACTAMENTS amb potencials agents terapèutics 41

6.1. Administració d'"AICAR"(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) 41

6.2. Administració de l'agonista del receptor Sigma-1: PRE-084 (2-(4Morpholinethyl) 1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride) 41

7. TÉCNIQUES DE MICROSCOPIA ÒPTICA I DE FLUORESCÈNCIA 41

7.1. Obtenció de mostres, dissecció i processament 41

7.2. Tincions histològiques clàssiques 43

7.3. Tincions immunocitoquímiques 45

7.4. Anàlisi dels resultats. Obtenció i processament d'imatges 47

8. TALLS SEMIFINS I MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA 48

8.1. Obtenció i processament de mostres 48

8.2. Obtenció de les seccions i tincions 48

8.3. Anàlisi dels resultats: Obtenció i processament d'imatges 49

9. WESTERN BLOT 49

9.1. Obtenció i preparació de les mostres 49

9.2. Electroforesi reductora en gels d'acrilamida (SDS-PAGE) 50

9.3. Transferència de les proteïnes a la membrana de polifluorur de viniliden (PVDF) per electrotransferència 50

9.4. Detecció immunoquímica 51

9.5. Anàlisi dels resultats 51

10. CITOMETRIA DE FLUX 52

10.1. Obtenció i preparació de les mostres 52

10.2. Marcatge d'antígens de superfície 52

10.3. Anàlisi dels resultats 53

11. ANÀLISI ESTADÍSTICA 53

IV. RESULTATS CAPÍTOL I 55

CANVIS FENOTÍPICS EN EL RATOLÍ *Smn*$^{2B/-}$, COM A MODEL D'AME D'EVOLUCIÓ INTERMÈDIA. 57

1. INTRODUCCIÓ 59

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS 59

3. RESULTATS 60

V. RESULTATS CAPÍTOL 2 123

ASSAIG TERAPÈUTIC AMB PRE-084, AGONISTA DEL RECEPTOR SIGMA-1, EN ELS MODELS SMNΔ7 I *Smn*$^{2B/-}$ 125

1. INTRODUCCIÓ 127

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS 129

3. RESULTATS 129

VI. RESULTATS CAPÍTOL 3 153

EFECTES TERAPÈUTICS DE L'AICAR, AGENT FARMACOLÒGIC MIMÈTIC DE L'ACTIVITAT FÍSICA, EN EL MODEL SMNΔ7 155

1. INTRODUCCIÓ 157

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS 158

3. RESULTATS 158

VII. DISCUSSIÓ CAPÍTOL 1 177

VIII. DISCUSSIÓ CAPÍTOL 2 189

IX. DISCUSSIÓ CAPÍTOL 3 195

X. CONCLUSIONS 203

XI. APÈNDIX 207

1. Apèndix 1: Anticossos per tincions immunocitoquímiques. 209

2. Apèndix 2: Anticossos per Western Blot. 211

3. Apèndix 3: Anticossos per citometria de flux. 213

XII. ANNEX 215

XIII. REFERÈNCIES 237

AGRAÏMENTS

Arriba el moment de posar fi a una etapa més. Una etapa que podria semblar curta, però que ha estat repleta d'experiències, records, sentiments i moments que han repercutit en un aprenentatge tant a nivell acadèmic com personal i que no havera sigut possible sense la participació de moltes persones.

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus directors, a Jordi i Olga, per obrir-me les portes a la neurociència i per la confiança que m'han dipositat durant aquests anys. Gràcies per la vostra paciència i per tota l'ajuda rebuda. Voldria agrair especialment a Josep, pels seus comentaris i els valuosos consells que m'han permès tirar endavant el meu treball, gràcies per ser una font continua de coneixements i per compartir-los amb tots nosaltres. A Anna, per la seua disponibilitat tant a nivell professional com personal, gràcies per la paciència amb els ganglis, i sobretot amb la nostra insistència. Gràcies a Lídia per tenir sempre la solució, i perquè, de no ser per ella, el "moc de proteïna" havera acabat amb mi. A Marta, gràcies per oferir sempre la teua ajuda, per no esperar a que t'ho demanen i per sempre estar ahí quan ho he necessitat. A Montse, pel teu optimisme contagiós i per saber sempre arrancar-nos un somriure. A Sara, que malgrat no treballar directament amb ella, ha sigut un plaer coincidir al lab i organitzar-nos cada dia per no coincidir al ChemiDoc. A Rai, por tus historias de Granada, por las charlas en las que pretendíamos arreglar el mundo y porque gracias a ti he aprendido que, a pesar de los contratiempos, nunca es tarde para hacer lo que a uno realmente le apasiona. A tots els qui han anat passant pel lab, a Maria, a Àlex i especialment a Neus i a Alba per la participació en aquest treball; als qui tornen, a Jordi; i als qui es queden, a Sara "petita", per recordar-nos la il·lusió amb que es comença una tesi, desitjar-te molta sort amb el que ara comença per a tu. A Ari, que ha sigut una genial companya de laboratori i una amiga fora del lab, gràcies per totes les converses, per escoltar-me i sempre tenir les paraules adequades.

Igualment voldria donar les gràcies a Conchi, per tot el que m'ha ensenyat d'immunologia, per assessorar-me quan estava completament perduda i per estar sempre disposada a ajudar-nos. A Anaïs, per ajudar-me amb la part més tècnica de la citometria de flux. Al Dr. Kothary per cedir-nos els ratolins que m'han acompanyat durant aquest temps. A Ferran, perquè malgrat molestar-te cada dos per tres sempre m'has contestat amb l'opció correcta.

A nivell personal, voldria agrair a tota la gent que en la distància et fan sentir més a prop de casa. Als qui esperen a la *terreta*, a Jose, a Jordi, a Neus i a Cristian, gràcies per totes les rialles, pels bons moments i perquè el projecte 4S segueix pendent. A qui és impossible veure, a Mónica, et promet que prompte coincidirem. A qui mai saps on trobaràs, però acaba estant en tots els "fregaos", a Zaira. A Miryam, perquè hem de fer "quadrilleta". A Sarah, per entendre'm

millor que ningú, per donar-nos els pitjors consells i perquè és l'única persona capaç d'enviar-me una foto tan compromesa i fer-me sentir tant d'amor, però sobretot, perquè trobe a faltar la teua manera de saludar-me cada matí i "las esquinitas" de cada nit.

Gràcies a tots els qui no ho diuen però no volen que arriben les vesprades de diumenge, als qui es conformen amb llargues converses de telèfon i curtes visites de cap de setmana: a tota la meua família. A mon pare, per les racions extra de la millor paella; a ma mare, perquè sempre és la primera en escoltar-me quan estic contenta, però també la primera en aguantar el meu mal humor. A Pau, per no perdre la costum i seguir desesperant-me des de la distància, però arreglar-ho tot amb un "*Rantamplan*". A Mayte, per aconseguir el que jo tant intentava de ben xicoteta: emportar-se al meu germà ben lluny. A mon tio Rafa i ma tia Encarna, per estar disponibles per fer un sopar o un dinar en qualsevol moment; a Cris, perquè no en tinc altra, però encara que en tinguera cent mil més seguiria sent la millor cosina del món. A ma tia Carme, per tranquil·litzar-me i sempre animar-me a aprofitar al màxim el temps "lluny" de casa, però fer-me sentir al mateix temps quasi a casa. A Josep i Lores, per eixa habitació que sempre està disponible i perquè el Nadal acaba quan ells se'n van. A Esther, per cada conversa que es converteix en una lliçó de vida. A la *uela* Carme, per les coquetes, i per les cridades que ens sorprenen a les dos i acaben amb un "*si tu estàs contenta, nosaltres també*". A la *uela* Tonica, per voler cosir-me cada pantaló i per cada "*bon viatge filla*" que em falta.

A vosotros también, a los que esperáis otros fines de semana, gracias por hacerme sentir una más desde el principio. A Liria, por todos los buenos consejos. A Rubén, a Paula, y especialmente a Martina, por su inocencia, su alegría y porque verla sonreír es suficiente para animarnos el día a todos. Y a Antonio, darle las gracias por los *bracicos* de gitano y pedirle perdón por las partidas ganadas al rabino.

Y a ti, Javi. Te dejo para el final porque no sabría dónde encajarte, has formado parte de esta experiencia lo mires por donde lo mires. Gracias por toda tu comprensión, tu apoyo y por hacer fácil lo difícil. Gracias por aguantarme, por motivarme y por enseñarme que sólo basta con decir SÍ para que todo vaya bien. Has sido el mejor compañero de trabajo, pero sobre todo, eres el mejor compañero de vida.

I a tots aquells que no han participat directament en aquest treball, ni han estat presents durant aquesta etapa però han format part de la meua vida, també voldria agrair-los perquè, d'una manera o altra, han fet que haja arribat fins ací.

GRÀCIES A TOTS!

RESUM

1. RESUM

L'atròfia muscular espinal (AME) és una malaltia genètica que cursa amb mort de motoneurones espinals i paràlisi muscular.

S'ha caracteritzat un model murí d'AME, l'*Smn*$^{2B/-}$, amb una clínica menys severa que la mostrada per altres models més extensament utilitzats. S'ha evidenciat una alteració multisistèmica acompanyant a la clàssicament coneguda del sistema neuromuscular.

S'han estudiat les sinapsis colinèrgiques tipus C en l'AME i testat el paper del PRE-084 (agonista del receptor sigma-1 present en aquestes) com a possible teràpia en els models SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$. Malgrat no conferir neuroprotecció, el PRE-084 ha evitat la gliosi pròpia de l'AME.

Finalment, s'ha testat l'efectivitat de l'AICAR, agent mimètic de l'exercici físic, en ratolins SMNΔ7. L'AICAR ha mitigat l'atròfia muscular, els defectes estructurals en les unions neuromusculars i la pèrdua de sinapsis glutamatèrgiques en el soma de les motoneurones, però no ha evitat la mort neuronal ni la reacció glial en la medul·la espinal.

2. RESUMEN

La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad genética que cursa con muerte de motoneuronas espinales y parálisi muscular.

Se ha caracterizado un modelo murino de AME, el *Smn*$^{2B/-}$, con una clínica menos severa que la mostrada por otros modelos más extensamente utilizados. Se ha evidenciado una alteración multisistémica acompañando a la clásicamente conocida del sistema neuromuscular.

Se han estudiado las sinapsis colinérgicas de tipo C en la AME y testado el papel del PRE-084 (agonista del receptor sigma-1 presente en estas) como posible terapia en los modelos SMNΔ7 y *Smn*$^{2B/-}$. A pesar de no conferir neuroprotección, el PRE-084 ha evitado la gliosis propia de la AME.

Finalmente, se ha testado la efectividad del AICAR, agente mimético del ejercicio físico, en ratones SMNΔ7. El AICAR ha mitigado la atrofia muscular, los defectos estructurales en las uniones neuromusculares y la pérdida de sinapsis glutamatérgicas en el soma de las motoneuronas, pero no ha evitado la muerte neuronal ni la reacción glial en la médula espinal.

3. SUMMARY

The spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic disease that affects spinal motor neurons causing its death and paralysis. This study is divided in three parts.

First. Characterization of the *Smn*$^{2B/-}$ mice, a mild SMA phenotype model. A multisistemic affectation was reported to accompany the better known neuromuscular alteration in these mice.

Second. Study of C-type cholinergic synapses in the SMA and therapeutic trial with the sigma-1 receptor agonist PRE-084 (molecule present in C boutons) in the SMNΔ7 and *Smn*$^{2B/-}$ mice. Although PRE-084 did not confer neuroprotection, it prevented the SMA characteristic reactive gliosis.

Third. Treatment with AICAR, an exercise mimetic agent, in SMNΔ7 mice. AICAR mitigated muscular atrophy and structural defects in neuromuscular junctions and prevented loss of glutamatergic synapses in the motoneuron soma but it did not protected against neuronal death and reactive gliosis.

ABREVIATURES

AChR Receptor d'acetilcolina

AChRs Acetilcolina

AICAR *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*

AME Atròfia muscular espinal

AMPK *5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ATP Trifosfat d'adenosina

BotA Toxina botulínica de serotip A

BSA Albúmina de sèrum boví

cDNA DNA complementari

CGRP *Calcitonin gene related peptide*

cM Centimorgan

Contra Costat contralateral

cTEC Cèl·lula epitelial cortical del timus

DAPI *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*

dH_2O Aigua destil·lada

DNA Àcid desoxiribonucleic

DRG Gangli de l'arrel dorsal

ELA Esclerosi lateral amiotròfica

ESE *Exonic splicing enhancer*

ESS *Exonic splicing silencer*

EtOH Etanol

FBS Sèrum boví fetal

FL-SMN *Full length SMN proteïn*

Gap-43 *Growth Associated Protein 43*

GAPDH *gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa*

GFAP *Glial fibrillary acidic protein*

H_2O_2 Aigua oxigenada

IB4 Isolectina B4

IBA-1 *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*

IC Intercostal

Ipsi Costat ipsilateral

K Potassi

Kb Kilobase

KDa Kilodalton

LAL *Levator auris longus*

M Molar

Mb Megabase

mdx Model murí de distròfia muscular de Duchenne

MN Motoneurona

MNs FF MNs de contracció ràpida fàcilment fatigables

MNs FR MNs de contracció ràpida resistents a la fatiga

MNs S MNs contracció lenta resistents a la fatiga

MN-α Motoneurona alfa

mRNA RNA missatger

mTEC Cèl·lules epitelials medul·lars del timus

MyHC Cadena pesada de miosina

Na Sodi

NaCl Clorur de sodi

NF Neurofilament

NMDA Receptor de glutamat *N-methyl-D-aspartate*

NMJ Unió neuromuscular

NRG Neuregulina

P Dia postnatal

pb Parells de bases

PB Tampó fosfat

PBS Tampó fosfat salí

PCR Reacció en cadena de la polimerasa

PFA Paraformaldehid

PGC-1α *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*

PKC *Protein kinase C*

PRE-084 *2-(4-Morpholinethyl) 1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride*

PV Parvalbúmina

PVDF Polifluorur de viniliden

RNA Àcid ribonucleic

rpm Revolucions per minut

RR Righting Reflex

rRNA RNA ribosòmic

SDS Lauril sulfat sòdic

SEM Error estàndard

SG Gränul d'estrès

Sm *Smith antigen*

SMN *Survival Motor Neuron*

SMNΔ7 *Survival Motor Neuron Delta7*

SNC Sistema nerviós central

snoRNPs *Small nucleolar RNPs*

snRNA *Small nuclear RNA*

snRNPs *Small nuclear ribonuclearproteins*

SSC Cisterna subsinàptica

SV Vesícula sinàptica

TA Tibial anterior

TAE Tris-acetate-EDTA

T_c Limfòcit T citotòxic

T_h Limfòcit T helper

tRNA RNA de transferència

TT Prova del "*Tube test*"

TUNEL *Terminal Deoxynucleotydil Transferase dUTP Nick-End Labeling*

VAChT Transportador vesicular d'acetilcolina

VGAT Transportador vesicular de GABA

VGluT1 Transportador vesicular de glutamat 1

WT *Wild type*

α-Bgtx alfa-bungarotoxina

σ-1R Receptor Sigma 1

-xxx-

I. INTRODUCCIÓ

1. L'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL

L'atròfia muscular espinal (AME o SMA de l'anglès *Spinal Muscular Atrophy*) va ser descrita per primera vegada l'any 1891 per Guido Werdnig [1] i de manera independent per Johann Hoffman l'any 1893 [2]. Amb una incidència d'1 entre 6.000-10.000 naixements i una freqüència de portadors d'1 persona de cada 35-50 [3, 4], l'AME és la segona malaltia autosòmica recessiva més freqüent en humans i la primera causa genètica de mort en infants [5, 6]. La malaltia es caracteritza per una pèrdua de les neurones motores inferiors (o motoneurones α) de la banya ventral de la mèdul.la espinal que controlen l'activitat muscular voluntària, i la subsegüent debilitat i paràlisi dels músculs esquelètics (**Figura 1**). Tot i que la severitat clínica de la malaltia varia àmpliament, la debilitat muscular característica de l'AME cursa de manera simètrica, amb una afectació més pronunciada de les extremitats inferiors, així com dels músculs proximals respecte als distals. A més, la disfunció del múscul intercostal comporta complicacions respiratòries causant la mort prematura dels pacients [7]. A part de teràpies pal·liatives, no existeix actualment ni una cura ni un tractament efectiu per a l'AME.

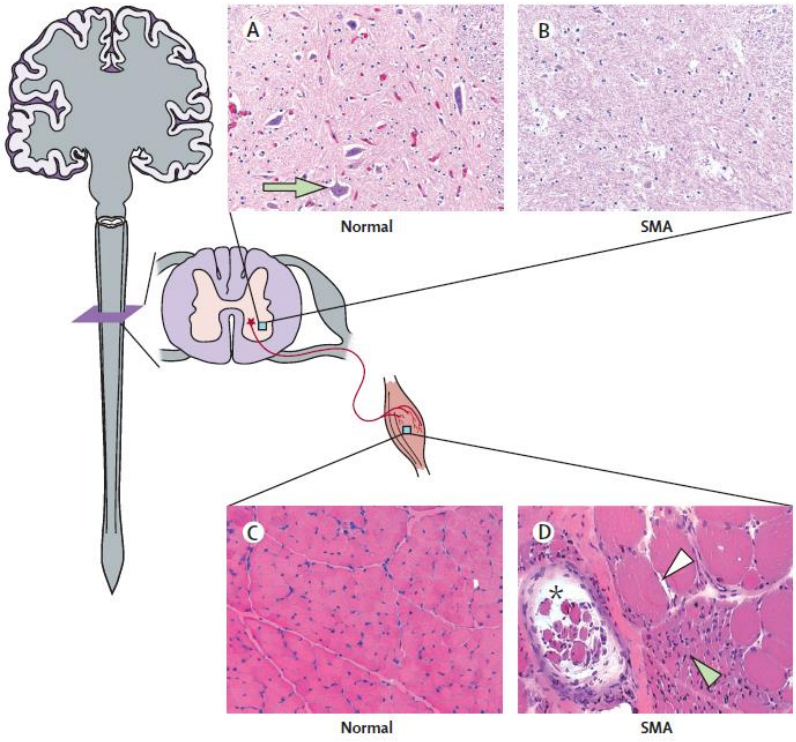


Figura 1. Afectació en l'atròfia muscular espinal*. Les ordres motores es generen al còrtex cerebral i són transmeses a través de les motoneurones α de la medul·la espinal (cèl·lula dibuixada en roig a l'esquema i indicada amb la fletxa verda en (A)). La regió de la banya ventral d'un pacient (B) mostra una absència de motoneurones en comparació amb un control sa (A). El múscul esquelètic d'un pacient (D) presenta grups de fibres atròfiques (punta de fletxa verda) al voltant de fibres hipertròfiques (punta de fletxa blanca) en comparació amb fibres que presenten una morfologia uniforme en músculs sans (C). Figura extreta de [8].*

2. CLASSIFICACIÓ CLÍNICA

En funció de l'edat de l'inici de la malaltia i la màxima capacitat motora adquirida pels afectats, l'AME es classifica en quatre tipus [9, 10] (**Taula 1**). No obstant, en tots els pacients l'estudi clínic i electrofisiològic és consistent amb un trastorn neurogènic en el qual la pèrdua d'unitats motores i el ràpid deteriorament funcional tenen lloc poc temps després de l'inici de la malaltia, normalment seguit d'una fase d'estancament en la qual la força muscular es manté relativament estable [11].

2.1. Tipus I (Malaltia de Werdnig-Hoffman)

És la forma més comú de la malaltia, representant el 50% dels pacients diagnosticats d'AME [12]. Presenta les manifestacions clíniques més severes, diagnosticant-se abans dels 6 mesos de vida [13]. Els afectats presenten una marcada hipotonia i debilitat muscular generalitzada; com a conseqüència, mai arriben a posseir la capacitat de seure. La majoria moren abans dels 2 primers anys de vida, ja que els músculs intercostals estan altament afectats, donant lloc a insuficiència respiratòria i augment del risc d'infeccions. En algunes ocasions i amb suport respiratori, els pacients poden sobreviure més de dos anys [8]. Entre els casos més greus s'inclouen aquells amb inici prenatal, en els quals es pot notar la disminució dels moviments fetals durant l'embaràs [14]. En aquesta forma, coneguda com AME de tipus 0, la debilitat muscular es dóna des del naixement i poden presentar fractures ósses congènites, inclús malformacions cardíaques [15-18].

2.2. Tipus II (Malaltia de Dubowitz)

Els pacients amb AME de tipus II són diagnosticats entre els 6 i els 18 mesos de vida, són capaços de seure's, però la pèrdua progressiva de massa muscular els impossibilita mantenir-se d'empeu i caminar. L'esperança de vida és reduïda, però mai inferior als 2 anys de vida, i en el 70% dels casos viuen més de dos dècades. Com a conseqüència de la debilitat muscular, freqüentment, aquests pacients presenten cifoscoliosis, una curvatura anormal de la columna vertebral, que pot ser corregida amb intervenció ortopèdica i/o quirúrgica [7, 8].

2.3. Tipus III (Malaltia de Kugelberg-Welander)

Els pacients no presenten símptomes clínics abans dels 18 mesos d'edat. La progressió d'aquest tipus d'AME és molt heterogènia: tot i que tots aconsegueixen caminar, en alguns casos es necessària una cadira de rodes durant la infància, mentre que altres pacients mantenen la capacitat de caminar fins l'edat adulta. Malgrat que els afectats presenten una esperança de vida reduïda, normalment arriben a l'edat adulta [19].

2.4. Tipus IV

A més de les tres formes d'AME en infants, existeix un quart tipus on l'inici de la malaltia té lloc a l'edat adulta, normalment a la segona o tercera dècada de vida [20]. El procés neurodegeneratiu és més lent i els pacients poden mantenir una vida relativament normal (no presenten problemes respiratoris i la capacitat de caminar no es perd fins etapes molt avançades), sense veure's reduïda la seua esperança de vida [21].

Tipus	Sinònims	Edat inici	Esperança de vida	Màxima funció motora adquirida
Tipus I	AME infantil aguda *Werdnig-Hoffmann*	<6 mesos	<2 anys	Impossibilitat per seure
Tipus II	AME intermèdia Dubowitz	<18 mesos	>2 anys	Impossibilitat per mantenir-se d'empeu
Tipus III	AME juvenil *Kugelberg-Welander*	>18 mesos	Edat adulta	Capacitat de caminar
Tipus IV	AME adulta	2-3 dècada	Normal	Pèrdua progressiva de la capacitat per caminar

Taula 1. Classificació clínica de l'atròfia muscular espinal.

3. BASE MOL.LECULAR I GENÈTICA DE LA MALALTIA

3.1. Gen

La identificació del gen causant de la malaltia va començar l'any 1990, quan mitjançant anàlisis de lligaments genètics amb pacients amb AME de tipus I, II i III, es va acotar aproximadament a uns 10 cM del cromosoma 5q11.2-q13.3 la regió on podria localitzar-se [22, 23]. El desenvolupament de nous marcadors polimòrfics va permetre reduir l'interval a una regió crítica de menys d'una Mb [24-29]. Finalment, l'any 1995, el gen *Survival Motor Neuron* (*SMN*) va ser identificat com el gen causant de la malaltia [30]. L'*SMN* se situa en una regió complexa d'unes 500 kb altament inestable, la qual és propensa a reordenaments intracromosomals, incloent duplicacions gèniques, conversions gèniques i delecions *de novo* [30].

En la regió genòmica responsable de l'AME es localitzen dos còpies de l'*SMN*: el gen *SMN1* (o telomèric) i l'*SMN2* (o centromèric) (**Figura 2A**). Les dos còpies es diferencien en canvis silenciosos de nucleòtids en 5 posicions específiques [30, 31]. La diferència crítica que ocasiona la funcionalitat parcial del gen *SMN2* és la transició d'un nucleòtid C per un T a la posició +6 de l'exó 7.

El gen *SMN* presenta, a nivell genòmic, una mida de 28 kb i consta de 9 exons i 8 introns [30, 32]. Els transcripts d'*SMN* tenen una mida d'1,5 kb, s'expressen en tots els teixits somàtics i codifiquen per a una proteïna de 294 aminoàcids i 38 kDa [30]. El nivell d'expressió de la proteïna en la medul·la espinal és de l'ordre de 50-100 vegades major quan es compara amb altres teixits [33, 34].

Cal remarcar l'alta conservació al llarg de l'evolució del gen *SMN* el qual es troba present a tots els organismes, des dels llevats fins als humans [35-37]. No obstant, la còpia *SMN2* és exclusiva dels humans, mentre que la resta de vertebrats i invertebrats presenten una única còpia anomenada *Smn* [38].

Al voltant del 98% dels pacients amb AME presenten una pèrdua funcional homozigota del gen *SMN1*, ja siga causada per delecions, reordenaments o mutacions [30, 39]. En canvi, tots els afectats retenen, com a mínim, una còpia del gen *SMN2*. L'absència completa d'*SMN* és embrionàriament letal. Així, el grau de severitat de la malaltia està inversament correlacionat amb el número de còpies d'*SMN2* que presenten aquests individus [40].

3.2. Transcript

Tot i que els gens *SMN1* i *SMN2* difereixen en 5 nucleòtids, els canvis són silenciosos a l'hora de la traducció, codificant llavors per a la mateixa proteïna. No obstant, la variació d'una C per una T en la posició +6 de l'exó 7 al gen *SMN2* altera la seqüència necessària per a la correcta maduració de l'mRNA. Per una banda, s'ha descrit que el canvi de nucleòtid estaria modificant la seqüència d'un ESE (*exonic splicing enhancer*), de manera que s'inhabilitaria la capacitat d'incloure un exó [41]; per altra banda, s'ha proposat que el canvi de C per T estaria creant un nou ESS (*exonic splicing silencers*), provocant així l'eliminació d'un exó de la seqüència [42]. Malgrat que no existeixen estudis concloents per explicar quin és el mecanisme, el resultat és una maduració alternativa (o *splicing* alternatiu) en el 90% dels mRNA provinents d'aquesta còpia del gen (**Figura 2B**). Així, la traducció d'aquests mRNA alternatius dóna lloc a una proteïna truncada, anomenada SMNΔ7, de tant sols 282 aminoàcids on l'exó 7 queda exclòs [43, 44] i que posseeix una capacitat d'oligomerització alterada [45]. Com a conseqüència la seua estabilitat queda reduïda (**Figura 2C**) respecte a la que posseeix la proteïna FL-SMN (de l'anglès f*ull-length*) provinent del gen *SMN1*.

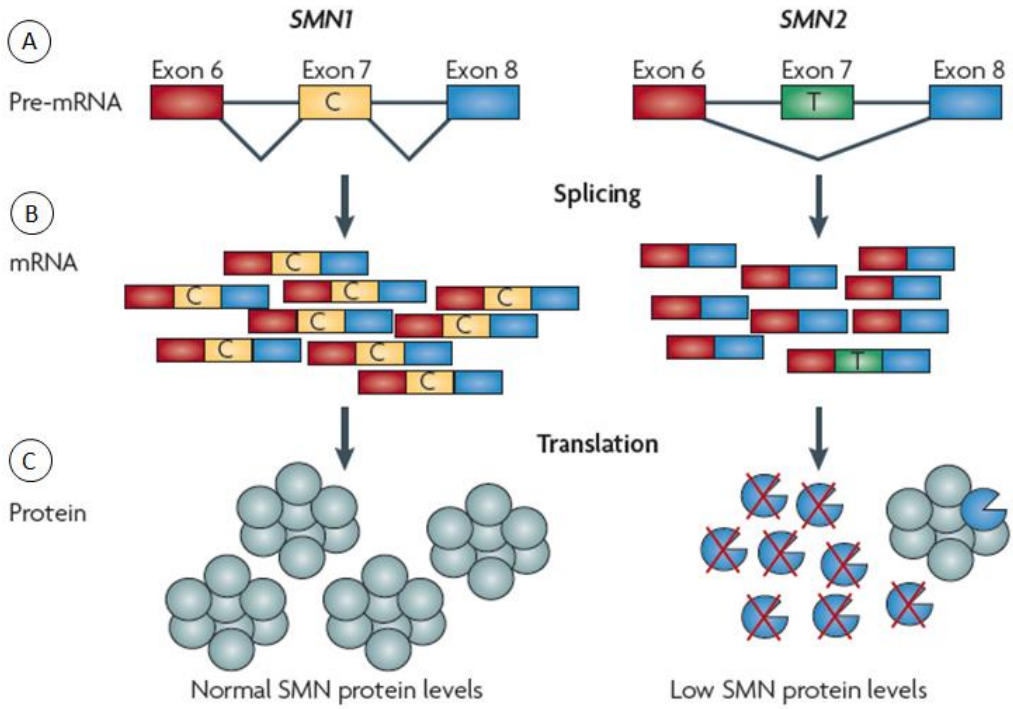


Figura 2. Gens SMN, maduració dels mRNA i traducció. *La pèrdua d'SMN1 determina nivells reduïts de proteïna SMN. A) Els gens SMN1 i SMN2 presenten una seqüència idèntica al 99,9% amb un canvi crític de C per T a la posició +6 de l'exó 7. B) Aquesta variació de nucleòtid afecta a la maduració dels mRNA, de manera que la majoria dels transcripts provinents del gen SMN2 no posseeixen l'exó 7. C) La falta d'aminoàcids codificats per l'exó 7 atorga una capacitat d'oligomerització reduïda, veient-se disminuïda l'eficiència i l'estabilitat de la proteïna SMN. Figura adaptada de [46].*

Malgrat que els dos transcripts provinents del gen *SMN2* són traduïts, la proteïna SMNΔ7 és altament inestable i es degrada ràpidament, donant lloc a nivells inadequats de proteïna SMN funcional. No obstant, el gen *SMN2* manté una productivitat de FL-SMN d'aproximadament un 10%. Per tant, en els individus amb AME que presenten delecions homozigotes de l'*SMN1*, el gen *SMN2* estaria compensant parcialment, però de manera ineficient, la falta de proteïna FL-SMN (**Figura 3**), actuant així, com a un possible modulador positiu de la malaltia. D'aquesta manera, el nombre de còpies de l'*SMN2* (i per tant el nivell de FL-SMN creat pels transcripts *SMN2*) és un determinant de la severitat de la malaltia [47], correlacionant-se un major número de còpies amb una menor severitat. Un exemple d'aquesta capacitat del gen *SMN2* com a modificador de la malaltia és l'existència d'individus que, tot i que presenten delecions homozigotes de l'*SMN1,* no manifesten símptomes d'AME, gràcies a la presència de cinc còpies del gen *SMN2* [48].

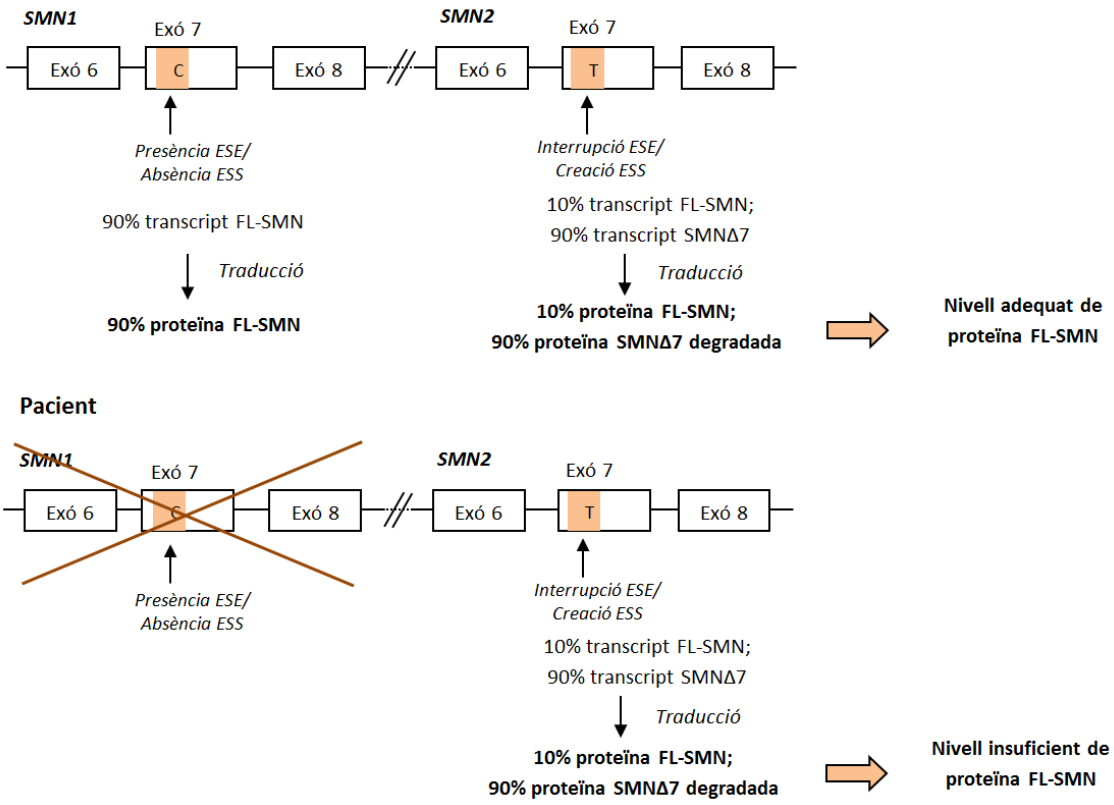


Figura 3. Genètica de l'atròfia muscular espinal. *Els pacients amb AME presenten delecions homozigotes o mutacions puntuals al gen SMN1, però sempre retenen com a mínim una còpia del gen SMN2. Figura adaptada de [49].*

3.3. Proteïna

La proteïna FL-SMN, de 38 kDa, consta de 294 aminoàcids i s'expressa de manera ubiqua [30], amb nivells d'expressió més elevats a les motoneurones de la medul·la espinal [33]. A nivell subcel·lular es localitza tant al citoplasma com al nucli. La distribució citoplasmàtica de la proteïna SMN és difusa, tal i com es va observar amb immunotincions en diversos tipus cel·lulars, i forma part d'un complex multiproteic estable anomenat "complex SMN". Aquest complex SMN està format per la proteïna SMN, les gemines2-8 i l'UNRIP (UNR *interacting protein* o STRAP) (**Figura 4**). En canvi, al nucli es localitza formant unes estructures ben definides anomenades "gems" (de l'anglès *Gemini of coiled bodies*) [33, 50, 51]. Tal i com el seu nom suggereix, aquestes estructures són similars tant en mida com en nombre als Cossos de Cajal (estructures nuclears enriquides en snRNPs (de l'anglès *small nuclear ribonuclearproteins*) [52]) i freqüentment es troben associades ambdós estructures [50].

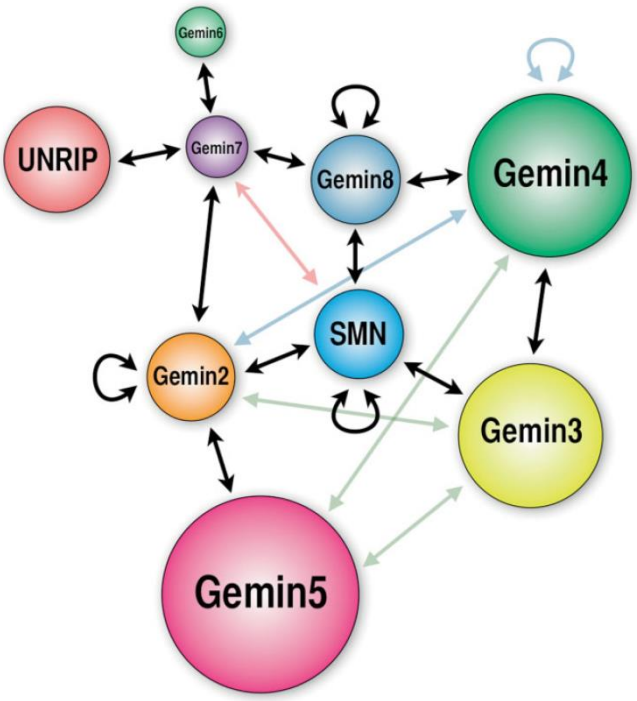


***Figura 4. Estructura del complex SMN**. La proteïna SMN interacciona directa i indirectament amb diferents membres de la família de proteïnes associades als "gems" nuclears. Figura extreta de [53].*

4. FUNCIÓ DE L'SMN

4.1. Funció housekeeping

Els gens housekeeping o constitutius presenten un nivell d'expressió relativament baix a totes les cèl·lules i són necessaris per al manteniment de les funcions cel·lulars bàsiques (**Figura 5**). Tal i com s'ha comentat anteriorment (apartat 3.3, Pag. 6) l'*SMN* s'expressa a tots els tipus cel·lulars, d'aquesta manera cal esperar que la proteïna SMN posseirà funcions ubiqües.

4.1.1. Biogènesi de les snRNPs

La funció més ben caracteritzada de l'SMN a través del complex SMN és el paper que juga com a xaperona en l'acoblament citoplasmàtic de les snRNPs, components principals de la maquinària encarregada de l'*splicing* dels mRNAs [54]. Les snRNPs tenen un paper important en el reconeixement i l'eliminació dels introns dels pre-mRNA al nucli de totes les cèl·lules. Cada snRNP consta d'un snRNA (*small nuclear RNA*) d'aproximadament uns 150 nucleòtids i d'una part proteica. Aquesta part proteica està formada per un nombre específic de proteïnes que son úniques per a cada snRNP i per un grup de proteïnes anomenades Sm (de l'anglès *Smith antigen*). La proteïna SMN actua com a un oligòmer i és capaç d'autoassociar-se, de manera que aquest autoacoblament és crucial per a la correcta funció de l'SMN [45]. Pellizoni

et al. [55] demostraren una disminució en la capacitat d'autoassociació SMN-SMN i una afectació severa de la unió SMN-Sm en diversos pacients amb AME. Es va suggerir que l'oligomerització d'SMN, a través de ponts disulfur [56], estimula la interacció amb Sm, actuant com a cor funcional per a la formació de les snRNPs i de l'*spliceosoma* [55]. La proteïna SMN, formant part del complex SMN, és necessària al citoplasma per al correcte acoblament de les proteïnes Sm als snRNAs per formar el complex actiu snRNP [57, 58] i el seu paper fisiològic consisteix en assegurar que aquesta unió siga eficient i acurada, impedint l'associació no específica [59]. D'aquesta manera, la capacitat d'oligomeritzar de l'SMN es veuria alterada en pacients amb AME i per tant, presentarien una deficiència en la biogènesi de les snRNPs.

4.1.2. Maduració dels pre-mRNAS

A més del paper en la formació dels snRNPs, el complex SMN també actua facilitant el transport de les snRNPs des del citoplasma fins al nucli, on s'uniran als cossos de Cajal per culminar la seua maduració [60] i així formar l'*spliceosoma* major (U2-dependent) i el menor (U12-dependent), per participar en el procés de maduració de l'mRNA o *splicing*. S'ha observat un defecte generalitzat en l'*splicing* dels pre-mRNAs en nombrosos transcripts de diversos gens en un model murí d'AME [61]. No obstant, la falta d'SMN afecta en major mesura al funcionament de l'*spliceosoma* menor [62], de manera que s'altera l'*splicing* d'un subgrup de gens que contenen l'intró U12, disminuint la seua expressió [63]. Aquests descobriments ressalten la importància de la proteïna SMN en el metabolisme de l'RNA i en la regulació del procés d'*splicing*.

4.1.3. Transcripció

L'SMN s'ha vist interaccionant amb una sèrie de components: a) l'RNA de l'helicasa A (RHA), les snRNPs i l'RNA de la polimerasa II [64], un complex macromolecular implicat en la transcripció i l'*splicing*; b) la proteïna FUSE-*binding* (FBP) [65], un regulador de la transcripció i de l'estabilitat dels mRNA; c) dos proteïnes que formen part de les snoRNPs (*small nucleolar* RNPs) implicades en la transcripció i processament de l'RNA ribosomal; i d) el co-repressor de la transcripció mSinA [66], que s'associa amb les histones deacetilases (HDAC), metiltransferases i altres factors per regular la remodelació i l'accessibilitat de la cromatina [67]. Aquestes troballes demostren un acoblament de l'SMN a components clau de la maquinària de transcripció i processament de l'mRNA suggerint una implicació de l'SMN en el procés de transcripció dels gens.

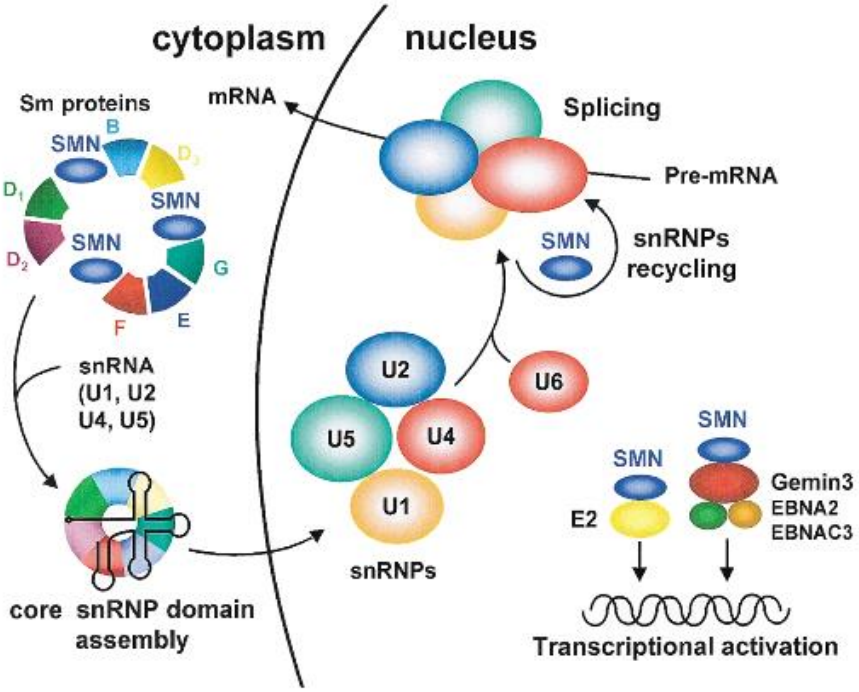


***Figura 5. Funcions de la proteïna SMN**. El complex SMN actua al citoplasma, reclutant proteïnes per al correcte acoblament de les snRNPs, així com en el transport de les snRNPs, una vegada formades, al nucli cel·lular on actuaran com a components clau de la maquinària encarregada de l'splicing dels mRNAs. Una vegada exercida la seua funció, les snRNPs es regeneren i es reactiven. A més, l'SMN juga un paper tant directe com indirecte en l'activació de la transcripció. Figura extreta de [68].*

4.1.4. Regulació de l'apoptosi

L'apoptosi, o mort cel·lular programada, és un mecanisme cel·lular específic i deliberat en el qual es produeix una fragmentació del nucli, una condensació de la cromatina i la formació de cossos apoptòtics [69, 70]. Aquest fenòmen és fonamental per al correcte desenvolupament del sistema nerviós central (SNC) ja que és essencial per a la ràpida eliminació de neurones redundants i cèl·lules nervioses que fracassen en el procés d'establiment de connexions sinàptiques apropiades [71]. L'apoptosi està regulada per un balanç de senyals antiapoptòtics i proapoptòtics. Aquests senyals es veuen afectats pels nivells baixos de proteïna SMN, de manera que hi ha una desregulació d'aquest balanç en l'AME (revisat a [72]). Estudis amb teixit fetal neuronal de pacients amb AME van demostrar que existia un període de mort programada més prolongat que la que tenia lloc a les motoneurones de teixits control [73, 74]. És més, en el SNC de models murins d'AME es van observar nivells elevats tant de gens proapoptòtics com de la pròpia apoptosi [75, 76]. Per altra banda, estudis *in vitro* amb diversos tipus cel·lulars van van demostrar que la proteïna SMN té un paper protector en presència d'estímuls apoptòtics [77]. A més, l'eliminació del gen *SMN* en cultius de cèl·lules NSC-34 va

portar a una reducció de la supervivència cel·lular i a uns nivells elevats d'apoptosi [78]. Fins al moment, el mecanisme antiapoptòtic d'acció de l'SMN més ben definit és a través de la inhibició de l'activació de la caspasa-3, un mediador clau de la mort cel·lular apoptòtica [79]. Per altra banda, existeixen una sèrie de proteïnes implicades en la regulació de la supervivència cel·lular que interaccionen amb l'SMN, entre elles Bcl-2 [80], ZPR1 [81] i p53 [82]. A més, el gen *NAIP* (de l'anglès *neuronal apoptosis inhibitory protein*), responsable de la inhibició de varies caspases, es localitza al cromosoma 5 adjacent al gen *SMN* i la seua deleció s'ha relacionat amb l'AME [83].

4.1.5. Regulació de la traducció

S'han descrit interaccions entre l'SMN i diversos reguladors del procés de traducció, com per exemple, la interacció l'SMN amb l'FMRP *(fragile X mental retardation protein)*, una proteïna neuronal d'unió a RNA que s'associa amb poliribosomes [84] i regula, bé activant [85] o bé reprimint [86, 87], la traducció. Per altra banda, l'SMN interactua amb proteïnes de la família LSm, implicades tant en el metabolisme dels mRNAs [88] com en la regulació de la traducció [89]. Més recentment s'ha reportat la capacitat de l'SMN de regular la traducció mitjançant l'associació amb la maquinària necessària per a dur a terme aquest procés, més concretament amb les mRNPs dels poliribosomes [90].

4.1.6. Resposta a l'estrès

Quan una cèl·lula s'exposa a una situació d'estrès s'inicia una resposta protectora cel·lular anomenada "resposta a l'estrès", la qual comporta l'expressió de gens que s'activen específicament davant d'aquestes situacions. En canvi, gran part dels mRNAs, rRNAs i tRNAs es recluten i es retenen en uns compartiments citosòlics anomenats grànuls d'estrès (SG, de l'anglès *stress granules*) [91]. Aquests SGs serveixen com a emmagatzematge local i transitori per als RNA, de manera que, una vegada superada aquesta situació d'estrès s'alliberen de nou [92]. S'ha trobat que l'SMN colocalitza i interactua amb diverses proteïnes d'unió a RNA que s'acumulen als grànuls d'estrès [93]. És més, s'ha proposat que els gems citoplasmàtics d'SMN que es produeixen quan la proteïna se sobreexpressa són, de fet, SGs [93]. Estudis *in vitro* més recents han descrit un retard i una reducció en la formació d'SGs en condicions d'estrès quan el nivell d'expressió de l'SMN està reduït, de manera que la falta d'SMN estaria augmentant la vulnerabilitat cel·lular front a situacions d'estrès [94]. Tot junt suggereix una contribució de l'SMN en la formació de grànuls d'estrès i en la seua funció, i que el paper de l'SMN en la supervivència cel·lular seria depenent de les condicions d'estrès a les quals les cèl·lules són sotmeses.

4.2. FUNCIONS ESPECÍFIQUES

Tot i que a l'SMN se li atribueixen funcions necessàries per a la supervivència de tots els tipus cel·lulars, el baixos nivells d'aquesta proteïna afecten en major mesura a la funció i la supervivència de les motoneurones α de la banya ventral de la medul·la espinal i de les fibres musculars esquelètiques. La raó per la qual aquestes cèl·lules són més vulnerables als nivells baixos d'SMN es desconeix. S'ha suggerit que els defectes en l'acoblament i la funció de les snRNP estarien alterant, preferentment, l'*splicing* de gens crítics per al correcte funcionament de les motoneurones [46, 95]. Per altra banda, s'ha proposat que la vulnerabilitat que presenten les motoneurones podria ser deguda a una ineficiència específica d'aquestes cèl·lules en l'*splicing* del gen *SMN2*, de manera que a les motoneurones seria major el grau d'exclusió de l'exó 7 [96]. També s'ha suggerit que existeix una major producció de ROS (molècules reactives d'oxigen) per part de les motoneurones com a conseqüència d'una major activitat metabòlica d'aquestes cèl·lules, de manera que estarien sofrint un major estrès oxidatiu que la resta de tipus cel·lulars [94].

No obstant, estudis més recents han avaluat el paper de l'SMN, independent de les snRNPs, en les motoneurones i en el múscul esquelètic, que podrien explicar la major vulnerabilitat d'aquests tipus cel·lulars a la falta d'SMN.

4.2.1. Creixement de les neurites

S'ha descrit una isoforma de la proteïna SMN, provinent d'un procés d'*splicing* alternatiu, que s'expressa selectivament a les motoneurones i es localitza principalment als axons, de manera que s'ha anomenat SMN axonal (a-SMN) [97]. Es va demostrar un efecte neuritogènic d'aquesta proteïna en cèl·lules NSC34, no obstant, la funció específica en l'AME no s'ha descrit fins al moment. A més, en cultius neuronals es va observar una acumulació a nivell subcel·lular de la proteïna SMN en els cons de creixement i els fil·lopodis. [98].

Per altra banda, l'extrem C-terminal de l'exó 7 de la proteïna SMN conté una seqüència motiu responsable de la localització citoplasmàtica de la proteïna [99]. Una sobrexpressió de la proteïna mutant amb deleció de l'exó 7, va provocar l'acumulació d'SMN al nucli i una reducció del creixement de les neurites. A més, la creació d'un model SMN knock-down *in vitro* va disminuir el creixement de les neurites alterant el ratio G/F actina, indicant una implicació de l'SMN en el paper dinàmic de l'actina [100], mentre que la sobreexpressió selectiva de la seqüència motiu en aquests cultius promovia un creixement de les neurites similar al produït per la FL-SMN.

Tenint en compte totes aquestes troballes, l'SMN estaria implicat en el correcte funcionament dels cons de creixement i en l'elongament de les neurites.

4.2.2. Regulació de la dinàmica del citoesquelet

Els canvis en la dinàmica del citoesquelet, com per exemple l'acoblament i desacoblament de certes proteïnes, incloent l'actina i la tubulina, són els responsables de l'axonogènesi de les motoneurones, així com l'axonogènesi d'altres neurones. La profilin IIa i la plastin 3, dos proteïnes relacionades amb la dinàmica de l'actina, s'han identificat com proteïnes d'unió a l'SMN. [101, 102]. A més, s'ha descrit que l'stathim (estatmina), una proteïna reguladora de la dinàmica dels microtúbuls, està incrementada tant en cultius de cèl·lules deficients en SMN com en models murins d'SMA [103]. Per tant, és lògic assumir una associació entre la dinàmica del citoesquelet i la proteïna SMN.

4.2.3. Transport axonal d'mRNAs

La proteïna SMN s'ha trobat localitzada en estructures riques en RNA, anomenades grànuls neuronals d'RNA que són transportats de manera activa als cons de creixement durant els processos neuronals; s'ha postulat que l'SMN juga un paper important en l'acoblament d'aquestes estructures [104]. Per altra banda, l'SMN interactua amb proteïnes d'unió a RNA, com la HuD [105], formant un complex que regula la localització de poli-A mRNAs en els axons de les motoneurones [106]. És mes, en cultius de motoneurones deficients en SMN, la disminució dels nivells d'mRNA i proteïna β-actina en els axons distals i els cons de creixement s'ha correlacionat amb una reducció de l'elongació axonal i una menor mida dels cons de creixement [107].

Tot junt, i tenint en compte l'ampli patró d'unió de la proteïna SMN tant a RNAs com a proteïnes d'unió a mRNAs, estaria indicant una funció específica de l'SMN en els axons de les motoneurones, suggerint una implicació de la proteïna en la dinàmica del citoesquelet i en el transport i estabilitat dels mRNA. (revisat a [108]).

4.2.4. Formació i manteniment de les unions neuromusculars

Les unions neuromusculars (NMJ, de l'anglès *neuromuscular junction*) són les sinapsis que s'estableixen entre els terminals axonals provinents de les motoneurones i les fibres musculars. L'axó, que el soma de la motoneurona projecta a través de l'arrel nerviosa ventral fins al múscul, està envoltat per una baina de mielina que facilita la transducció de senyals i conté proteïnes estructurals, com el neurofilament que manté la integritat axonal, i microtúbuls que faciliten tant el transport retrògrad com anterògrad del soma a les sinapsis perifèriques. Les unions neuromusculars madures estan formades pel terminal presinàptic (el

terminal de l'axó de la motoneurona), el compartiment postsinàptic (les fibres del múscul esquelètic) i les cèl·lules de Schwann terminals. Un axó, provinent d'una única motoneurona, crearà un entramat ramificat intramuscular de manera que innervarà entre 10 i 2.000 fibres musculars, creant així la denominada "unitat motora" [109, 110] (**Figura 6**).

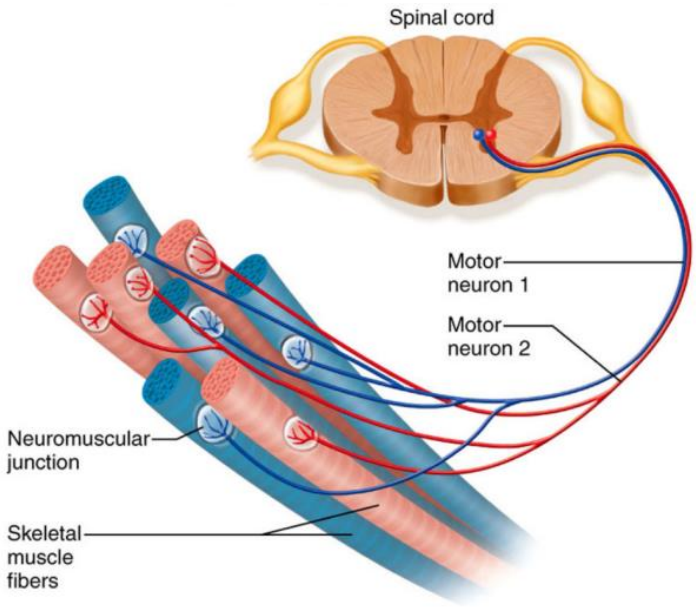


Figura 6. Unitat motora. *Cadascuna de les motoneurones projecta el seu axó cap al múscul, de manera que es ramifica i innerva entre 10 i 2000 fibres musculars, creant la denominada "unitat motora". Figura extreta de [111].*

Les unions neuromusculars experimenten una sèrie de canvis tant en l'estructura com en la funció durant les primeres setmanes postnatals [112, 113], resumit a la **Figura 7**. A nivell presinàptic, l'axó forma una estructura especialitzada que presenta un alt nombre de mitocòndries i múltiples vesícules sinàptiques que contenen el neurotransmissor acetilcolina (ACh). L'ACh és un neurotransmissor excitatori que és alliberat per les motoneurones quan s'assoleix un potencial d'acció, i s'uneix als receptors d'acetilcolina (AChRs) presents en la membrana post-sinàptica de la fibra muscular, formant la placa motora (**Figura 8**). Aquesta unió produeix l'obertura dels canals iònics seguida per l'entrada d'ions de sodi en la fibra muscular, aquesta despolarització de la membrana activarà els canals de calci provocant la contracció muscular.

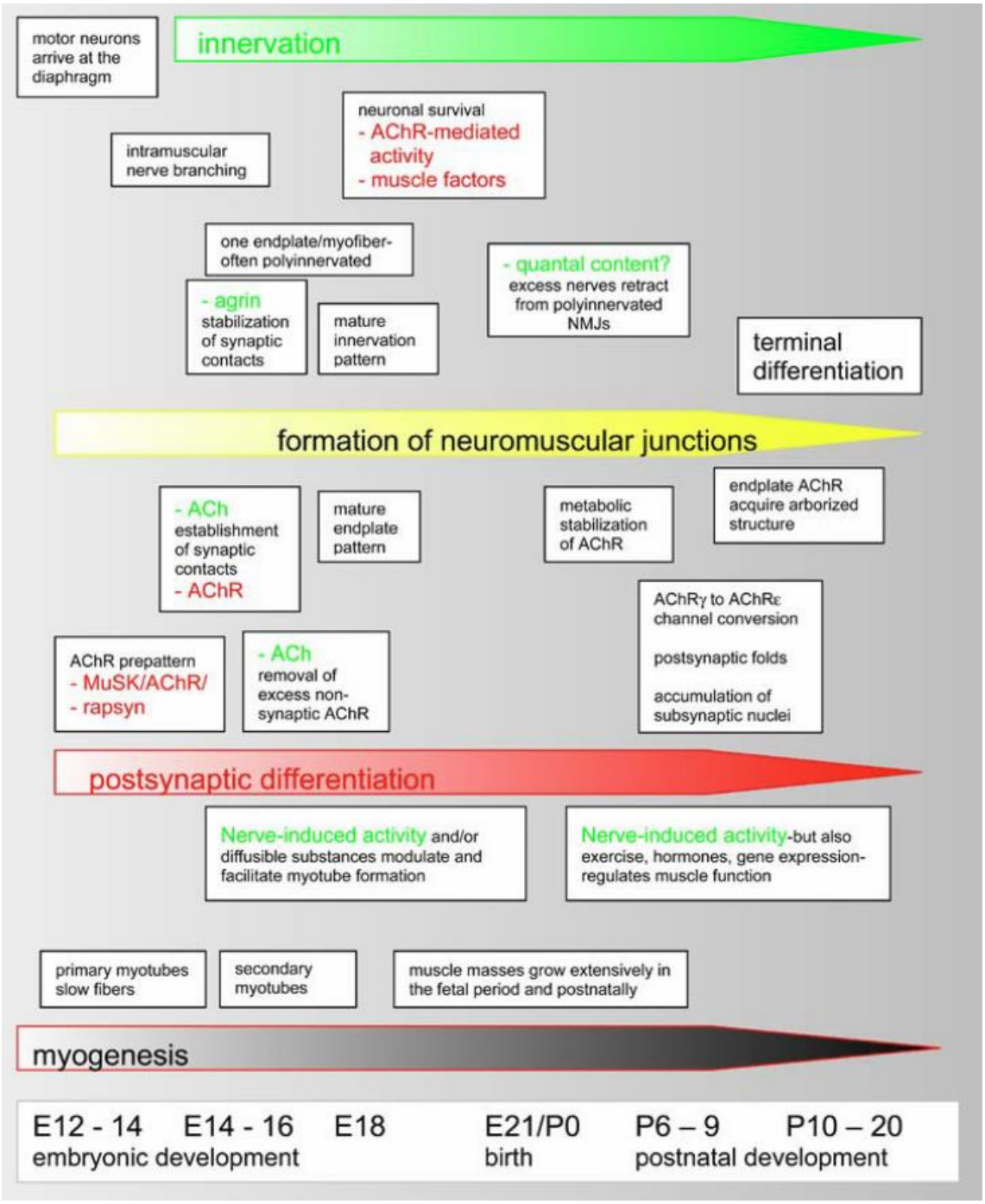


Figura 7. Representació esquemàtica dels esdeveniments seqüencials que donen lloc a la formació de les unions neuromusculars en el múscul del diafragma del ratolí*. Els canvis característics de la innervació es presenten baix de la fletxa verda (innervation). Els senyals neuronals que afecten la sinaptogènesi estan en verd. Els canvis postsinàptics es presenten baix de la fletxa roja (postynaptic differentiation). La formació de les NMJs (fletxa groga) depèn de les interaccions recíproques entre el nervi i el múscul. Durant la miogènesi apareixen miotubs primaris i secundaris tal i com s'indica sobre la fletxa gris (myogenesis). Els dies en que té lloc el desenvolupament s'indiquen a l'esquema i poden ser correlacionats amb els canvis seqüencials induïts per senyals d'origen tant neuronal com muscular. Figura extreta de [113].*

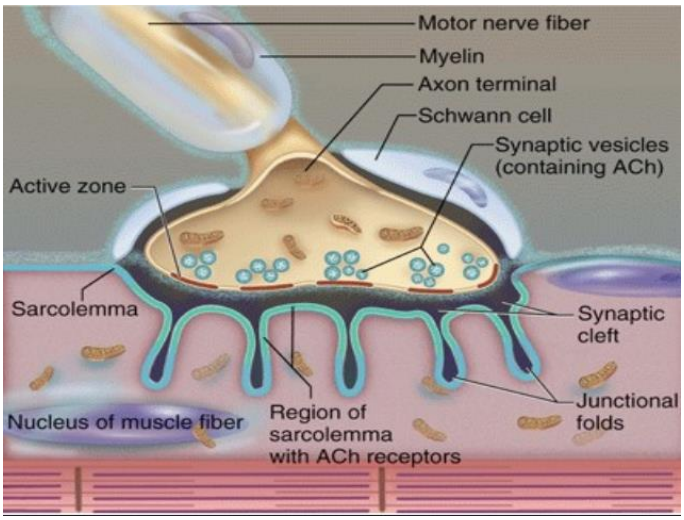


Figura 8. Estructura de les unions neuromusculars*. El terminal axonal de la motoneurona constitueix el terminal presinàptic, on es concentren mitocòndries que subministren l'ATP necessari per a la síntesis de l'acetilcolina (ACh), neurotransmissor que s'emmagatzema en vesícules sinàptiques. Les cèl·lules de Schwann terminals envolten aquesta estructura. La membrana postsinàptica del múscul conté receptors d'ACh i forma plecs a mesura que madura. Figura extreta de [111].*

A nivell postsinàptic, la maduració de les plaques motores es posa de manifest per un increment en la complexitat estructural, resultant en una major àrea ocupada pels AChRs [114]. Així, les plaques motores passen de tenir una estructura més senzilla, anomenada "*plaque*", a una conformació més complexa, en la qual la membrana postsinàptica forma una sèrie d'invaginacions i plegaments coneguts com "*folds*", que s'anomena "*pretzel*" o "*2º Structure*" (**Figura 9**). El moment en que comença el procés maduratiu postsinàptic varia entre espècies, tenint lloc en les dos primeres setmanes postnatals en ratolins, i donant-se per completada en humans, generalment, a mitat del procés de gestació [112].

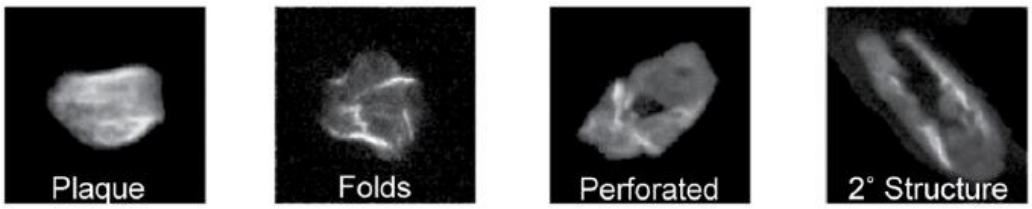


Figura 9. Diferents conformacions de les plaques motores segons el grau de maduresa. *Figura extreta de [115].*

En el cas dels ratolins, les plaques motores estan innervades per múltiples axons al moment del naixement, i durant les dos primeres setmanes postnatals, mitjançant el procés denominat

"eliminació de sinapsis", es va perdent aquesta poliinervació fins que cada placa motora queda innervada per un sol axó [116].

Hi ha estudis que postulen la necessitat crítica de nivells adequats de proteïna SMN durant el desenvolupament per al correcte establiment de les sinapsis neuromusculars, així com per a la seua maduració i manteniment [117].

En l'AME, com a conseqüència d'un dèficit de proteïna SMN, s'han descrit anormalitats en les unions neuromusculars a nivell presinàptic i postsinàptic, tant en humans [11, 118] com en models murins d'AME [119-122]. L'anomalia més característica d'aquesta malaltia s'ha considerat la pèrdua presinàptica del nervi terminal amb la consegüent dennervació de la fibra muscular. A més, s'han identificat defectes presinàptics tant morfològics, com és l'acumulació de neurofilament en els axons distals i els terminals motors, com funcionals, caracteritzats per una disminució en la densitat de vesícules sinàptiques [123]. És mes, s'ha descrit una regulació a la baixa d'una selecció de components moleculars del terminal presinàptic, tals com Rab3A i CGRP (*calcitonin gene related peptide*) [122]. Per altra banda, s'han reportat defectes a nivell post-sinàptic, tals com la reducció en la mida de l'àrea ocupada pels AChRs així com el retard en el procés de maduració de les plaques motores [121, 124, 125]. S'ha sostingut que aquestes malformacions en les unions neuromusculars condueixen a un dèficit funcional caracteritzat per errors intermitents en la neurotransmissió [121].

Diversos estudis amb models murins d'AME i pacients han evidenciat anormalitats morfològiques i funcionals a les unions neuromusculars en estadis previs a la degeneració axonal i la mort neuronal [117, 120, 122, 123, 125]. A més, s'han mostrat evidències que suporten la localització presinàptica de la proteïna SMN i la interacció amb la ribonucleoproteïna nuclear heterogènia R en els axons terminals [126]. Aquestes troballes estarien demostrant que l'SMN presenta un paper important en l'establiment de les sinapsis neuromusculars, així com en la maduració i el manteniment de les mateixes, que podria ser independent al procés de mort neuronal.

4.2.5. Desenvolupament del múscul esquelètic

Tot i que l'AME s'ha considerat una malaltia neuromuscular, amb les motoneurones com a principals dianes i provocant, com a conseqüència, la dennervació del múscul esquelètic amb la subsegüent atròfia [127], una sèrie de troballes suggereixen un procés miopàtic independent a l'afectació neuronal. Diversos estudis s'han centrat en la cerca de funcions específiques de l'SMN al múscul.

Walker *et al.* [128] van descriure una participació de la proteïna SMN en l'organització estructural de la banda Z, la qual es troba unida, mitjançant el complex SMN, a l'α-actina de les fibres musculars. Paral·lelament, s'ha identificat un disminució de la mida de les fibres musculars tant d'animals malalts [122, 129], com de pacients [130, 131], així com un increment en l'expressió d'isoformes MyHC (*myosin heavy chain*) immadures i una disminució d'isoformes MyHC ràpides [123, 129]. A més, diversos estudis proteòmics amb músculs de diferents models murins d'AME pre-simptomàtics han revelat una sobreexpressió de proteïnes implicades en la mort cel·lular [132] i proteïnes amb isoformes més immadures [133] . És més, s'ha identificat dany en el múscul esquelètic, a nivell genètic, en etapes prèvies a l'afectació neuronal [134].

Estudis més recents han descrit una alteració en l'expressió de gens miogènics deguda a la deficiència de proteïna SMN [135]. Tant en models animals amb dèficit d'SMN [136-138] com en pacients [125, 139], s'ha observat una miogènesi defectuosa, detectant-se anomalies tant en la fusió com en la maduració i la proliferació dels mioblasts, així com defectes en les cèl·lules satèl·lit [140, 141].

En el seu conjunt, aquestes troballes estarien demostrant que l'SMN presenta una funció crucial i específica en el desenvolupament i la maduració de les fibres del múscul esquelètic i per tant a l'AME hi hauria una afectació intrínseca del múscul (revisat a [142]) que podria ser independent de la patologia pròpia del terminal presinàptic i la mort neuronal.

5. MODELS MURINS D'ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

El descobriment del gen SMN i l'elevada conservació del mateix al llarg de l'evolució han permès l'estudi de la malaltia mitjançant el desenvolupament i l'anàlisi de diversos models animals que presenten molts dels símptomes patològics i electrofisiològics vists en pacients amb AME. Entre ells es troben organismes invertebrats, com *Caenorhabditis elegants* [143] i *Drosophila melanogaster* [136, 144, 145], a més d'organismes model vertebrats, que inclouen: *Dario rerio* [146, 147], *Xenopus laevis/tropicalis* [148, 149] i *Mus musculus* (revisat a [150]).

L'estudi i la caracterització de models murins són de gran utilitat per entendre la funció biològica del gen SMN en el sistema nerviós i la patogènesi de la malaltia, ja que els ratolins són, d'entre l'ampli rang d'animals models d'AME més extensament utilitzats, aquells que presenten unes característiques neuromusculars més semblants als humans. A més, es presenten com una potent eina preclínica per testar possibles substàncies terapèutiques.

S'han dissenyat diverses estratègies per a desenvolupar models que recapitulen les característiques patològiques de pacients amb AME sent el més similars possible al genotip humà causant de la malaltia. Tal i com s'ha comentat anteriorment (apartat 3.1, Pag. 3), els ratolins posseeixen un únic gen *Smn* que produeix transcripts complets, equivalent a l'*SMN1* humà, i no presenten cap còpia comparable al gen *SMN2* humà [38, 151]. Com a conseqüència, la deleció homozigota del gen murí *Smn* resulta embrionàriament letal, causant una mort cel·lular massiva abans de la implantació [35]. Dos grups van descriure un rescat de la letalitat embrionària expressant el gen humà *SMN2* en animals *knock-out* per al *Smn* [152, 153]. A més, van demostrar com el nombre de còpies del transgen modificava la severitat de la malaltia. Així, els ratolins que posseeixen una o dos còpies del gen *SMN2* són indistingibles dels controls al néixer però moren abans del dia postnatal 7 (P7) amb una pèrdua del 40% de les motoneurones. Aquest model ***(Smn$^{-/-}$; SMN2$^{+/+}$)*** és considerat una representació de l'AME més **sever o AME de tipus I**. En canvi, els animals amb més de quatre còpies del gen *SMN2* presenten un rescat complet i una esperança de vida normal, indicant que un augment de l'expressió d'FL-SMN provinent de l'*SMN2* estaria modificant positivament la patologia de l'AME.

Posteriorment, basant-se en aquesta teoria, es va introduir sobre aquest fons genètic un segon transgen que contenia el cDNA de l'*SMNΔ7* humà, amb l'objectiu de crear un model menys sever [154]. Aquest model, anomenat **"SMNΔ7" (*Smn$^{-/-}$; SMN2$^{+/+}$; SMNΔ7$^{+/+}$)***, allarga la vida mitjana de l'animal fins a 13 dies postnatals i exhibeix uns símptomes i una neuropatologia similar als pacients afectats per l'**AME de tipus II**. La creació d'aquest model va suposar una prova *in vivo* de que, malgrat ser degradada ràpidament, la proteïna SMNΔ7 manté la capacitat d'associar-se amb la proteïna SMN i estabilitzar el complex SMN.

En aquests models, les majors consideracions fenotípiques són l'afectació de les motoneurones i la reducció de la funcionalitat motora (**Figura 10**). La pèrdua de les motoneurones s'ha associat a estadis finals de la malaltia [122, 153], de manera que, nombroses investigacions s'han centrat en la patologia de les unions neuromusculars. S'han descrit defectes en les mateixes, previs a la mort neuronal, tals com l'acumulació de neurofilament (NF) en els terminals presinàptics, la falta de maduració i d'organització dels AChRs en l'estructura postsinàptica, la reducció de l'alliberació de vesícules sinàptiques, la regulació a la baixa de proteïnes presinàptiques i la presència de ramificacions axonals aïllades de les unions neuromusculars [119-123, 155, 156] .

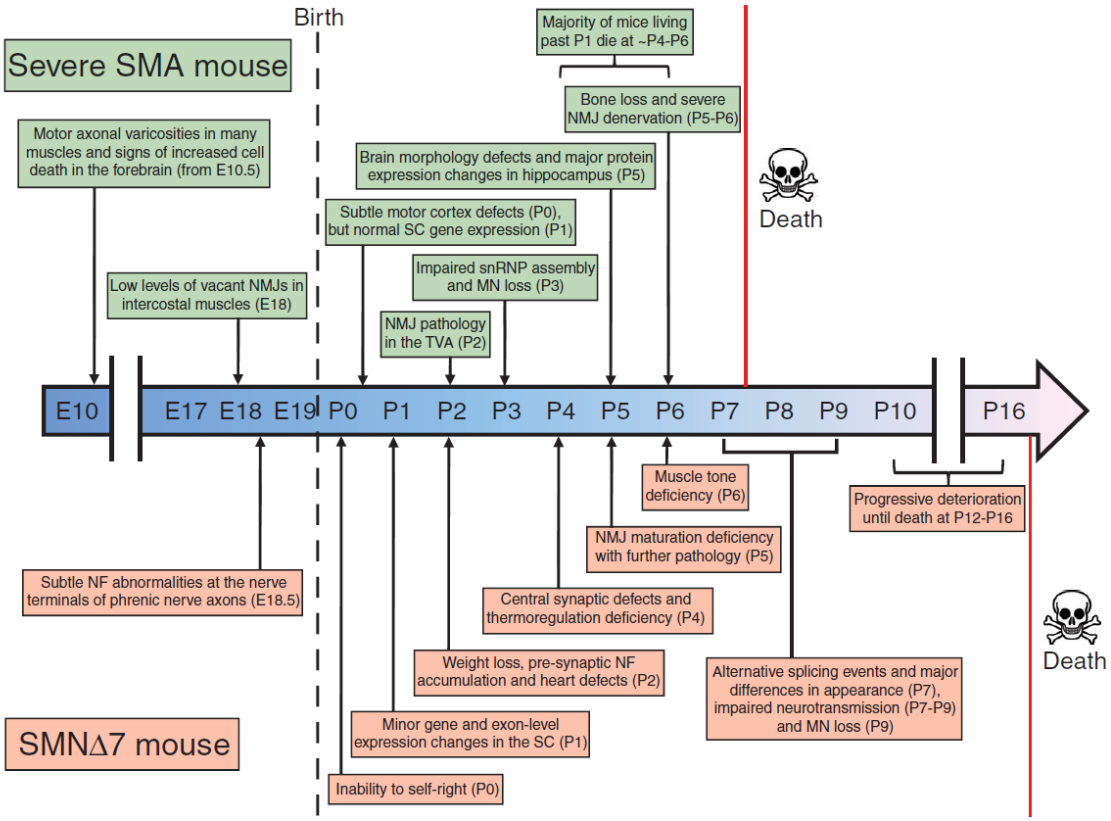


Figura 10. Representació temporal dels principals esdeveniments cel·lulars i simptomàtics durant el desenvolupament embrionari i postnatal del model murí sever o tipus I (Smn$^{-/-}$; SMN2$^{+/+}$) i de l'SMNΔ7 (Smn$^{-/-}$; SMN2$^{+/+}$; SMNΔ7$^{+/+}$). *Figura extreta de [157].*

Un enfoc diferent per reduir els nivells de proteïna SMN en ratolins va ser el portat a terme per Bowerman *et al*. [158], els qui basant-se en una mutació prèviament descrita [159, 160] van crear un model murí d'AME anomenat ***Smn$^{2B/-}$***. La mutació 2B, generada per una substitució de 3 nucleòtids en l'exó 7, altera l'*splicing* del gen *Smn* (**Figura 11**), d'una manera similar a l'alteració produïda pel canvi d'un únic nucleòtid al gen *SMN2*, amb la diferència que s'expressa un nivell més elevat de proteïna FL-SMN quan es compara amb la proteïna FL-SMN provinent de la traducció del gen *SMN2*. Per tant, el fet de comptar amb més proteïna funcional té com a resultat la creació d'un model murí d'AME més lleu, amb una aparició simptomàtica més tardana i que representaria, d'una manera més real que els models més severs, la patologia dels pacients amb **AME de tipus II-III**.

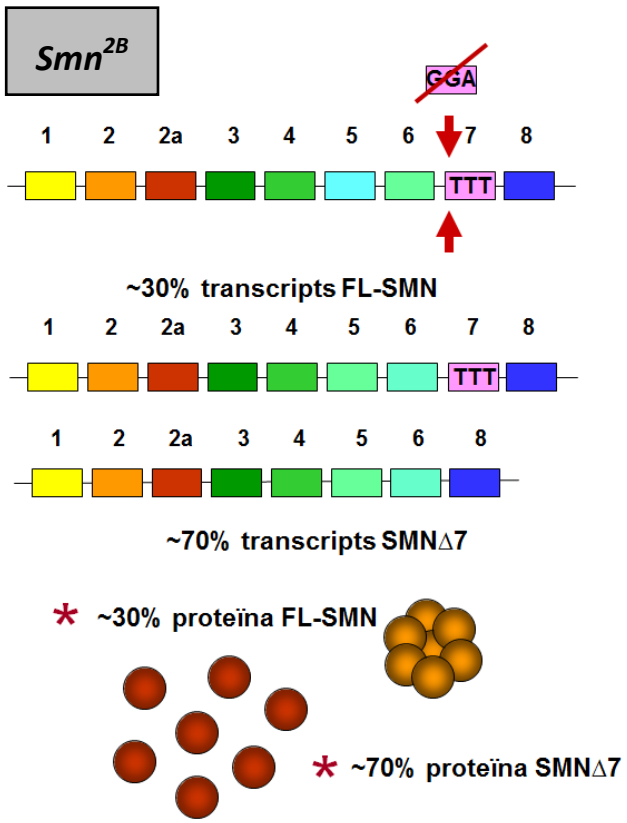


***Figura 11. Mutació SMN2B i conseqüències sobre la traducció**. La substitució de 3 nucleòtids a l'exó 7 provoca una reducció de la producció de la proteïna FL-SMN, de manera que aproximadament el 70% del resultat de la traducció és una proteïna SMNΔ7*

Aquesta característica, junt al fet de presentar una progressió de la malaltia més lenta i més duradora, fa d'aquest un model interessant per a l'estudi de la patologia de l'AME durant un curs temporal més extens. Per altra banda, es presenta com una alternativa per a la identificació i el desenvolupament d'estratègies terapèutiques independents del gen *SMN2*. A més, aquest model permet realitzar una aproximació més real de l'efectivitat que les possibles teràpies podrien tenir en pacients amb una afectació més lleu.

6. L'AME COM A MALALTIA MULTISISTÈMICA

6.1. Afectació del sistema neuromuscular

Les característiques clíniques predominants en l'AME són la debilitat i l'atròfia muscular atribuïdes a la disfunció i la pèrdua de les motoneurones. No obstant, l'escassa disponibilitat de material de pacients amb AME limita un anàlisi profund a nivell cel·lular. La majoria dels estudis realitzats fins al moment s'han portat a terme en teixits provinents d'autòpsies de pacients, de manera que els resultats corresponen únicament a l'estadi terminal de la malaltia [161]. Aquest fet ha impedit un estudi fisiopatològic en etapes primerenques, no havent, actualment, un consens sobre quin tipus cel·lular és el primer afectat en l'AME. Dos hipòtesis

es barallen per contestar aquesta qüestió. La primera assenyala la motoneurona com el primer tipus cel·lular afectat pel dèficit d'SMN. Mentre que la segona, basant-se en el fet que no necessàriament han de coincidir les estructures cel·lulars que primer degeneren amb les estructures cel·lulars on tenen lloc els primers esdeveniments moleculars [162], defensa una afectació inicial del múscul i de les sinapsis, incloent els axons neuronals i les plaques motores, explicant la degeneració del soma de la motoneurona com a una conseqüència de la desconnexió (axonopatia distal o "*dying-back*").

Amb l'objectiu d'esbrinar el teixit on s'inicia la patogènesis, diversos grups han estudiat els efectes directes en determinats teixits de la disminució de l'SMN, així com del restabliment de la proteïna, utilitzant models murins on es modulava el nivell d'SMN en teixits concrets.

Per una banda, mitjançant un model *knock-out* específic de teixit i comptant amb ratolins amb un fons genètic de dos còpies d'*SMN2*, Park *et al.* [163] van eliminar l'SMN únicament a les cèl·lules progenitores de les motoneurones, produint-se degeneració neuronal i debilitat muscular. Malgrat demostrar un requeriment d'SMN per part de les motoneurones, el fenotip va resultar menys sever que el mostrat pels ratolins SMNΔ7, amb una supervivència superior als 12 mesos d'edat en el 70% dels animals estudiats. Per altra banda, el restabliment selectiu d'SMN a les motoneurones d'animals SMNΔ7 va prevenir la disfunció sinàptica de les unions neuromusculars, però no va evitar la mort neuronal, i l'efecte general sobre el fenotip neuromuscular i la supervivència va ser relativament moderat [164]. És més, el restabliment d'SMN en motoneurones d'un model d'AME amb letalitat embrionària, malgrat evitar la pèrdua de sinapsis sensoriomotores, va augmentar únicament la supervivència a 5 dies postnatals [115].

Per altra banda, per determinar si els canvis en el múscul són una conseqüència de la degeneració de les motoneurones, o si en canvi, contribueixen d'una manera directa a la patogènesi de l'AME, Cifuentes *et al.* [165] van crear un model murí on s'eliminava selectivament l'SMN al múscul esquelètic. El dèficit d'SMN va conduir a un fenotip sever caracteritzat per l'aparició de paràlisi muscular a les tres setmanes de vida, amb una vida mitjana de 33 dies. A més, es van observar fibres necròtiques envoltades per cèl·lules mononuclears infiltrades, desorganització del sarcolemma, disminució de la distrofina i una baixa proporció de nuclis centrals, tot junt indicant una disminució de la capacitat de regeneració muscular i una afectació intrínseca del múscul com a conseqüència del dèficit d'SMN. Cal remarcar, però, que aquest model presentava una depleció completa d'SMN al múscul, escenari que no es dona a l'AME, ja que, malgrat ser baix, és manté un nivell d'SMN.

Així, Iyer *et al.* [166] defensen que l'eliminació d'SMN únicament al múscul, utilitzant un animal amb un fons genètic de dos copies d'*SMN2* i SMNΔ7, no té cap conseqüència fenotípica. A més, el restabliment dels nivells normals d'SMN al múscul, utilitzant el model murí SMNΔ7 [166], i el model sever [167] no va ocasionar cap canvi fenotípic respecte als animals malalts. Aquests dos estudis complementaris, estarien indicant que el múscul manté una funció normal malgrat els nivells reduïts d'SMN, i que qualsevol alteració seria conseqüència d'un dany previ en altres teixits. Per altra banda, el restabliment d'SMN en progenitors de les fibres musculars va conduir a un rescat de la disminució de la mida de les fibres així com una millora en el fenotip motor i la supervivència, però no va tenir cap efecte sobre les sinapsis centrals ni en els defectes a nivell de les unions neuromusculars [164]. Tenint en compte tots els experiments realitzats, es podria concloure que la implicació directa del múscul en la patogènesi de l'AME continua sent un debat polèmic.

Tot junt, estaria suggerint que, malgrat haver-se considerat com una malaltia purament neuromuscular que afecta les motoneurones i el múscul esquelètic, la depleció d'SMN en altres cèl·lules i teixits més enllà del sistema neuromuscular, podria estar contribuint a la patogènesi de l'AME, plantejant-se una afectació més generalitzada.

6.2. Afectació d'altres poblacions neuronals

S'ha postulat que, tant en humans [168, 169] com en ratolins, la falta d'SMN afecta altres poblacions cel·lulars al cervell. Per exemple, en un model d'AME severa s'ha descrit una pèrdua de neurones corticoespinals [170] així com problemes en la proliferació cel·lular i la neurogènesi, donant lloc a alteracions en el desenvolupament de l'hipocamp [171]. Per altra banda, s'ha reportat una interrupció de les vies sensorials tant en pacients amb AME [172] com en diversos models murins [115, 164, 173-175]. És més, s'ha reportat que en el model SMNΔ7 la pèrdua del nombre i de la funció de les sinapsis aferents (i per tant la connexió funcional entre neurones sensorials i motoneurones de la medul·la espinal) té lloc en etapes prèvies a la pèrdua de les motoneurones, donant-se inclús en etapes prenatals [175, 176]. Tots aquests estudis suggereixen que aquest esdeveniment en etapes inicials estaria contribuint a la patogènesis i als problemes funcionals en l'AME. No obstant, altres estudis suggereixen que els defectes en les connexions neuronals tenen lloc com a conseqüència de la patologia intrínseca de les motoneurones [115, 164], defensant que la pèrdua de sinapsis sensorials es pot prevenir amb l'increment selectiu dels nivells d'SMN a les motoneurones.

Per altra banda, estudis amb un model de *Drosophila melanogaster knock-out* per a SMN proposen que la falta de proteïna SMN afecta en primera instància a una subpoblació de

neurones sensorials colinèrgiques i interneurones espinals, i que, com a conseqüència de l'alteració de les funcions d'aquestes, té lloc la disfunció de les motoneurones [177].

Malgrat no existir estudis concloents per postular quin és el mecanisme definitiu d'afectació de les diferents poblacions neuronals i de les connexions entre elles, hi ha clares evidències que les motoneurones no són la única població neuronal afectada pels nivells insuficients d'SMN (**Figura 12**).

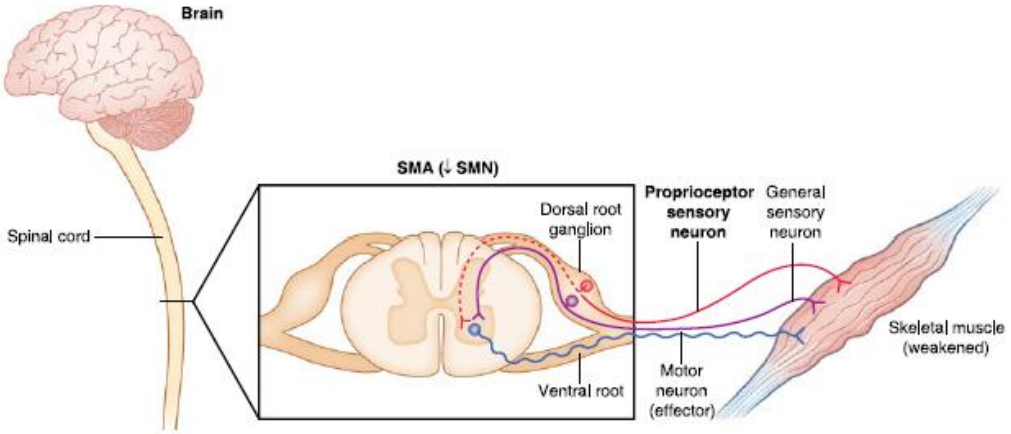


***Figura 12. Circuit neuromuscular en l'atròfia muscular espinal**. Figura extreta de [178].*

6.3. Afectació de la glia

Els astròcits són les cèl·lules més abundants del sistema nerviós central i executen importants funcions en condicions normals, tals com el manteniment de la barrera hematoencefàlica, la secreció de factors de creixement, i la regulació del metabolisme neuronal i la homeòstasi, sent de vital importància la seua implicació en el tamponament dels ions extracel·lulars i dels neurotransmissors [179]. Estudis més recents atribueixen a la glia, tant a l'astroglia com a la micròglia, un paper clau en el control de la formació de les sinapsis neuronals així com en la funció, la plasticitat i l'eliminació de les mateixes (revisat a [180]).

La glia s'ha vist alterada en etapes finals de diverses patologies del sistema nerviós [181], incloent l'AME, on s'ha descrit una marcada activació astroglial i microglial [176]. Estudis realitzats en el model murí SMNΔ7 i en astròcits provinents de cèl·lules pluripotents induïdes de pacients han descrit alteracions morfològiques d'aquestes cèl·lules, a més d'un increment dels nivells basals de calci i una disminució de la resposta als estímuls d'ATP, evidenciant una alteració de la funció dels astròcits en l'AME [182]. Per altra banda, el restabliment dels nivells d'SMN en la glia, a més de en les motoneurones, provoca un major impacte en la supervivència d'animals malalts, en comparació al restabliment exclusiu en motoneurones

[183]. És més, el restabliment de l'SMN únicament en astròcits, utilitzant diversos models murins (SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$), ha revelat un increment de la supervivència i una atenuació de l'astrogliosi, a més d'una disminució parcial dels defectes a les unions neuromusculars i de la pèrdua de sinapsis propioceptives [184].

Malgrat que la marcada astrogliosi i microglisi en l'AME s'ha documentat en etapes finals, la disfunció i la pèrdua de sinapsis pot ocórrer en etapes anteriors, el que significaria, tenint en compte totes les troballes comentades així com la implicació de la glia en el correcte funcionament de les sinapsis, que aquesta població del sistema nerviós central podria estar directament implicada en la patologia de l'AME.

6.4. Afectació de cèl·lules i teixits més enllà del sistema nerviós

Cada dia són més els estudis que reporten una patologia de cèl·lules i teixits més enllà del sistema neuromuscular. Els defectes i les arítmies cardíaques són un dels fenotips perifèrics més comuns tant en pacients [17, 18] com en models murins d'AME [115, 185-187]. A més, s'han descrit defectes cardíacs estructurals que precedeixen a la disfunció de les motoneurones [188] i que poden existir de manera independent a la patologia i desconnexió neuromuscular [115]. És interessant remarcar que, en un model d'AME severa, tractaments que es basen en l'increment dels nivells d'SMN ocasionen una disminució dels defectes cardíacs [186, 189]. Totes aquestes observacions estarien suggerint un rol crucial de l'SMN en el desenvolupament i la funció cardíaca [190]. A més, s'ha reportat afectació dels pàncrees [191, 192], del fetge [193, 194], dels pulmons [187, 195] i dels intestins [187], així com defectes vasculars [196, 197], necrosis [152, 198-200] i anomalies en el contingut i la densitat de minerals als ossos [201, 202] (**Figura 13**). És més, els nivells insuficients d'SMN també s'han associat a alteracions en el sistema immunitari de ratolins amb AME severa [122], on es va observar una atròfia tant de la melsa com del timus, i una apoptosi massiva en l'escorça d'aquest últim.

Malgrat no existir un consens definitiu, l'afectació de teixits i òrgans no neuronals s'ha descrit en paral·lel a la patologia del sistema nerviós i del múscul, el que estaria suggerint que el dèficit d'SMN provocaria un desordre multisistèmic i no una malaltia purament del sistema neuromuscular.

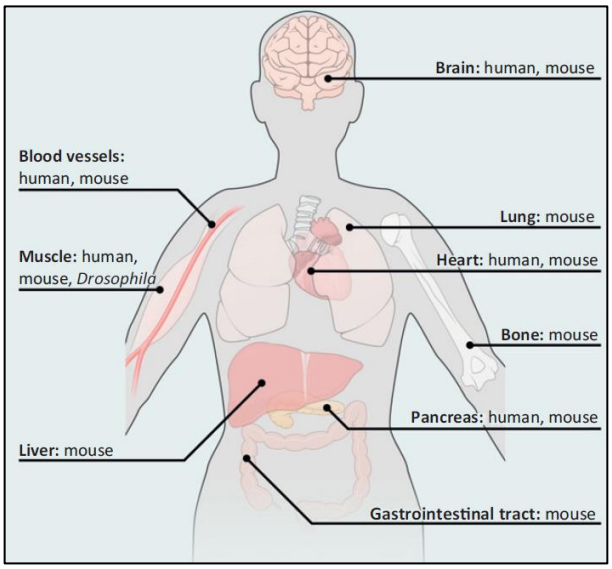


Figura 13. Esquema de la patologia sistemàtica en l'atròfia muscular espinal. *Diversos òrgans i teixits s'han vist afectats en l'AME. Els organismes on s'ha observat la patologia queden indicats. Figura extreta de [203].*

7. TERÀPIES

Actualment no hi ha cap teràpia efectiva capaç de modificar o retardar la progressió de l'AME, de manera que els tractaments existents van dirigits a controlar les complicacions secundàries derivades de la pròpia malaltia, tractant-se únicament de cures pal·liatives. No obstant, existeixen assajos clínics esperançadors (**Figura 14**). Com que la severitat de la malaltia es correlaciona amb els nivells de proteïna SMN, aquesta s'ha considerat una diana terapèutica de gran importància. Ara bé, en els últims anys s'han identificat noves dianes i desenvolupat nombroses estratègies independents de l'SMN que estan demostrant tenir un paper important en el tractament de la malaltia (**Figura 15**).

7.1. Teràpies dependents d'SMN

S'han portat a terme diverses teràpies en ratolins afectats per l'AME amb l'objectiu d'incrementar els nivells de proteïna SMN, donant algunes d'elles efectes beneficiosos prometedors (revisat a [204]). L'objectiu d'augmentar els nivells de proteïna SMN s'ha abordat mitjançant diferents estratègies (revisat a [205]).

Tal i com s'ha comentat anteriorment (apartat 3.2, Pag. 4), la quantitat de proteïna FL-SMN es correlaciona inversament amb la severitat de la malaltia [47]. Ja que el gen *SMN2* manté un xicotet percentatge de producció d'FL-SMN, és d'esperar que una estratègia àmpliament estudiada siga la d'incrementar la quantitat de proteïna FL-SMN endògena produïda per

aquest. Per una banda, s'han emprat compostos farmacològics amb l'objectiu d'activar el promotor del gen *SMN2*. Aquests compostos poden dividir-se en inhibidors de la histona deacetilasa, tals com hidroxiurea, fenilbutarat, tricostatina A, SAHA i àcid valproic [199, 206-217] i altres agents, que inclouen: l'agonista β-adrenèrgic salbutamol [218, 219], derivats de la C5-quinazolina [220, 221], i antibiòtics tals com tetraciclines [222] o l'antibiòtic β-lactàmic ceftriaxona [223], inhibidors de la GSK3 [224, 225], prolactina [226] i agents antiinflamatoris no esteroides tals com l'indoprogen i el celecoxib [227, 228]. Altres teràpies es basen en l'ús d'oligonucleòtids antisentit els quals actuen corregint l'*splicing* alternatiu del gen *SMN2* i fomenten la inclusió de l'exó 7 [194, 229-242].

Altre enfoc per augmentar els nivells de proteïna SMN és el de la introducció exògena d'*SMN1* bé per correcció de l'*SMN1* anòmal mitjançant teràpia gènica emprant vectors virals [198, 200, 243-249] (revisat a [250]), o bé per teràpia cel·lular amb mètodes de transplantament de cèl·lules mare [251-253].

Una altra opció d'incrementar els nivells de proteïna SMN funcional és la d'estabilitzar la proteïna SMNΔ7, de manera que queda disminuïda la susceptibilitat a ser degradada. S'han testat diversos aminoglicòsids amb aquest propòsit [185, 254, 255].

7.2. Teràpies independents d'SMN

Mentre que la restauració dels nivells d'SMN seria la clau per impedir l'aparició de la malaltia, hi ha evidències que indiquen que aquest tipus de teràpia sols seria efectiu si la intervenció es realitza en etapes primerenques de la malaltia [195, 198, 256]. Més enllà d'aquest punt, seria de vital importància dirigir les teràpies a les vies moleculars i les activitats cel·lulars que es veuen afectades pel dèficit d'SMN i que són rellevants en la malaltia. En els últims anys, s'han estudiat diverses dianes i estratègies independents de l'SMN (revisat a [205, 257]). Algunes d'elles se centren en promoure la neuroprotecció per prevenir la degeneració i la mort de les motoneurones. Dins d'aquestes existeixen aquelles que presenten un efecte neurotròfic, com són la cardiotrofina-1 [258] o el factor neurotròfic ciliar [259], a més de les que busquen una protecció de les mitocòndries o una reducció de la toxicitat per glutamat mitjançant l'agent farmacològic riluzol [260-262] o gabapentina [263, 264]. Per altra banda, altres teràpies es dirigeixen a la millora de les condicions patològiques en teixits no neuronals. Entre aquestes últimes, figuren les estratègies dirigides a atenuar l'atròfia dels músculs, com per exemple la inhibició de la miostatina mitjançant folistatina per tal d' incrementar la massa i la força muscular [265-267] o l'expressió d'IGF-1 (*Insuline-Like Growth Factor-1*) [268, 269], així

com aquelles destinades a modular la dinàmica del axons, que inclouen la Plastin-3 [102, 270] i inhibidors de la Rho kinasa (Y-27632 [271] i Fasudil [272]).

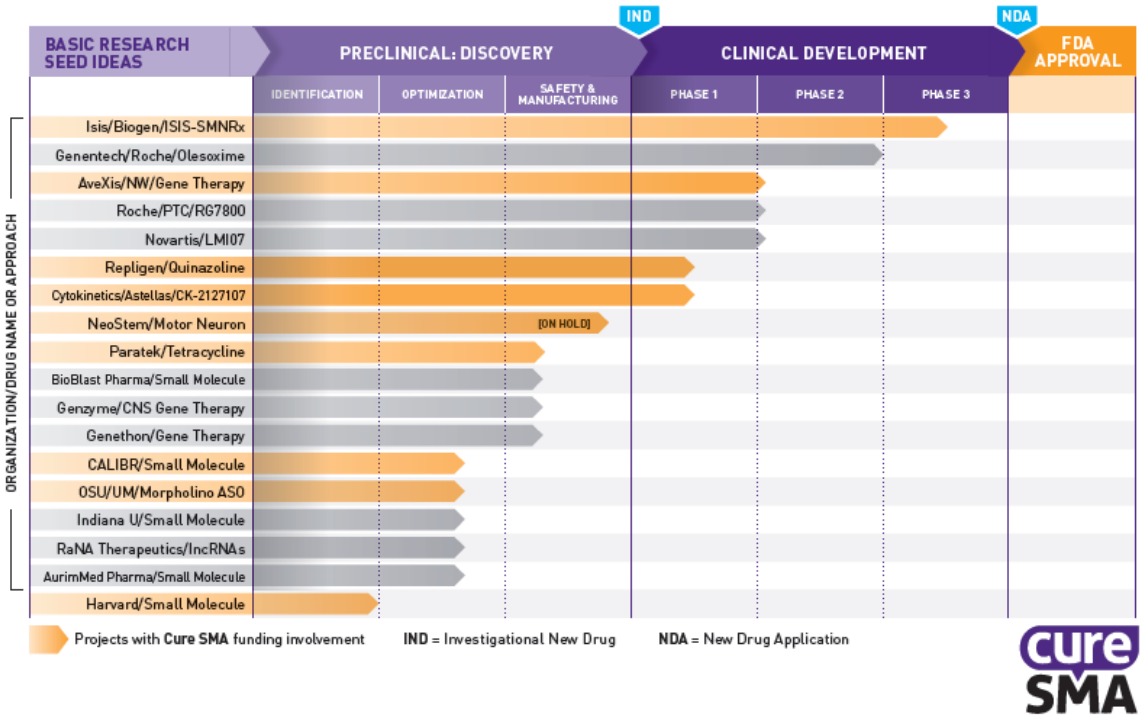


Figura 14. Teràpies en desenvolupament en juny del 2015. *(Figura exrteta de[273])*

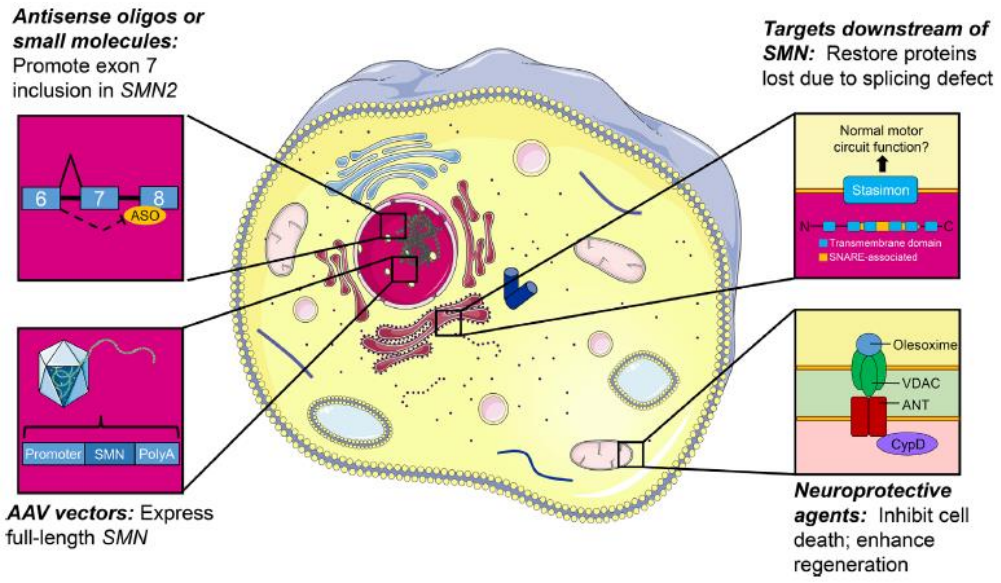


Figura 15. Nivell d'actuació de les diferents estratègies terapèutiques en l'AME*. L'enfoc predominant per tractar l'AME és el d'incrementar els nivells d'FL-SMN, bé promovent la inclusió de l'exó 7 en els transcripts SMN2 o per sobreexpressió d'SMN exògen. Altres teràpies estan desenvolupant-se en paral·lel i tenen l'objectiu de corregir els defectes que sorgeixen com a conseqüència del dèficit d'SMN a més de prevenir la degeneració de les motoneurones mitjançant agents neuroprotectors. (Extreta de [274]).*

II. OBJECTIUS

L'atròfia muscular espinal és una malaltia d'origen genètic ocasionada pels nivells insuficients de proteïna SMN. Tradicionalment, s'ha considerat la mort de les motoneurones alfa la causa principal de la malaltia. No obstant, recentment està reconsiderant-se aquesta definició i està discutint-se la implicació de diferents cèl·lules mes enllà del sistema neuromuscular en la patologia de l'AME. Existeixen diversos models murins de la malaltia, però el fet que la progressió de la malaltia esdevinga de manera ràpida fa que aquests models presenten limitacions en quant a l'estudi de diversos aspectes de la malaltia. Així, en aquesta tesi es pretén aprofundir en la caracterització fenotípica d'un model murí d'AME de progressió més lenta, el model *Smn*$^{2B/-}$. A més, es planteja l'ús de diversos compostos farmacològics com a possibles agents terapèutics: l'AICAR i el PRE-084.

Objectius:

1. Caracteritzar fenotípicament el model murí d'AME *Smn*$^{2B/-}$.
   - **a.** Analitzar les característiques histopatològiques del sistema neuromuscular.
   - **b.** Estudiar la resposta a la desconnexió neuromuscular mitjançant l'axotomia del nervi ciàtic i a la paràlisi induïda per la toxina botulínica.
   - **c.** Determinar el grau d'afectació dels òrgans i teixits que acompanya la clàssicament coneguda disfunció del sistema neuromuscular.

2. Estudiar si el PRE-084, agonista del receptor Sigma-1, exerceix algun efecte beneficiós en l'AME.

3. Determinar si l'AICAR, agent mimètic de l'exercici físic, produeix alguna millora en l'AME.

III. MATERIALS I MÈTODES

1. ANIMALS I MANTENIMENT DE LA COLÒNIA

Els animals van ser estabulats seguint els requeriments necessaris, amb una alimentació *ad libitum* i una atmosfera controlada pel que fa a la temperatura, humitat i cicles de llum-obscuritat. Arribat el moment del sacrifici de l'animal i l'obtenció de les mostres, els ratolins van ser anestesiats amb una injecció intraperitoneal (10µl/g d'animal) de solució salina (0,9% NaCl) amb ketamina al 10% i xilacina al 2%. Tant el disseny experimental com el manteniment dels ratolins han seguit les directrius publicades en el decret de regulació de la utilització d'Animals per a l'Experimentació de la Generalitat de Catalunya en el marc de les directives del Consell Europeu.

Les línies utilitzades en aquesta tesi van ser les següents:

Smn$^{-/-}$;SMN2$^{+/+}$ (FVB.Cg-Tg(SMN2)89Ahmb Smn1^{tm1Msd}/J [The Jackson laboratory, Sacramento, USA, stock 005024]). Aquesta colònia va ser mantinguda mitjançant creuaments d'heterozigots per al gen *Smn* (*Smn$^{+/-}$;SMN2$^{+/+}$*), donant lloc a un model murí sever d'AME (*Smn$^{-/-}$;SMN2$^{+/+}$*), a més de dos genotips diferents: heterozigots (*Smn$^{+/-}$;SMN2$^{+/+}$*) que van ser destinats al manteniment i la continuació de la colònia i wild-types (*Smn$^{+/+}$;SMN2$^{+/+}$;* referits com WT) que van ser utilitzats com a controls en els experiments realitzats.

SMNΔ7 (FVB.Cg-Tg(SMN*delta7)4299Ahmb (SMN2)89Ahmb Smn1^{tm1Msd}/J [The Jackson laboratory, stock 005025]). El mètode de manteniment de la colònia va ser idèntic al realitzat amb els *Smn$^{-/-}$;SMN2$^{+/+}$*. Els creuaments d'heterozigots va donar lloc als animals malalts (*Smn$^{-/-}$;SMN2$^{+/+}$;SMNΔ7$^{+/+}$*, referits d'ara endavant com SMNΔ7*),* als heterozigots (*Smn$^{-/+}$;SMN2$^{+/+}$;SMNΔ7$^{+/+}$)* i als WT (*Smn$^{+/+}$;SMN2$^{+/+}$;SMNΔ7$^{+/+}$*, referits com WT) utilitzats com a control.

Smn$^{2B/-}$ (Smn$^{+/-}$ (B6.Cg-Smn1^{tm2Mrph}/J, [The Jackson laboratory, stock 007963]) x *Smn$^{2B/2B}$* [Cedits pel Dr. Rashmi Kothary, *University of Ottawa*, Canadà]). Per generar el model murí amb un fenotip intermedi d'AME, es van realitzar creuaments de ratolins mascles heterozigots per al gen *Smn* (*Smn$^{+/-}$*) i femelles homozigotes per al transgen *Smn^{2B}* (*Smn$^{2B/2B}$*), de manera que donaven lloc a cries portadores del transgen *Smn^{2B}* i amb un 50% de probabilitats de tenir l'al·lel *Smn*. Així, els ratolins *Smn$^{2B/-}$* manifestaven un fenotip intermedi d'AME, mentre que els *Smn$^{2B/+}$* es desenvolupaven amb normalitat [158], utilitzant-se per tant com a control en els experiments realitzats (referits com a WT en aquesta tesi).

2. PROVES D'HABILITAT MOTORA I DETERMINACIÓ DEL PES DELS ANIMALS

Per tal de determinar la progressió de la malaltia i l'habilitat motora, es van realitzar diàriament a primera hora del matí un seguit de proves, fixades en funció de l'edat de l'animal. Paral·lelament, es va realitzar una observació de cada animal per detectar l'aparició de signes i símptomes de la malaltia i es va mesurar el pes dels mateixos.

2.1. Righting Reflex (RR)

Els animals es van situar en una superfície completament plana, d'esquena a terra. L'èxit o el fracàs per a reposicionar-se va ser avaluat, així com el temps empleat, amb un temps màxim de 30 segons. Es considerava la prova per finalitzada amb èxit únicament quan les 4 potes estaven correctament situades per començar a caminar. Es van portar a terme tres repeticions amb el temps necessari entre elles per deixar descansar als animals.

2.2. Tube test (TT)

Aquest test avalua la funció neuromuscular i la postura corporal en neonats, i en concret la força, la debilitat i la fatiga dels músculs proximals de les potes posteriors [275]. Aquesta prova es va realitzar fins P10 en el cas dels animals *Smn*$^{2B/-}$ i fins a les etapes terminals en els SMNΔ7. La prova consisteix en posar l'animal cap per avall de manera que es subjecte amb les potes posteriors a un tub de centrífuga de 50 ml, contenint una bola de cotó al fons per protegir l'animal de la caiguda. Es van dur a terme tres repeticions amb el temps necessari entre elles per deixar descansar als animals. Es van avaluar dos paràmetres:

TT time. Temps que tarda el ratolí en caure, amb un temps màxim de 30 segons.

***TT score*.** Puntuació que varia entre 0 i 4 depenent de la posició de la cua i de les potes posteriors durant els primers 10 segons (**Figura 16**).

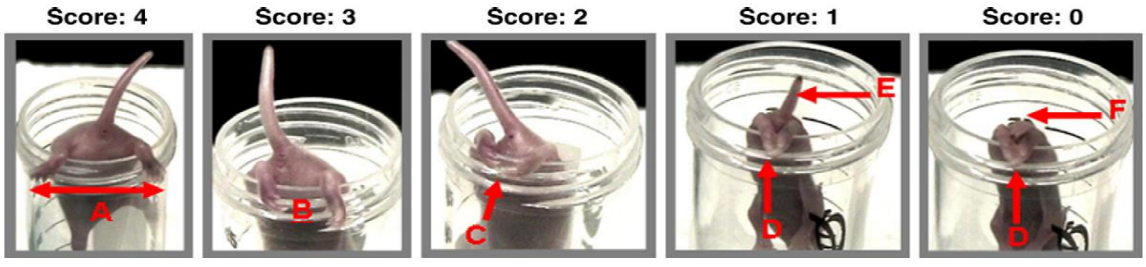


Figura 16. Prova del "tube test" i criteri de puntuació segons la posició de la cua i les potes posteriors. *Score de 4, indica una separació normal de les potes posteriors i una posició de la cua totalment aixecada (A); score de 3, les potes posteriors presenten una lleugera inclinació cap a un costat però no arriben a tocar-se (B); score de 2, les potes estan més properes i sovint es toquen (C); score de 1, les potes estan pràcticament sempre en contacte (D) i la cua presenta un estat erecte amb denotacions de debilitat;*

score de 0 indica un contacte continu de les potes (D) i la cua totalment plana (F) o la incapacitat de l'animal de portar a terme la prova. (Imatge extreta de [275]).

2.3. Pen test

Aquesta prova avalua el reflex prènsil, la capacitat de tracció i la coordinació dels animals explorats. Els ratolins s'agafaven per la cua, de manera que quedaven suspesos amb les potes anteriors a la mateixa altura que una corda tensada i elevada a 40 cm sobre la superfície de la bancada [276]. El reflex prènsil es va avaluar durant els primers 5 segons, de manera que es va donar una puntuació d'1 si l'animal era capaç d'agafar-se amb les potes anteriors a la corda, i de 0 si, en canvi, l'animal queia. La capacitat de tracció es va poder mesurar amb una puntuació que reflectia el nombre de potes posteriors que l'animal aconseguia elevar i enganxar a la corda: 0, 1 o 2 (**Figura 17**). Per últim, es registrava la latència de caiguda, amb un màxim de 30 segons. Es van portar a terme tres repeticions amb el temps necessari entre elles per deixar descansar als animals.

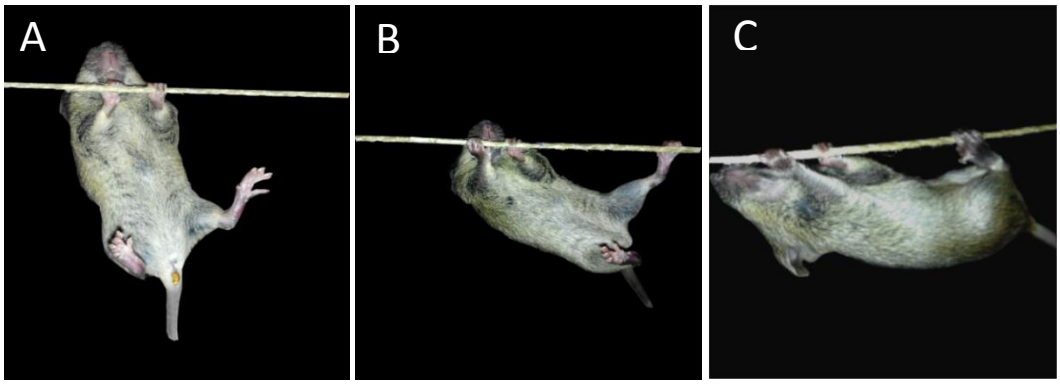


***Figura 17. Prova del "Pen test" i criteri de puntuació**. Segons els nombre de potes posteriors que l'animal era capaç d'elevar i enganxar a la corda es donava una puntuació de 0 (A), 1 (B) o 2 (C).*

2.4. Grip test

Aquest test avalua la força muscular exercida per les potes anteriors. Els animals s'agafaven per la cua de manera que quedaven suspesos en l'aire i acte seguit se'ls permetia agafar-se amb les potes anteriors a una reixeta col·locada sobre una superfície inclinada. S'analitzava la capacitat dels animals de vèncer la força exercida per la gravetat i el seu propi pes mantenint-se o no aferrats durant un mínim de 20 segons. La inclinació inicial era de 30º, i anava augmentant-se (45º, 60º i 75º) a mesura que l'animal realitzava amb èxit la prova, quedant com a registre numèric final la inclinació màxima suportada.

2.5. Paw print

Aquest assaig avalua la coordinació motora. Es va emprar un mètode prèviament descrit per Barlow *et al*. [277]. Les potes dels animals es van marcar amb tinta no tòxica, utilitzant diferents colors per a les potes anteriors (magenta) i les posteriors (blau). Quan el ratolí passava sobre un paper de filtre per un túnel obscur i estret (10 x 10 x 70 cm), el patró de marxa quedava reflectit, permetent l'anàlisi de la longitud de la petjada (distància existent entre dos marques consecutives de la mateixa extremitat). Un única repetició es va portar a terme en aquest cas, analitzant per a cadascun dels paràmetres un mínim de tres mesures compreses en trams continus d'un mínim de 20 cm en els quals la marxa era constant, excloent les petjades tant inicials com finals. Per tal d'evitar considerar diferències degudes a la diferència de mida dels animals controls i els malalts, i no a la neurodegeneració, cadascuna de les mesures va ser dividida entre el pes de l'animal en cada punt de l'estudi.

3. GENOTIPATGE ANIMALS

Tots els animals utilitzats van ser genotipats per tal d'assegurar la presència o l'absència dels transgens. La identificació dels animals es va realitzar a través d'un marcatge de les potes amb tinta de tatuatge (Fine Science Tolls GmbH, Heidelberg, Alemania). Al mateix temps que els animals eren tatuats, es va tallar un fragment de la cua per obtenir el DNA necessari per al genotipatge dels mateixos. El REDExtract-N-AmpTMTissue PCR kit (Kit d'extracció de DNA) de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) conté els reactius necessaris per a l'extracció del DNA i per a la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). Els següents passos es van portar a terme seguint les recomanacions del fabricat.

3.1. Obtenció DNA

Cada fragment de cua es va incubar amb 40 µl d'*extract solution* i 10µl de *tissue preparation solution* durant 10 minuts a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, les mostres es van escalfar durant 3 minuts a 95ºC i a continuació es van afegir 50 µl de *neutralization solution B*.

3.2. Preparació de la PCR

Per a l'amplificació dels gens a analitzar va ser necessària una combinació de 3 *primers* en el cas dels models $Smn^{-/-};SMN2^{+/+}$ i SMNΔ7. D'aquesta manera, en els animals WT apareixia una banda de 800 parells de bases (pb), en els animals malalts el fragment amplificat era d'una mida de 500 pb i en els heterozigots s'observaven ambdós bandes. En el cas dels animals $Smn^{2B/-}$, els *primers* utilitzats amplificaven el gen lacZ, donant lloc a la presència d'una banda

de 150 pb únicament en els animals malalts. La quantitat de reactius necessària per a l'amplificació d'una mostra de DNA va ser la següent (**Taula 2**):

***Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$ i SMNΔ7**		***Smn*$^{2B/-}$**	
H_20 mQ	3,15 µl	**H_20 mQ**	4,95 µl
REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	4,65 µl	**REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix**	4,65 µl
DNA	2 µL	**DNA**	2 µL
WT F (100 uM) (ctccgggatattgggattg)	1,2 µl	**lacZ F** (100 uM) (ttggcctgaactgccagctggcgcagg)	0,2 µl
WT R (100 uM) (tttcttctggctgtgcctttt)	0,6 µl	**lacZ R** (100 uM) (tcccgcagcgcagaccgttttcgctcg)	0,2 µl
SMA R (20 uM) (ggtaacgccagggttttcc)	0,4 µl		

Taula 2. Composició dels reactius i primers utilitzats per a la PCR.

El programa que incloïa la desnaturalització inicial, els cicles de desnaturalització, hibridació i elongació i la etapa final d'elongació es portaren a terme en l'aparell termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, USA) de la manera que a continuació es detalla (**Figura 18**):

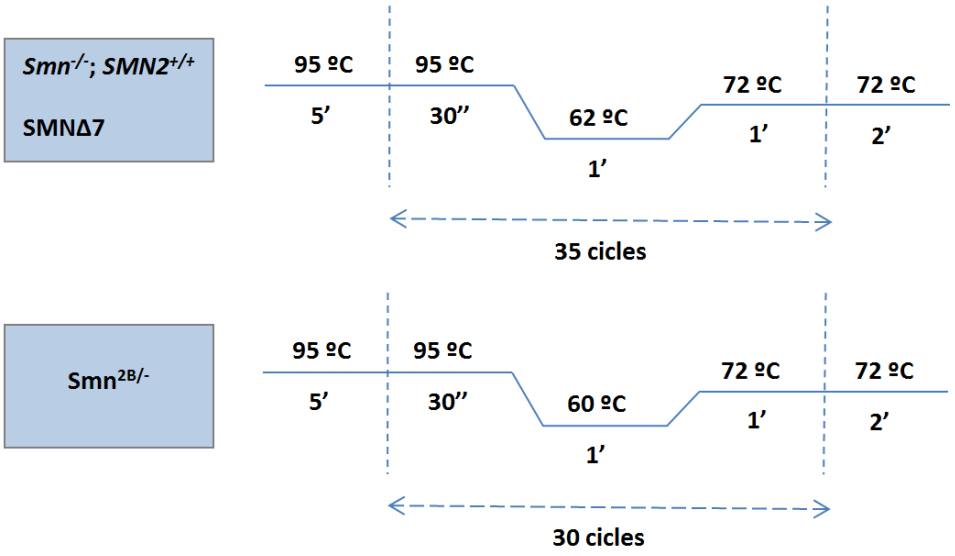


Figura 18. Esquema del canvi de temperatures en la PCR per als diferents models murins d'AME utilitzats*. El programa s'inicia amb la desnaturalització del DNA per passar als cicles de desnaturalització, hibridació i elongació i finalitzar amb la etapa addicional d'elongació. La temperatura d'elongació i el nombre de cicles va variar en funció del model murí a genotipar: 62ºC i 35 cicles per als models Smn*$^{-/-}$*;SMN2*$^{+/+}$ *i SMNΔ7 i 60ºC i 30 cicles per al model Smn*$^{2B/-}$*.*

3.3. Separació de fragments de DNA per electroforesi en gel d'agarosa

Una vegada finalitzada la reacció d'amplificació, el producte de la PCR es va carregar en els pous de gels d'agarosa preparats a l'1%, en el cas del model *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$ i SMNΔ7, i a l'1,5%, en el cas dels *Smn*$^{2B/-}$, en tampó TAE (40 mM Tris Acetate, 0,05M EDTA) i 0,01% *syber safe* (Invitrogen, Carlsbad, USA). La separació dels fragments de DNA es va realizar a 100V durant 30 minuts. Per estimar la mida dels productes de la PCR es va utilitzar un pou extra per carregar 5 µL de 1Kb DNA *ladder* (Invitrogen). Els fragments de DNA van ser visualitzats amb llum ultraviolada mitjançant un ChemiDoc XRS Imaging system (Bio-Rad).

4. AXOTOMIA DEL NERVI CIÀTIC

Els experiments d'axotomia es van realitzar en ratolins de 15 dies d'edat del model *Smn*$^{2B/-}$. Per portar a terme la secció del nervi ciàtic, els ratolins van ser degudament anestesiats mitjançant injeccions intraperitoneals, tal i com s'ha comentat anteriorment (Pag. 35) i acte seguit es va realitzar una incisió d'aproximadament 2 mm a la pell per sobre del genoll dret, de manera que el nervi ciàtic quedara exposat. Els músculs que quedaven per sobre es van apartar, prestant atenció de no danyar els vasos sanguinis del voltant, i a continuació es va seccionar el nervi ciàtic. Amb l'objectiu d'evitar la reinnervació espontània es va practicar una lligadura en l'extrem proximal del nervi. La lesió va ser tancada amb dos punts de sutura i es va deixar que els animals es recuperaren de l'anestèsia abans de ser retornats a les gàbies d'on provenien. Els ratolins es van anar observant diàriament fins que la ferida es va tancar completament o fins el moment de l'obtenció de les mostres (10 dies post-axotomia), per controlar que la lesió no s'obrira.

5. PARÀLISI AMB TOXINA BOTULÍNICA

La paràlisi muscular es va realitzar mitjançant la injecció de la toxina botulínica de serotip A (BotA, List Biological Antibodies). Els animals *Smn*$^{2B/-}$ i WT, de 13 dies d'edat, van ser degudament anestesiats i sotmesos a injeccions subcutànies a l'altura del múscul *Levator auris longus* (LAL) dret, bé amb BotA (0,08 pg/g) o bé amb el corresponent volum de solució vehicle (0,9% NaCl) com a control de l'experiment. Se sap d'estudis previs que la dosi de toxina injectada indueix una paràlisi completa i fenòmens d'*sprout* en el múscul LAL [278, 279]. Passats set dies, a P20, es van sacrificar els animals i el múscul LAL va ser dissecat, descartant la part caudal i mantenint la part rostral per al seu posterior estudi.

6. TRACTAMENTS AMB POTENCIALS AGENTS TERAPÈUTICS

6.1. Administració d'"AICAR"(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)

L'efecte terapèutic de l'AICAR (Tocris Bioscience, Minneapolis, USA) va ser testat utilitzant el model murí SMNΔ7. Amb aquest fi, els animals van ser dividits en quatre grups experimentals: WT i SMNΔ7 tractats amb AICAR (500 mg/Kg/dia), i WT i SMNΔ7 injectats amb el corresponent volum de sèrum fisiològic (vehicle). L'administració del fàrmac es va fer diàriament (des de P1 fins a l'últim punt experimental prèviament establert) per via subcutània en la regió intercapsular, utilitzant una xeringa d'insulina i una agulla 30G. Al mateix temps, el pes i la supervivència dels animals van ser analitzats.

6.2. Administració de l'agonista del receptor Sigma-1: PRE-084 (2-(4Morpholinethyl) 1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride)

Per portar a terme l'estudi de l'efecte terapèutic de l'agonista del receptor Sigma-1 (PRE-084, Tocris Bioscience), es van realitzar dos experiments de forma paral·lela amb dos models d'AME: SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$. El procediment va ser idèntic a l'explicat a l'apartat anterior; es van organitzar quatre grups experimentals: WT i animals amb AME tractats amb PRE-084 (0,25 mg/Kg/dia), i WT i animals malalts injectats amb el corresponent volum de sèrum fisiològic (vehicle). El pes de l'animal així com la supervivència van ser anotats diàriament. L'administració del fàrmac es va realitzar en la regió intercapsular per via subcutània (utilitzant una xeringa d'insulina i una agulla 30G) de forma diària (des de P1 fins a l'últim punt experimental prèviament establert).

7. TÉCNIQUES DE MICROSCOPIA ÒPTICA I DE FLUORESCÈNCIA

7.1. Obtenció de mostres, dissecció i processament

Per tal de ser estudiats al microscopi, els teixits van ser fixats mitjançant la perfusió transcardíaca dels animals. Aquest mètode es basa en el pas d'un agent fixador a través del sistema circulatori de l'animal amb l'objectiu d'afavorir la fixació de tot l'organisme. Així, els ratolins van ser degudament anestesiats i subjectats en un suport per realitzar una incisió al llarg de la línia mitjana de l'animal, deixant al descobert la cavitat abdominal. A continuació, es van apartar les vísceres i es va fer una incisió al diafragma per tal d'accedir a la cavitat toràcica. Ràpidament, es va fer un tall a l'aurícula dreta de l'animal i es va introduir, amb un angle d'aproximadament 45º, una agulla per microperfusió (Butterfly-27, Venisystems) al ventricle esquerre. Es va fer passar solució salina (0,9% NaCl) per tal de substituir la sang pel sèrum fisiològic i netejar el sistema circulatori de l'animal. En el moment que el flux provinent de l'aurícula dreta era transparent, es va procedir a la fixació de l'animal fent passar l'agent fixador, en aquest cas paraformaldehid (PFA) al 4% en tampó fosfat (PB) 0,1 M ajustat a pH

7,4, fins que la musculatura de l'animal va quedar rígida. Aquesta tècnica es va realitzar a la campana d'extracció de gasos, per tal d'evitar la inhalació del fixador.

Seguidament es va procedir a la dissecció dels animals per a obtenir el material necessari:

- **Músculs.** Una vegada dissecats el **tibial anterior (TA)** i l' **intercostal (IC),** es van postfixar 2 hores en PFA al 4% i a continuació, per crioprotegir el teixit, es van deixar un mínim de 3 dies amb sucrosa al 30% en PB 0,1M. Transcorregut aquest temps, els músculs es van incloure en un bloc de Tissue Freezing Medium (TFM, Triangle Biomedical Sciences, Durham, USA), es van deixar solidificar a -80ºC un mínim de 10 minuts i es va procedir a fer les crioseccions (de 16 µm per als talls longitudinals i de 10 µm per als talls transversals). Les seccions es van realitzar al criostat Leica (CM1900 de Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) i les seccions eren recollides en portaobjectes esmerilats que es van deixar assecar i es van congelar a -80ºC fins al moment de la seua utilització. El múscul ***levator auris longus*** **(LAL)** es va destinar per a la tècnica del *whole mount*, de manera que es va dissecar i va ser dipositat amb la part dorsal cap amunt en una placa de 30 mm amb base de Sylgard (Down Corning, Wiesbaden, Alemania) i es va immobilitzar amb agulles de subjecció. A continuació es va fixar durant 20 minuts amb PFA al 4% en agitació i transcorregut aquest temps es van fer tres rentats amb PBS 1X de 10 minuts cadascun. Finalment, els músculs es van congelar a -20ºC en un eppendorf contenint PBS 1X fins al moment de ser utilitzats.

  Modificacions

  En el cas de l'experiment destinat a l'estudi de la tipologia de fibres musculars, les seccions utilitzades provenien de material no fixat, de manera que els animals van ser sacrificats per decapitació. La pota posterior es va col·locar sobre una superfície de suro envoltada amb tragacant, i acte seguit, es va congelar introduint-la en un recipient amb isopentà submergit en un bany de nitrògen líquid. A continuació, es van realitzar les seccions transversals de la mostra al criòstat, d'un gruix de 10 µm, seguint els mateixos passos explicats anteriorment.

- **Melsa i timus.** El procediment va ser idèntic al realitzat amb els músculs, amb la diferència que la post-fixació va ser amb PFA a l'1% i les seccions al criòstat de 10 µm.

- **Medul·la lumbar i ganglis de l'arrel dorsal**. Es va seguir el mateix procediment, però el temps de immersió en PFA al 4% va ser de 24 hores per al cas de la medul·la espinal i d'una hora per als ganglis de l'arrel dorsal (DRG). Les crioseccions van ser de 16 µm.

7.1.1. Inclusió de mostres en parafina

En el cas de que la medul·la fóra destinada per comptatge de motoneurones, les mostres van ser incloses en parafina. En aquest cas la post-fixació es va realitzar amb fixador de Carnoy (per a edats menors de P5) o amb fixador de Bouin, durant un mínim de 15 dies. La inclusió en parafina també es va portar a terme en mostres de melsa, les quals van ser post-fixades amb PFA a l'1% durant 24 hores. Transcorregut aquest temps es va procedir a la deshidratació i la inclusió de les mostres en parafina (Panreac) (**Taula 3**). En aquest cas les seccions es van realitzar de manera seriada al micròtom (RM2235, Leica) i van ser d'un gruix de 12 µm (per medul·les d'animals menors de P20) o 14 µm (per edats iguals o superiors a P20), o de 5 µm per al cas de la melsa.

Reactiu		Medul·la		Melsa	
		Temps	Repeticions	Temps	Repeticions
Deshidratació	EtOH 70º	10''	-	45'	-
	EtOH 90º	-	-	45'	-
	EtOH 96º	10''	-	-	-
	EtOH 96º	30''	2	-	-
	EtOH 100º	3'	2	30'	2
	Xilè	10'	-	30'	2
	Xilè-Eucaliptol	10'	-	-	-
Inclusió	Parafina líquida	6h	-	30'	-
	Parafina líquida	1h	-	-	-

Taula 3. Procés de deshidratació i inclusió en parafina de mostres de medul·la espinal i melsa.

7.2. Tincions histològiques clàssiques

7.2.1. Hematoxilina-eosina

La tinció amb hematoxilina-eosina és un dels mètodes més utilitzats en histologia per identificar estructures cel·lulars. Es basa en l'ús d'hematoxilina que tenyeix les estructures àcides, seguit de la tinció amb eosina que marca les estructures bàsiques (**Taula 4**). En la present tesi, aquesta tècnica es va utilitzar per a tenyir seccions de parafina de melsa per

identificar l'estructuració cel·lular, de medul·la lumbar d'animals majors de P5 (amb seccions de parafina) per portar a terme el comptatge de motoneurones i de crioseccions de tibial anterior per al recompte de fibres musculars i l'anàlisi de l'àrea de les mateixes.

Les seccions de teixit inclòs en parafina es van escalfar a 62ºC per fondre la parafina i es van sotmetre a un procés de rehidratació passant per banys amb xilè i alcohols a diferents concentracions. En les mostres provinents de crioseccions es va procedir a partir d'aquest punt. Per a realitzar la tinció, les mostres es van submergir durant 25 segons en hematoxilina de Harris (Gurr) i es va deixar rentant amb aigua corrent de l'aixeta durant 5 minuts per traure l'excés d'hematoxilina. A continuació, es va fer un rentat ràpid amb alcohol àcid i es va repetir el rentat amb aigua corrent de l'aixeta durant 10 minuts. Per finalitzar es van submergir en eosina durant 20 segons i es va procedir a la deshidratació de les mostres i muntatge amb DPX (Panreac).

	Reactiu	Temps	Repeticions
Rehidratació	Xilè	10'	3
	EtOH 100º	5'	2
	EtOH 95º	5'	2
	EtOH 60º	5'	2
Tinció	dH_2O	10'	-
	Hematoxilina	25'	-
	dH_2O	5'	-
	Alcohol àcid	10 immersions	-
	dH_2O	10'	-
	Eosina	20''	-
Deshidratació	EtOH 70º	10''	-
	EtOH 96º	10''	-
	EtOH 96º	30''	2
	EtOH 100º	3'	2
	Xilè	10'	-
	Xilè-Eucaliptol	10'	-

Taula 4. Procés de tinció amb Hematoxilina-Eosina.

7.2.2. Tionina

La tinció amb tionina es va portar a terme per a realitzar el comptatge de motoneurones de la medul·la lumbar de ratolins menors de P5 (**Taula 5**). Les seccions de parafina es van

deshidratar i tenyir submergint-les durant 25 segons en tionina. A continuació es van realitzar dos rentats amb aigua destil·lada i, per finalitzar, es van deshidratar i muntar amb DPX.

	Reactiu	Temps	Repeticions
Rehidratació	Xilè	10’	3
	EtOH 100º	5’	2
	EtOH 95º	5’	2
	EtOH 60º	5’	2
	dH_2O	10’	-
Tinció	Tionina	25’’	-
	dH_2O	10 immersions	2
Deshidratació	EtOH 70º	10’’	-
	EtOH 96º	10’’	-
	EtOH 96º	30’’	2
	EtOH 100º	3’	2
	Xilè	10’	-
	Xilè-Eucaliptol	10’	-

Taula 5. Procés de tinció amb tionina.

7.3. Tincions immunocitoquímiques

7.3.1. Immunofluorescència

El marcatge amb immunofluorescència es va realitzar sobre seccions provinents de talls de criòstat. Les mostres, emmagatzemades a -80ºC, es van deixar temperar durant 5 minuts i es van permeabilitzar amb PBS 1X-tritó 0,1% durant 30 minuts submergint-les en una cubeta en agitació. Per evitar senyals inespecífics, les mostres es van bloquejar, en funció de l’anticòs primari a utilitzar, amb sèrum de cabra o de cavall (NGS o NHS, Gibco, Waltham, USA) durant una hora a temperatura ambient. A continuació es va procedir a la incubació amb els anticossos primaris d’interès (**Apèndix 1**) durant 16 hores (overnight) a 4ºC en una cambra humida. Per treure l’excés d’anticòs, es van portar a terme tres rentats de 10 minuts amb PBS 1X i, acte seguit, les mostres es van incubar amb els corresponents anticossos secundaris conjugats amb els respectius fluorocroms durant una hora a temperatura ambient i en la foscor; a partir d’aquest punt, tots els passos següents van tenir lloc en condicions de foscor. Finalitzada la incubació, es van realitzar tres rentats i es va continuar, si era necessari, amb el marcatge nuclear amb 4’,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 50ng/ml, Molecular Probes, Eugene, USA) durant 10 minuts a temperatura ambient, seguit d’una última

sèrie de tres rentats. Finalment, es va procedir al muntatge dels portaobjecteses amb Mowiol (Calbiochem, San Diego, USA) per ser visualitzats al microscopi de fluorescència.

Modificacions

En el cas de les mostres de múscul, si era d'interès marcar els receptors d'acetilcolina per poder visualitzar les plaques motores, les seccions es van incubar junt als anticossos secundaris amb α-bungarotoxina (α-Bgtx, Molecular Probes) conjugada amb el fluorocrom Alexa488 a una dilució 1:500.

Per tal d'identificar les neurones, les seccions de medul·la espinal i gangli de l'arrel dorsal es van incubar amb Neurotrace 500/525 (verd) o 530/615 (roig) fluorescent Nissl stain (Molecular Probes) a una dilució 1:150, o bé a 1:100 en cas d'utilitzar el Neurotrace 435/455 (blau) fluorescent Nissl stain (Molecular Probes). Aquesta incubació, d'una durada de 20 minuts, es va realitzar a temperatura ambient després del marcatge amb els anticossos secundaris. Posteriorment, va ser necessària una sèrie de 3 rentats de 10 minuts amb PBS 1X i un rentat addicional de 2 hores en agitació.

En el cas de les mostres de timus i melsa, posteriorment al marcatge amb els anticossos secundaris, es va realitzar una tinció durant 15 segons amb blau de toluïdina, seguida de 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X.

7.3.2. Whole mount

Aquesta tècnica permet l'estudi d'una mostra sencera de teixit sense necessitat de seccionar-la. Es va portar a terme amb el LAL, un múscul que, degut al seu gruix, permet un marcatge de la totalitat de les unions neuromusculars per fer una anàlisi més objectiva i real de l'estructura d'aquestes. Els músculs, emmagatzemats a -20ºC es van deixar temperar durant 30 minuts sobre una placa Petri en agitació amb PBS 1X contenint 0,1M glicina i 2% BSA. A continuació, es van fer tres rentats de 10 minuts amb PBS 1X i es van permeabilitzar les mostres afegint metanol i deixant-les a -20ºC durant 5 minuts. Acte seguit es va fer una sèrie de 3 rentats i, per tal d'evitar la tinció inespecífica, es van incubar durant una hora amb solució de bloqueig (PBS contenint BSA al 2% i tritó X-100 al 0,2%). El marcatge amb els anticossos primaris d'interès (**Apèndix 1**) diluïts en solució de bloqueig va tenir lloc durant 16 hores en agitació a 4ºC. Acabada la incubació, es van fer tres rentats de 10 minuts amb PBS 1X, i es va afegir solució de bloqueig contenint tant els anticossos secundaris corresponents com α-bungarotoxina conjugada amb el fluorocrom Alexa488 per marcar les plaques motores. Transcorreguda 1 hora d'incubació en la foscor, es va fer una sèrie de 3 rentats i es va dipositar

cada múscul en un porta amb la regió dorsal cap amunt. Es va afegir vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) com a medi de muntatge i es van visualitzar els portaobjectes al microscopi de fluorescència.

7.3.3. TUNEL

El mètode *Terminal Deoxynucleotydil Transferase dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL) mitjançant el *In Situ Death Detection Kit* (Roche, Penzberg, Alemania) permet la detecció i quantificació de mort cel·lular apoptòtica en teixits, basant-se en el marcatge dels fragments de DNA que resulten del procés d'apoptosi. Aquest kit conté l'enzima *Terminal deoxynucleotidyl transferase* (*TUNEL reaction mixture*) que afegeix al terminal 3'-OH, dels fragments de DNA característics de l'apoptosi, nucleòtids marcats amb fluoresceïna que posteriorment és detectada amb un anticòs conjugat a peroxidasa de rave per tal d'amplificar el senyal. Les cèl·lules apoptòtiques poden ser visualitzades al microscopi òptic després d'afegir un substrat de la peroxidasa.

Aquesta tècnica es va portar a terme per a detectar l'apoptosi en mostres provinents de seccions de criòstat de melsa i de múscul (TA). Els portaobjectes es van deixar temperar i es van rentar durant 30 minuts amb PBS 1X. Per evitar detectar el senyal provinent de la peroxidasa endògena, les mostres es van bloquejar amb metanol contenint 3% d'H_2O_2 (durant 30 minuts els músculs i durant 1 hora en al cas de la melsa). Després de rentar amb PBS 1X les mostres es van permeabilitzar deixant-les 2 minuts entre 2 i 8ºC amb solució de permeabilització contenint 0,1% Tritó X-100 i 0,1% citrat de sodi. A continuació es van realitzar dos rentats amb PBS 1X i es van afegir 50 µl de *TUNEL reaction mixture*. Es va incubar durant una hora a 37ºC en una cambra humida i en la foscor. A continuació, i després de 3 rentats amb PBS 1X, es va portar a terme la conversió del senyal. Amb aquest propòsit, es van afegir 50 µl a cada porta del reactiu Converter-POD i es va deixar incubar durant 30 minuts a 37ºC en cambra humida. Acte seguit, es van realitzar tres rentats amb PBS 1X i es va afegir el substrat de la peroxidasa, en aquest cas la *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate* (DAB, Sigma). Es va deixar reaccionar durant 10 minuts i, després de rentar amb PBS, les mostres es van deshidratar seguint el mateix procediment que l'explicat a l'apartat 7.2.1 (Pag. 43) i es van muntar amb DPX per, posteriorment, ser visualitzades al microscopi òptic.

7.4. Anàlisi dels resultats. Obtenció i processament d'imatges

Una vegada les mostres eren processades i degudament muntades, es va procedir a la visualització de les mateixes amb el microscopi d'interès: microscopi òptic (Olympus, Hamburg, Alemania) equipat amb la càmera digital DMX 1200 (Nikon, Tokyo, Japó), microscopi

d'epifluorescència Olympus BX51 equipat amb la càmera DP30BW (Olympus), o microscopi confocal FV500 o FV1000 (Olympus). Els *settings* emprats per a la captura de les imatges van ser idèntics per a cadascuna de les mostres d'un mateix experiment.

Els estudis morfològics i la quantificació dels paràmetres estudiats es van realitzar sobre imatges digitals utilitzant el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Els detalls sobre l'anàlisi dels diferents paràmetres estudiats s'especifiquen en el corresponent apartat dels resultats.

7.4.1. Comptatge de motoneurones

Les motoneurones aparentment sanes de la banya ventral van ser identificades per la mida i la forma característica d'aquest tipus cel·lular. El comptatge es va realitzar directament al microscopi òptic, a partir de seccions seriades seguint el procediment prèviament descrit per Clarke i Oppenheim [280]. Els comptatges es van realitzar cada deu seccions i únicament es van quantificar les motoneurones amb un nucli gran i que presentaven un material nuclear ben definit i un citoplasma considerable. El nombre total de motoneurones de la banya ventral es va obtenir multiplicant el nombre de cèl·lules comptades per 10.

8. TALLS SEMIFINS I MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

8.1. Obtenció i processament de mostres

Les mostres destinades a ser estudiades a nivell ultraestructural (**medul·la espinal, arrels nervioses ventrals i arrels nervioses dorsals**) provenien d'animals perfundits seguint el mateix mètode que a l'apartat 7.1 (Pag. 41) amb la diferència que el fixador emprat es va preparar amb PFA a l'1% i glutaraldehid a l'1% en PB 1M ajustat a pH 7,4. Una vegada dissecades, les mostres van ser postfixades per immersió amb aquesta mateixa solució durant 24 hores i posteriorment amb tetròxid d'osmi a l'1% (EM Sciences, Fort Washington, USA) durant 2 hores. Transcorregut aquest temps, les mostres es van deshidratar i acte seguit van ser incloses en resina epoxi Embed 812 (EM Sciences) d'acord al procediment recomanat pel fabricant.

8.2. Obtenció de les seccions i tincions

A partir dels blocs realitzats, es van obtenir les seccions semifines (1 µm de gruix) que, una vegada tenyides amb blau de metilè (Merck, Darmstadt, Alemania), van ser reservades o bé per al seu estudi al microscopi òptic o bé per a seleccionar l'àrea d'interès per a ser estudiada a nivell ultraestructural. Una vegada escollida l'àrea, amb l'ultramicròtom (Reichert Ultracuts,

Leica) es van obtenir les seccions ultrafines (70-90 nm), que van ser recollides amb reixetes de coure i van ser contrastades amb acetat d'uranil i citrat de plom per a la seua posterior anàlisi.

8.3. Anàlisi dels resultats: Obtenció i processament d'imatges

La visualització de les seccions ultrafines es va realitzar amb l'objectiu d'immersió Olympus 60X/1'4 Plan Apo (Olympus) equipat amb una càmera digital (DMX 1200 Nikon). Per altra banda, l'anàlisi ultraestructural es va realitzar al microscopi electrònic (Zeiss EM 910, Oberkochen, Alemania).

Els estudis morfològics i la quantificació dels diferents paràmetres es van realitzar sobre imatges digitals utilitzant el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

9. WESTERN BLOT

9.1. Obtenció i preparació de les mostres

Aquesta tècnica es va realitzar per a quantificar diverses proteïnes d'interès en diferents mostres(medul·la lumbar, músculs de les potes posteriors i melsa). Els ratolins van ser sacrificats per decapitació i, ràpidament, es va extraure el material d'interès i es va congelar submergint-lo en nitrogen líquid. Per extraure i desnaturalitzar les proteïnes, els teixits es van transferir a un tub de centrífuga d'1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo Alemania) contenint 150 µl de SR 1X (2% SDS i 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) escalfat prèviament a 100ºC i suplementat amb inhibidors de proteasa (Sigma) i PhosSTOP (Roche). Amb l'ajuda d'una agulla 30G es va disgregar la mostra i es va escalfar a 100 ºC durant 5 minuts. Per desprendre's de les restes cel·lulars, les impureses i el DNA, es va centrifugar 5 minuts a 12000 rpm i el sobrenedant resultant de la separació es va transferir a un nou eppendorf.

9.1.1. Quantificació de concentració de proteïnes

Per quantificar la concentració de proteïna en les mostres es va realitzar un assaig colorimètric basat en el mètode d'unió a colorant descrit per Bradford [281]. Es va utilitzar el kit Micro DC protein assay (Bio-Rad). Seguint les recomanacions del fabricant, 3 µl de l'extracte de proteïnes es va incubar amb 25 µl del Reagent A i 200 µl del Reagent B durant 15 minuts en la foscor. Passat aquest temps, l'absorció de les mostres es va mesurar amb l'espectrofotòmetre (Bio-Rad) a una longitud d'ona de 595 nm. Amb l'ajuda d'una corba estàndard, prèviament preparada amb BSA i analitzada, es va calcular la concentració de proteïna a les mostres.

9.2. Electroforesi reductora en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)

Per separar les proteïnes d'acord al seu pes molecular, aquestes es van fer córrer a través d'un gel d'acrilamida seguint el principi postulat per Laemmli [282]. En primer lloc es van preparar els gels separadors a una concentració del 10% de bis-acrilamida (30%) (o bé del 12% quan la proteïna a separar tenia una mida inferior a 40 kDa, o bé del 7,5% quan era superior a 120 kDa). El gruix del gel va ser de 0,5 mm (o 1,5 mm quan es carregava més de 50 µg de preparació proteica). Ràpidament es va afegir isopropanol sobre el gel que era eliminat una vegada aquest polimeritzava. Acte seguit, es va incorporar el gel empilador, amb una concentració menor de bis-acrilamida (5%). Els dos gels contenien SDS (al 10%) i es van preparar amb tampó Tris, però diferien tant en la concentració d'aquest (1,5M per als gels separadors i 0,5M per als empiladors) com en el pH (8,9 i 6,5 respectivament).

A continuació es van carregar 15-20 µg (o 50 µg) de proteïna a cada pouet, prèviament suplementada amb tampó de càrrega SS 4X (20% sucrosa i 0,05% blau bromofenol, suplementat amb β-mercaptoetanol al 2%), i escalfada durant 3 minuts a 100ºC per assegurar la desnaturalització i facilitar la càrrega. A més, es van carregar 4 µl dels marcador MagicMarc XP i SeeBlue (Thermo Fisher, Waltham, USA) en diferents pouets per estimar el pes molecular i reconèixer les proteïnes a estudiar. Els gels es van córrer a una intensitat de 20 mA/gel en una càmera d'electroforesi (BioRad) utilitzant tampó *Running Buffer* (BioRad).

9.3. Transferència de les proteïnes a la membrana de polifluorur de viniliden (PVDF) per electrotransferència

Finalitzada la migració de les proteïnes a través del gel de poliacrilamida, aquestes van ser transferides a una membrana PVDF (Millipore, Bredford, USA), prèviament submergida en metanol un minut i rentada durant 5 minuts amb tampó *Transfer* (25 mM Tris, 190 mM glicina, 20% methanol, 0,1% SDS) per tal de realitzar posteriorment la detecció immunohistoquímica.

El mètode utilitzat va ser l'electrotransferència semi-seca. Per portar-lo a terme, es van apilar dos papers secants prèviament submergits en tampó *Transfer*, seguits de la membrana PVDF que coincidia amb les dimensions del gel de poliacrilamida (6 x 9 cm), a sobre d'aquesta el gel de poliacrilamida, i per finalitzar dos papers secants més. Una vegada construït el bloc (**Figura 19**) es van eliminar les possibles bombolles d'aire que podien quedar entre les diferents capes i tot el bloc va ser transferit a un aparell Novex Semi-Dry Blotter (Invitrogen), de manera que l'electrode negatiu quedara per sota de la membrana i el positiu sobre el gel. La transferència es va realitzar a un amperatge constant de 0,06 mA/gel durant 1 hora.

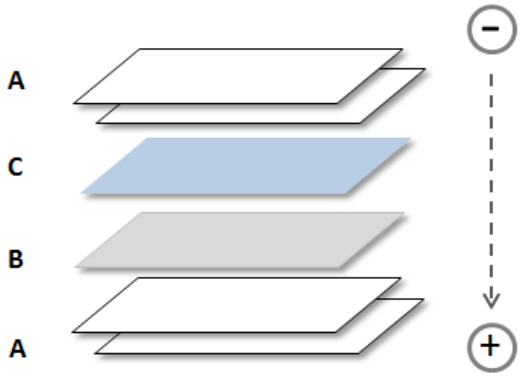


Figura 19. Esquema del bloc de transferència per al Western Blot. *En presència de tampó Transfer, el bloc es forma amb dos papers secants (A) seguits d'una membrana de PVDF prèviament submergida en metanol i rentada amb tampó Transfer (B) i del gel de poliacrilamida que conté les proteïnes a transferir (C), i dos papers secants més (A). La fletxa senyalitza la direcció de la transferència proteica.*

9.4. Detecció immunoquímica

Abans de la incubació amb els anticossos d'interès i per tal d'evitar senyals inespecífics, la membrana va ser bloquejada durant 1 hora amb solució de bloqueig que contenia un 5% de llet desnatada en Tampó TBST (20 mM Tris-HCl, 0,125 M NaCl, 0,1% Tween 20, ajustat a pH 8). A continuació, la membrana es va rentar amb TBST i es va incubar amb l'anticòs primari d'interès (**Apèndix 2**) a 4ºC durant 16 hores (overnight) en tampó d'incubació (0,25% de llet desnatada en TBST). Els anticossos contra β-actina i α-tubulina o contra GAPDH van ser utilitzats com a controls de càrrega en els extractes de medul·la espinal i melsa o múscul respectivament. Transcorregut aquest temps, es va eliminar l'excés d'anticòs no unit mitjançant dos rentats amb TBST (de 15 i 5 minuts) i una rentat de 10 minuts amb tampó d'incubació. Després, la membrana es va incubar amb el corresponent anticòs secundari unit a peroxidasa i diluït en tampó d'incubació. Acte seguit, es van realitzar una sèrie de rentats amb TBST (15 minuts, seguit de 10 minuts i 3 rentats extra de 5 minuts cadascun). Tots els passos es van realitzar en agitació suau i continua.

9.5. Anàlisi dels resultats

Els westerns blots van ser revelats mitjançant quimioluminiscència. Amb aquest fi es va utilitzar el kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Es van mesclar volums iguals dels reactius *Peroxide Solution* i *Luminol/Enhancer Solution* i es va dipositar uniformement sobre la membrana durant 5 minuts. L'excés de reactiu luminescent es va retirar i les membranes es van cobrir amb paper de transparència per retroprojecció i van ser revelades al ChemiDoc MP (Bio-Rad).

La imatge es va analitzar per densitometria amb el software ImageLab (Bio-Rad) per a avaluar la quantitat relativa i quantificar el resultat mitjançant densitat òptica.

10. CITOMETRIA DE FLUX

Per tal d'estudiar l'expressió de diversos antígens de superfície en les poblacions cel·lulars d'òrgans i teixits limfàtics mitjançant citometria de flux, va ser necessari disposar d'una suspensió de cèl·lules representativa de cada mostra.

10.1. Obtenció i preparació de les mostres

Els animals a estudiar van ser sacrificats per decapitació i ràpidament es van extraure les mostres d'interès: timus, melsa i moll de l'os. Per a l'obtenció d'aquest últim es va tallar la pota posterior i es va inserir una agulla de 30G en el fèmur, fent passar tampó de citometria preparat amb PBS 1X a l'1% de sèrum boví fetal (FBS, Gibco), de manera que la suspensió cel·lular es va recollir en un eppendorf que ràpidament va ser introduït en gel. Per a obtenir la suspensió cel·lular procedent del timus i la melsa va ser necessària la disgregació mecànica dels òrgans. Els òrgans van ser extrets dels animals i dipositats en una placa Petri situada sobre gel i contenint 1 ml de tampó de citometria i, ràpidament, es van disgregar amb la part esmerilada de dos portaobjectes. La suspensió cel·lular resultant recollida en un eppendorf es va centrifugar (900G, 5 minuts) i es va descartar el sobrenedant.

En el cas del timus, el pellet es va resuspendre en 1 ml de tampó de citometria. En canvi, per a l'anàlisi de la melsa i el moll de l'os es va haver de realitzar un procés d'hemòlisi necessari per eliminar els eritròcits, ja que són cèl·lules que presenten una alta autofluorescència. Amb aquest fi, les cèl·lules van ser sotmeses a un xoc osmòtic: es va afegir 900 µl d'aigua destil·lada i immediatament es va restablir l'osmolaritat amb 100 µl de PBS 10X. Finalment, es va centrifugar la suspensió cel·lular i es va decantar el sobrenedant de color rogenc fruit de la lisi dels eritròcits; el pellet resultant es va resuspendre en 1 ml de tampó de citometria.

10.2. Marcatge d'antígens de superfície

Després de realitzar el recompte cel·lular de cadascuna de les suspensions cel·lulars, es van dipositar 500.000 cèl·lules de cada mostra en eppendorfs i es va afegir 1 ml de tampó de citometria. Es van centrifugar i el pellet resultant va ser resuspés en 100 µl de solució de bloqueig (Fc Block [BD Biosciences, Franklin Lakes, USA] diluït 1:100 en tampó de citometria). El bloqueig va tenir una durada de 20 minuts i acte seguit es va rentar amb 1 ml de tampó de citometria. Després de centrifugar, el pellet es va resuspendre en 100 µl de tampó de

citometria, contenint la barreja d'anticossos primaris desitjada (**Apèndix 3**) i es va deixar incubar durant 20 minuts a temperatura ambient i en condicions de foscor.

Transcorregut aquest temps, es va rentar amb 1 ml de tampó de citometria per eliminar l'excés d'anticòs no unit i es va centrifugar. En els casos en que l'anticòs primari estava conjugat a un fluorocrom, es va resuspendre el pellet en 150 µl de tampó de citometria i es va mantenir a 4ºC i en foscor fins al moment de l'anàlisi. En els casos en que era necessària una tinció extra per a detectar l'antigen d'interès (quan l'anticòs primari era purificat o unit a biotina), les mostres van ser incubades amb tampó de citometria contenint els corresponents anticossos secundaris o estreptavidina (units a fluorocrom) a les concentracions corresponents. La incubació i el rentat van ser idèntics als realitzats amb els anticossos primaris.

La mort per apoptosi es va detectar utilitzant l'Annexin-APC (BD) tal i com recomana el fabricant. Les cèl·lules es van incubar amb 5 µl d'Annexin-APC en 100 µl de *Binding Buffer* 1x (BD) durant 15 minuts i en foscor. Posteriorment, es van rentar amb 1 ml de tampó de citometria i es van centrifugar, resuspenent el pellet resultant amb 400 µl de *Binding Buffer*. La lectura dels resultats va ser immediata (no deixant passar mai més d'una hora).

10.3. Anàlisi dels resultats

La lectura dels resultats es va realitzar al citòmetre FACS Canto II (BD Biosciences) que es disposa en la unitat de citometria de l'Institut IRBLleida. Les dades obtingudes van ser analitzades amb el programa FACSDiva software 6.1.3 (BD Bioscience).

11. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'estudi estadístic es va realitzar amb el programa GraphPad Prism 6. Els resultats s'expressen com la mitjana ± l'error estàndard (SEM). Les diferències entre grups van ser analitzades, bé aplicant el test "*Student's t test*" o bé el test estadístic '"*ANOVA one-way*". En tots els casos el valor de significació es va establir amb una $p < 0'05$.

IV. RESULTATS

CAPÍTOL I

CANVIS FENOTÍPICS EN EL RATOLÍ *Smn*$^{2B/-}$, COM A MODEL D'AME D'EVOLUCIÓ INTERMÈDIA

1. INTRODUCCIÓ

L'absència del gen homòleg humà *SMN2* en ratolins suposa la mort embrionària dels animals *Smn*$^{-/-}$ [35]. Mitjançant la introducció del transgen *SMN2* humà, dos grups van aconseguir superar la letalitat embrionària i produir animals amb AME severa *(Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$*),* els quals moren durant la primera setmana postnatal [152, 153]. La inserció addicional de l'al·lel SMN amb deleció de l'exó 7 sobre el fons genètic d'aquests ratolins amb AME severa va allargar l'esperança de vida a 14 dies, creant el model SMNΔ7 (*Smn*$^{-/-}$*; SMN2*$^{+/+}$*; SMNΔ7*$^{+/+}$*)* [154]. Aquests models han sigut extensament utilitzats en estudis dirigits a la identificació de característiques patològiques de l'AME i per al desenvolupament d'estratègies terapèutiques. No obstant, la severitat d'aquests models, posada de manifest per l'aparició de símptomes en etapes perinatals i pel ràpid deteriorament, dificulta les intervencions terapèutiques i la lectura dels resultats. A més, la vulnerabilitat del sistema neuromuscular varia àmpliament durant les primeres setmanes postnatals [283-285], de manera que es desconeix si els resultats positius existents i les noves intervencions terapèutiques provinents del treball amb aquests models serien equivalents al ser administrades en diferents estadis del desenvolupament. Per tant, aquests models podrien no ser totalment adequats per a testar compostos farmacològics potencialment beneficiosos per a pacients amb AME menys severa (de tipus II, III i IV). Per aquests motius, hi ha una necessitat urgent d'emprar un model d'AME que manifeste la malaltia en estadis més tardans i presente un curs temporal de la mateixa més prolongat. En aquest context, es va descriure un nova mutació sobre el gen murí *Smn* denominada 2B [159, 160] i generada per una substitució de 3 nucleòtids en l'exó 7. Aquest al·lel, quan es presenta conjuntament amb un al·lel nul (genotip *Smn*$^{2B/-}$*),* dóna lloc a ratolins que produeixen únicament un 30% dels nivells de proteïna FL-SMN de la que seria produïda pels animals sans. D'aquesta manera es va crear un model murí de fenotip intermig [271, 286, 287] que mimetitzava l'escenari donat en pacients amb AME, sense necessitat d'introduir exògenament el gen humà *SMN2*. Per altra banda, quan aquest al·lel es presenta de forma homozigota (*Smn*$^{2B/2B}$), o conjuntament amb un al·lel WT (*Smn*$^{2B/+}$*),* malgrat que la producció de proteïna FL-SMN es veu reduïda, els animals presenten un fenotip normal [158], demostrant que l'aparició de la malaltia depèn d'un llindar específic de proteïna FL-SMN.

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

El model murí *Smn*$^{2B/-}$ engloba i representa situacions més àmplies que es donen entre pacients amb AME, d'aquesta manera, constitueix una potent eina que permet realitzar una anàlisi més profunda sobre el desenvolupament, la progressió de la malaltia i les vies

moleculars patogèniques que tenen lloc prèviament a l'inici dels símptomes de la malaltia, així com la identificació de noves estratègies terapèutiques.

En aquest capítol, el principal objectiu és caracteritzar en detall el fenotip del model murí d'AME *Smn*$^{2B/-}$, la supervivència i les característiques histopatològiques del sistema neuromuscular.

3. RESULTATS

Els nivells insuficients de proteïna SMN provoquen debilitat muscular i alteracions motores.

El model murí *Smn*$^{2B/-}$ es presenta com un model menys sever d'atròfia muscular espinal, com a resultat d'una mutació de tres nucleòtids en l'exó 7 del gen *Smn* que altera l'*splicing* d'aquest gen. Com a conseqüència, el nivell de proteïna SMN es veu reduït donant lloc a l'aparició de la malaltia. En aquest capítol es va utilitzar com a control els ratolins *Smn*$^{2B/+}$ (WT d'ara en endavant), el fenotip dels quals és similar al dels animals WT [158].

Els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ (**Figura 20A**) van començar a presentar símptomes de patologia neuromuscular aproximadament a partir de la segona setmana de vida, tal i com es va posar de manifest per una notable debilitat física i tremolors. Aquest fenotip va quedar emfatitzat per un arrest en l'augment de pes observat a partir de P10 (**Figura 20B**) i una esperança de vida de ≈22 dies (**Figura 20C**). Curiosament, malgrat presentar els característics símptomes de la patologia neuromuscular, un dels animals malalts va sobreviure més enllà de P50, tal i com altres autors havien observat [158]. El motiu per explicar aquest augment en la supervivència d'un xicotet percentatge dels animals estudiats no és del tot clar, no obstant, podria ser en part degut a la presència de modificadors de la malaltia independents de l'SMN i/o a diferències en el fons genètic d'aquest animal, ja que els nivells d'SMN en la medul·la espinal dels animals malalts estaven, tal i com s'esperava, dràsticament reduïts per comparació als animals control, tal com es va evidenciar amb l'anàlisi proteica mitjançant Western Blot en extractes de medul·la espinal (**Figura 21**).

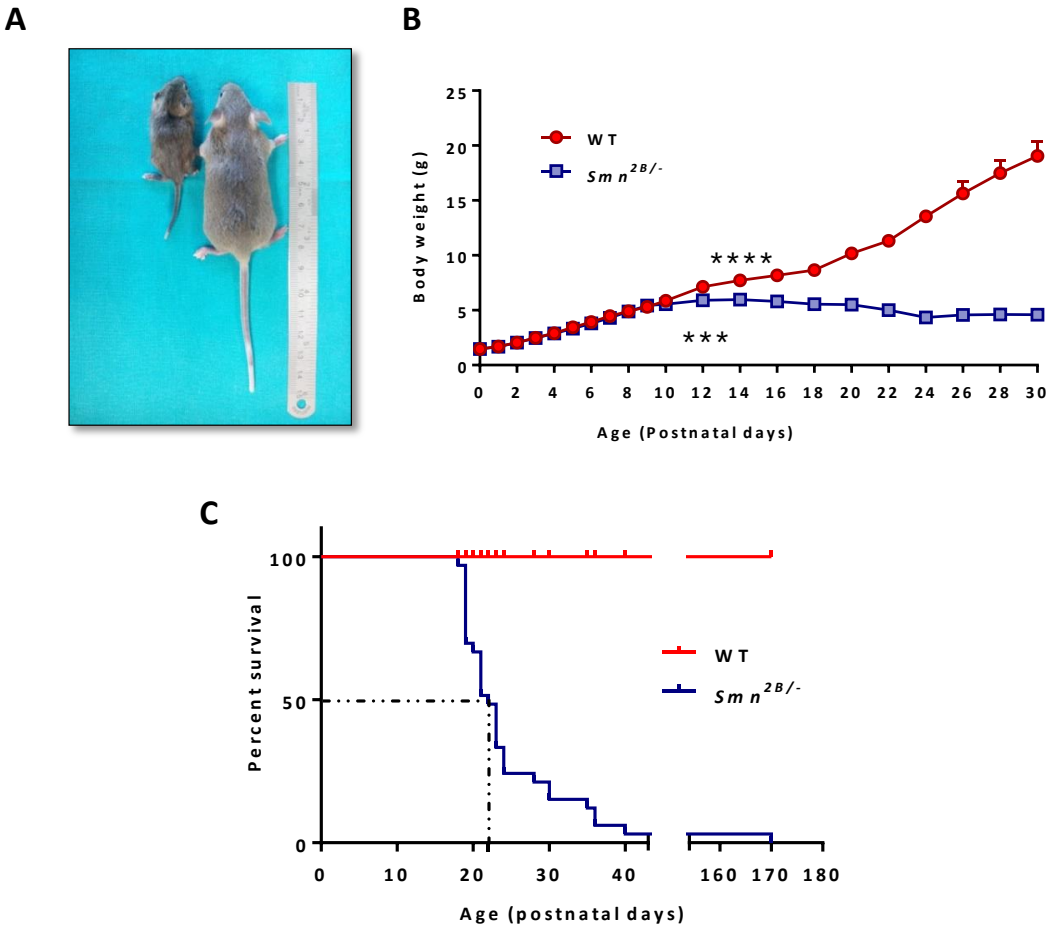


Figura 20. Afectació fenotípica del model murí d'AME. *(A) Imatge representativa d'un ratolí $Smn^{2B/-}$ (esquerra) i WT (dreta) de P30. (B) Pes corporal dels animals WT i $Smn^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. (C) Corba de supervivència del model murí $Smn^{2B/-}$. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01; n=33 animals per condició.*

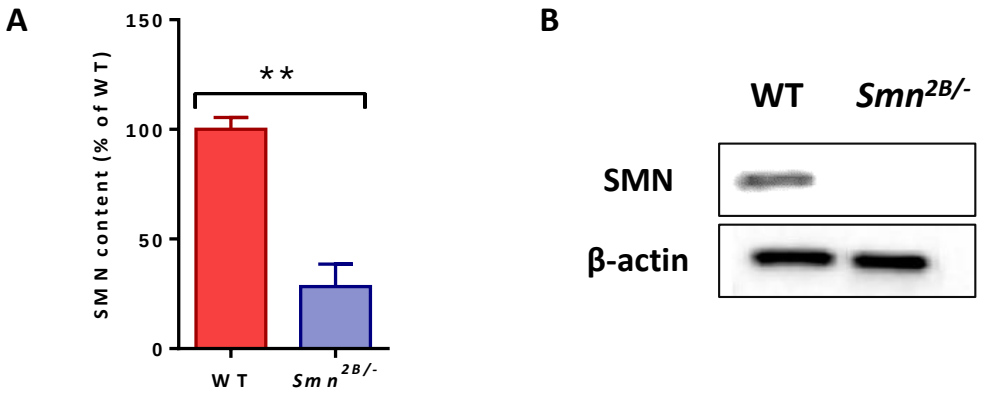


Figura 21. Disminució de la proteïna SMN en l'AME. *(A) Quantificació dels nivells d'SMN a la medul·la espinal d'animals P20 WT i $Smn^{2B/-}$ i (B) Western Blots representatius de la proteïna SMN i la β-actina com a control de càrrega. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01; n=3 animals per condició.*

Per tal d'aprofundir en la caracterització del fenotip de la malaltia, els ratolins van ser sotmesos a diverses proves conductuals al llarg de la seua vida, avaluant-se les habilitats motores i la progressió de la debilitat muscular. Tot i que els animals malalts no van mostrar diferències fins P10 en el pes corporal, es van realitzar proves motores des del dia del naixement per tal de detectar canvis que no quedaren reflectits en el pes dels animals. Així, es va portar a terme la prova del *Righting Reflex (*RR*)* i del *Tube Test (*TT*)*, analitzant en el cas de l'últim test tant el temps de latència de caiguda com la postura de les potes posteriors. En cap de les proves realitzades es van observar diferències significatives entre els animals *Smn*$^{2B/-}$ i els animals control (**Figura 22A-C**). A partir de P10, edat en la qual el TT deixa de poder realitzar-se sense veure's afectat per altres paràmetres mes enllà de l'alteració neuromuscular, es van portar a terme una sèrie de proves alternatives per seguir avaluant la capacitat motora. Per a examinar de forma general la coordinació i la força dels animals es va realitzar la prova del *Pen Test*. Tant la capacitat de tracció, representada per la puntuació obtinguda (nombre de potes que l'animal era capaç d'enganxar a la corda) com la força, representada pel temps que l'animal suportava sense caure, es van veure dràsticament disminuïdes a partir de P12 en els animals malalts (**Figura 22D-E**). A partir de P20 el reflex prènsil dels animals *Smn*$^{2B/-}$ va ser nul, no sent capaços de mantenir-se aferrats a la corda en cap dels punts posteriors analitzats. És més, els resultats del *Grip test* van ser similars, disminuint de manera significativa la màxima inclinació suportada pels animals malalts a partir de P14 i sent P20 l'últim punt en que els animals eren capaços de realitzar la prova (**Figura 22F**). Addicionalment, es va portar a terme el *Paw Print*, per obtenir el patró de marxa dels animals i avaluar de forma general la coordinació motora i si l'afectació era simètrica o si, en canvi, alguna de les extremitats es veia compromesa amb anterioritat a la resta. Per evitar esbiaixos deguts a la diferència de mida entre els animals controls i els animals malalts, i no a la pròpia neurodegeneració associada a l'AME, cadascuna de les mesures va ser dividida entre el pes del corresponent animal en cada punt de l'estudi. Degut a la curta edat dels animals, no es va poder obtenir un patró de marxa òptim fins P13, ja que en punts anteriors no era possible discernir entre petjades (**Figura 23F**). Per tant, el primer punt analitzat va ser P13, moment en el qual les ràtios obtingudes ja van mostrar diferències significatives entre els animals *Smn*$^{2B/-}$ i els animals control. La longitud de petjada de totes les extremitats tant de l'esquerra com de la dreta va ser significativament menor en els animals malalts, i no va ser distingibles entre elles, denotant una disfunció neuromuscular simètrica (**Figura 23**). Aquestes diferències es van mantenir fins P19, últim punt explorat, ja que en etapes més avançades de la malaltia els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ no eren capaços de caminar amb normalitat, no podent obtenir-se el patró de marxa per ser analitzat (**Figura 23H**).

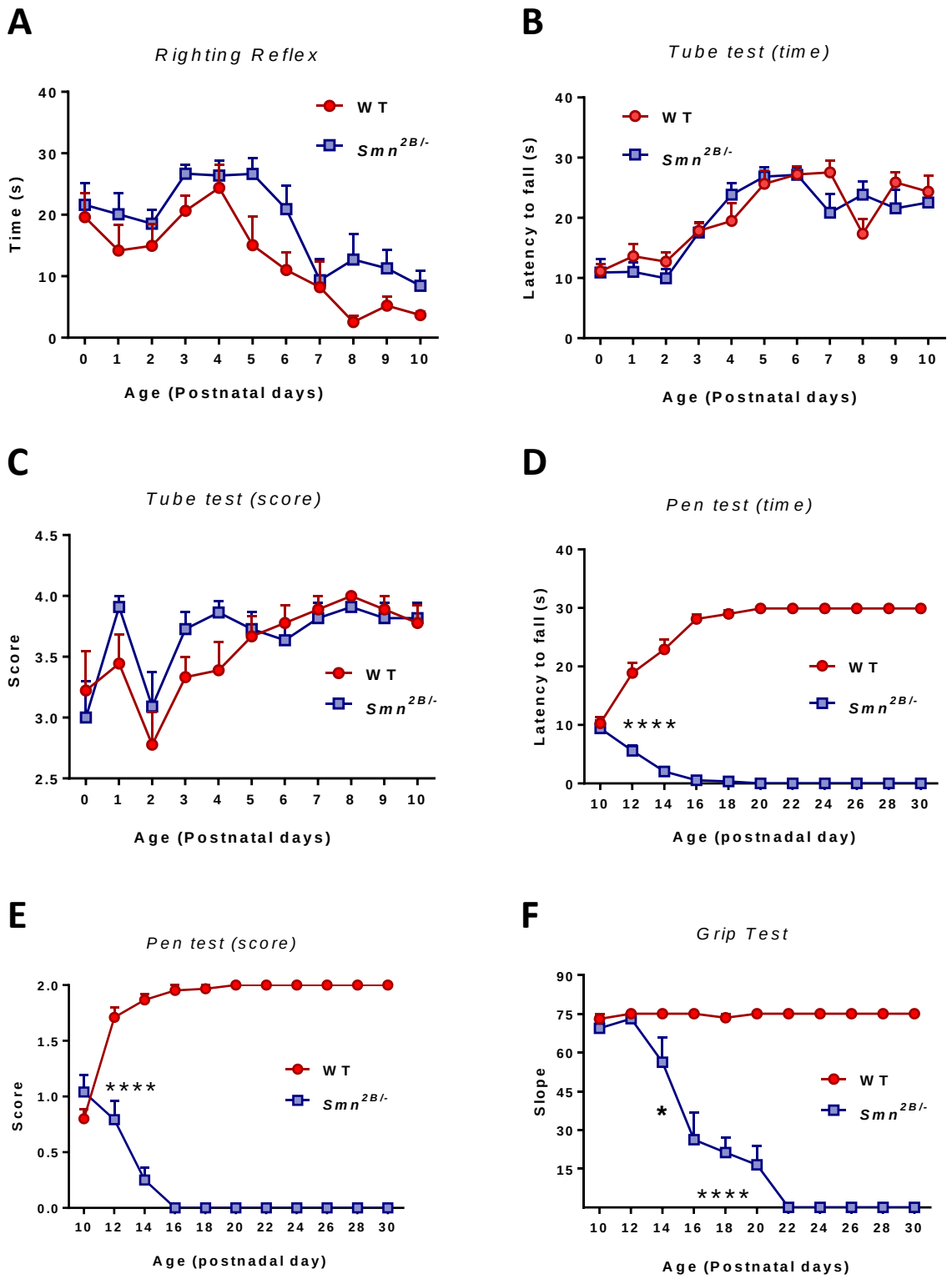


Figura 22. Comportament motor del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. *(A) Prova del Righting Reflex. (B-C) Prova del Tube test, analitzant el temps de caiguda (B) i la posició de les potes posteriors (C). (D-E) Prova del pen test, analitzant el temps de caiguda (D) i la puntuació obtinguda pels animals WT i Smn$^{2B/-}$ (E). (F) Prova del Grip Test. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05, ****p<0,0001; n=9-15 animals per condició i edat.*

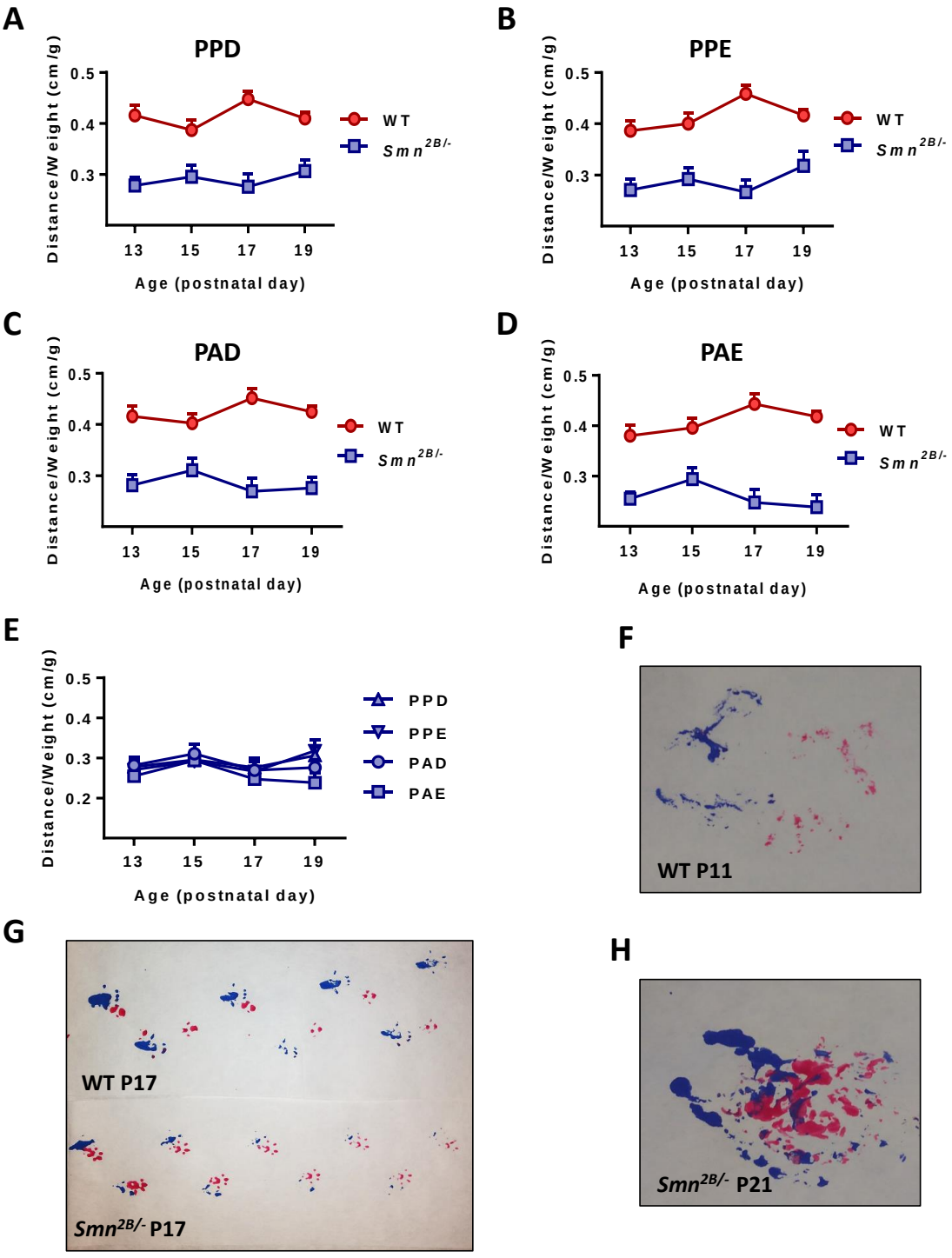


Figura 23. Prova del "Paw Print" del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. *(A-D) Distància de la petjada dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ de la pota posterior dreta (A), pota posterior esquerra (B), pota anterior dreta (C) i pota anterior esquerra (D). (E) Comparació de les distàncies de les quatre potes en els animals Smn$^{2B/-}$. (F) Paw print d'un animal WT de P11 impossible d'analitzar. (G) Patró de marxa d'un animal WT P17 i Smn$^{2B/-}$ P17. Paw print d'un animal Smn$^{2B/-}$ de P21 impossible d'analitzar. (H) n=9-15 animals per condició i edat.*

Pèrdua de motoneurones de la medul·la espinal en ratolins *Smn*$^{2B/-}$.

La pèrdua progressiva de motoneurones (MNs) s'ha considerat una característica patològica de l'AME, de manera que es va voler correlacionar la debilitat motora amb l'estat d'aquestes cèl·lules a la zona lumbar de la medul·la espinal. Amb aquest propòsit es va realitzar un comptatge de les MNs durant el curs de la malaltia en seccions de medul·la lumbar tenyides amb tionina o hematoxilina-eosina. Sorprenentment, a P5, edat en que no es van detectar diferències en el comportament motor, es va observar una disminució en el nombre de MNs de la medul·la espinal d'animal malalts quan es va comparar amb els comptatges d'animals sans. No obstant, aquesta reducció no va resultar significativa fins P10, moment en el qual la disminució del nombre de MNs en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ va ser del ≈30%, augmentant fins al ≈75% a P20 i mantenint-se aquest valor fins les últimes etapes de la malaltia (**Figura 24**).

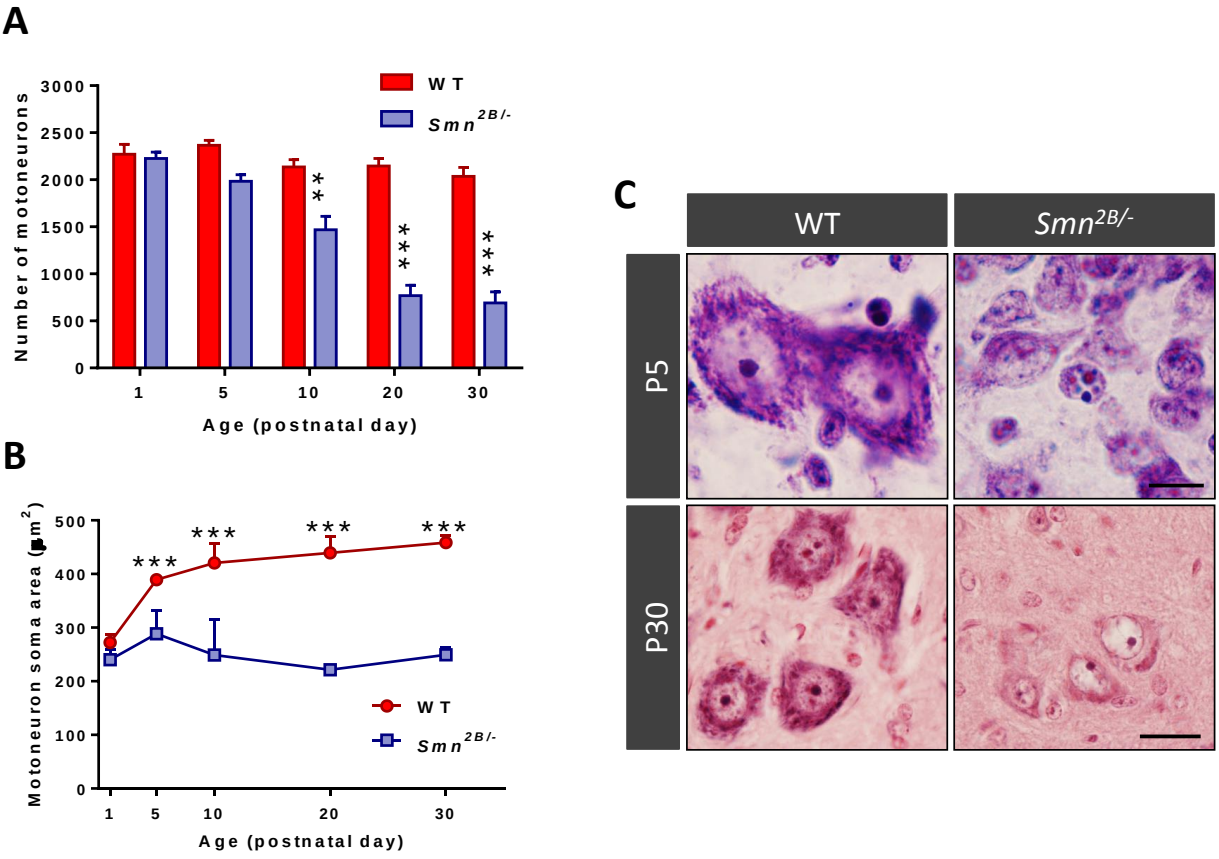


Figura 24. Afectació de les MNs en l'AME. *(A) Nombre de MNs aparentment sanes i (B) àrea del soma de les MNs en animals WT i Smn*$^{2B/-}$ *al llarg del curs de la malaltia. (C) Imatges representatives de les MNs de la banya ventral d'animals WT i Smn*$^{2B/-}$ *de P5 i P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01, ***p<0,001, n= 4-8 animals per condició i edat. Barra de calibració en (C)=10 µm per a P5, 25 µm per a P30.*

A més, es va avaluar el grau d'atròfia de les MNs aparentment sanes que romanien a la medul·la espinal. Amb aquest objectiu es va analitzar l'àrea d'aquestes cèl·lules durant el curs temporal estudiat. A P1, moment en el qual les MNs encara no són madures, els valors de les àrees van ser similars en els dos genotips. A P5, es va observar un augment de la mida de les MNs en ambdós grups, no obstant els animals sans presentaven un major increment de l'àrea que els ratolins afectats, detectant-se ja diferències significatives en aquest punt considerat presimptomàtic. A partir d'aquesta edat, les MNs dels animals *Smn*$^{2B/-}$ no sols no van incrementar la seua àrea, sinó que aquesta va disminuir, assolint a P10 una àrea d'aproximadament el 55% de la que presentaven les MNs dels animals control. Aquesta reducció en la mida de les MNs no es va veure pràcticament agreujada en els estadis finals de la malaltia.

Durant l'anàlisi dels resultats es van observar cèl·lules picnòtiques a P1 en la banya ventral de la medul·la espinal, tant en animals malalts com en animals sans. El nombre d'aquestes va disminuir dràsticament a P5, sent pràcticament inapreciables en edats més avançades (**Figura 25A**). No obstant, a P1 els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ van mostrar una major presència de picnòsis que els animals sans (p<0'001). El fet d'observar en els animals WT MNs amb aspecte picnòtic, característic de cèl·lules apoptòtiques, i tenint en compte l'edat primerenca, suggereix que podrien ser conseqüència del propi procés maduratiu de les MNs i del sistema neuromuscular que té lloc en aquesta etapa postnatal del desenvolupament [112, 113].

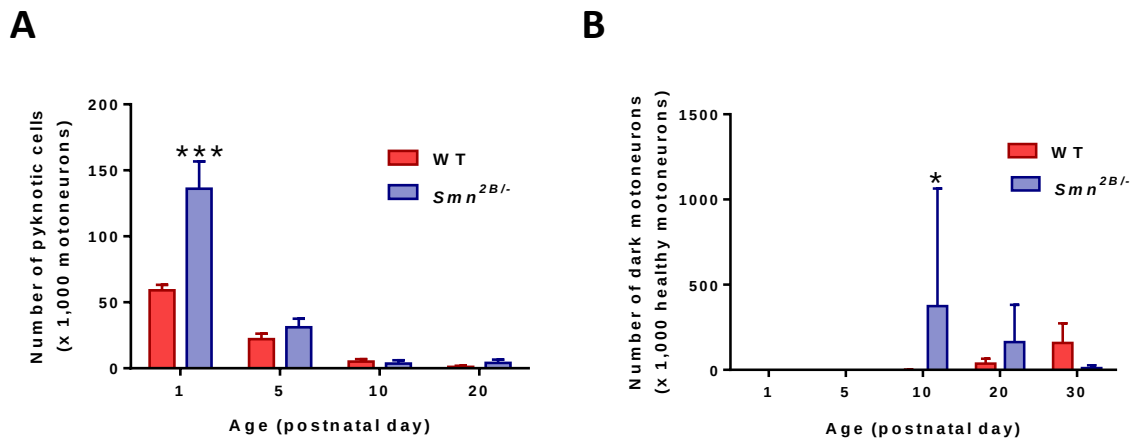


Figura 25. Alteració de les MNs en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Nombre de cèl·lules amb aspectes picnòtic i (B) "MNs fosques". L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, ***p<0,001, n= 4-8 animals per condició i edat.*

Per altra banda, es van observar cèl·lules que presentaven un citoplasma més intensament tenyit i en ocasions retret, però no mostraven la cromatina condensada característica de la mort per apoptosi (**Figura 25B**). Curiosament, aquestes cèl·lules, que pel seu aspecte van ser anomenades MNs *fosques*, van ser més notables en edats en les quals la presència de picnosis era pràcticament nul·la, amb un pic a P10, edat en la qual els ratolins malalts presentaven un increment significatiu respecte als animals control.

Pèrdua de MNs "*Fast*".

En diversos contextos tals com l'envelliment o en determinades malalties neurodegeneratives que cursen amb mort de MNs, com per exemple l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), s'ha descrit que un subgrup d'aquestes presenten una major vulnerabilitat front a la degeneració. Les MNs es classifiquen en funció de les propietats contràctils de les fibres extrafusals del múscul diana innervat. Així, es divideixen en tres grups: MNs de contracció ràpida fàcilment fatigables (FF), de contracció ràpida resistents a la fatiga (FR) i de contracció lenta resistents a la fatiga (S) [288]. Les MNs de tipus "*Fast*" innerven fibres musculars de contracció ràpida, les quals expressen isoformes específiques de les cadenes pesades de miosina: miosina de tipus IIA les MNs FR i de tipus IIB les MNs FF; mentre que les fibres innervades per MNs de tipus "*Slow*" expressen miosina de tipus I. Tenint en compte aquesta classificació, les MNs "*Fast*" són les que es veuen afectades en primera instància en l'ELA [289-291] i, a més, les més susceptibles a degenerar en l'envelliment [292, 293]. Amb l'objectiu d'esbrinar si aquesta vulnerabilitat d'un subgrup específic de MNs és una característica compartida amb l'AME, es va realitzar un comptatge d'aquelles MNs que expressaven la metaloproteinasa-9 (MMP-9), marcador exclusiu de les MNs "*Fast"* [294]. Inicialment es van estudiar els punts P1, P10 i P20. En els dos últims, els resultats van manifestar una disminució significativa del nombre de MNs marcades amb MMP-9 en els animals malalts quan van ser comparats amb els animals sans; en canvi, a P1 no es va trobar immunoreactivitat amb l'anticòs contra MMP-9 en cap dels dos genotips (dades no mostrades). De manera que es va decidir analitzar a l'expressió a P5, moment en el qual encara no s'havien observat diferències significatives en els comptatges del nombre total de MNs. En aquest punt ja es va observar una disminució estadísticament significativa de les MNs amb fenotip "*Fast"* (**Figura 26**), demostrant, per tant, que aquest subgrup de MNs es perd en etapes inicials de la malaltia i amb antelació a les MNs "*Slow"*.

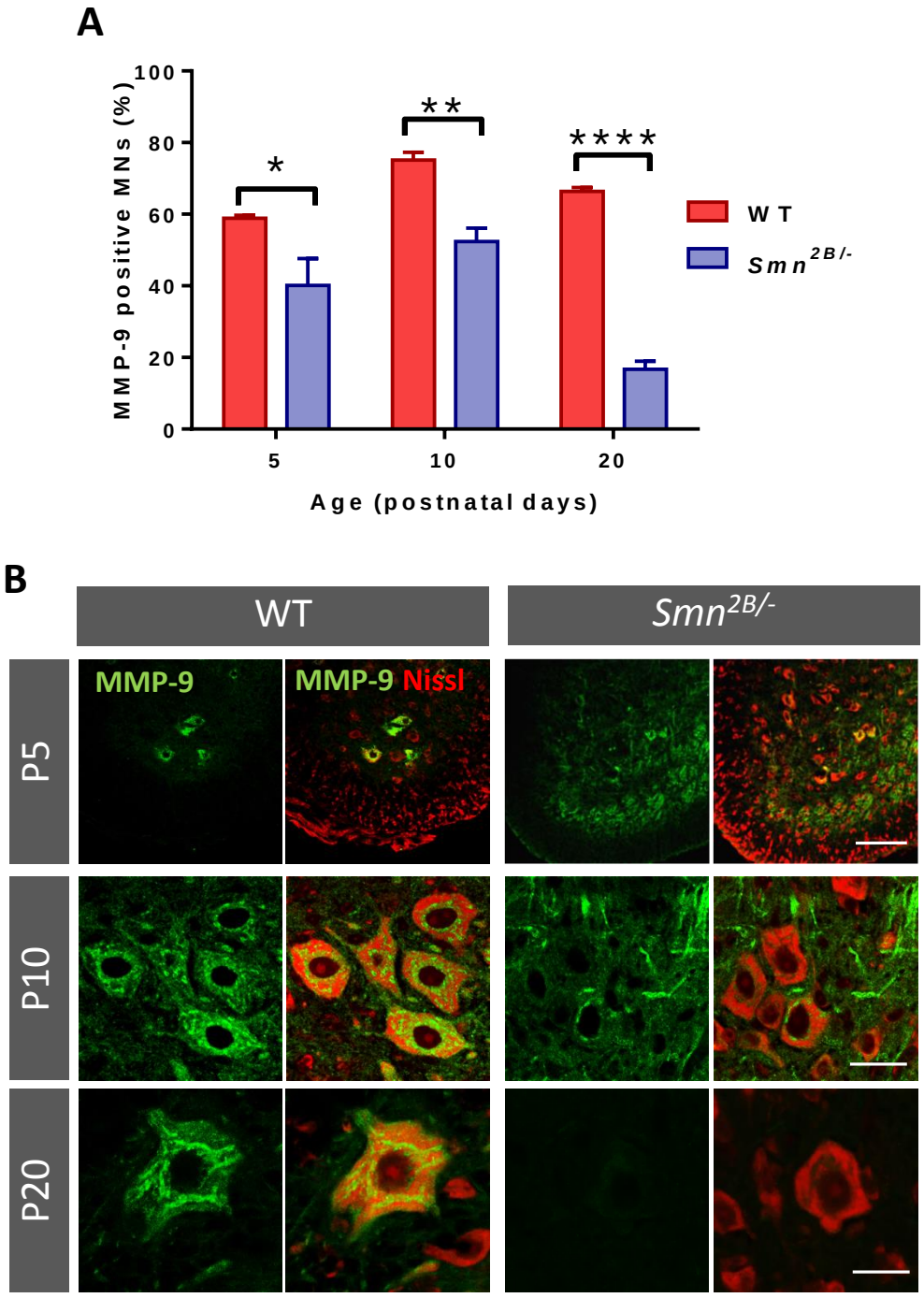


Figura 26. Afectació de les MNs "Fast" en l'AME. *(A) Percentatge de MNs que expressen MMP-9, marcador diferencial de les MNs "Fast" en la medul·la espinal de ratolins WT i $Smn^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives mostrant la immunofluorescència de la MMP-9 (verd) en MNs (marcades amb Nissl, roig) d'animals sans i malalts a P5, P10 i P20. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001; n=78-244 MNs de 3 animals per condició i edat. Barra de calibració en (B)=100 µm per a P5, 30 µm per a P10 i 20 µm per a P30.*

Canvis en l'arrel nerviosa ventral en el model murí *Smn*$^{2B/-}$.

Una de les hipòtesis que s'han suggerit per tal d'explicar la patologia de l'AME defensa que la malaltia avança de la part distal a la proximal, afectant-se les sinapsis i els axons en etapes prèvies a la pèrdua neuronal [120]. Per tant, per analitzar l'afectació a nivell axonal en el model murí *Smn*$^{2B/-}$, es va fer un estudi de l'arrel ventral L4, al llarg del curs temporal de la malaltia mitjançant seccions transversals tenyides amb blau de metilè (**Figura 27**).

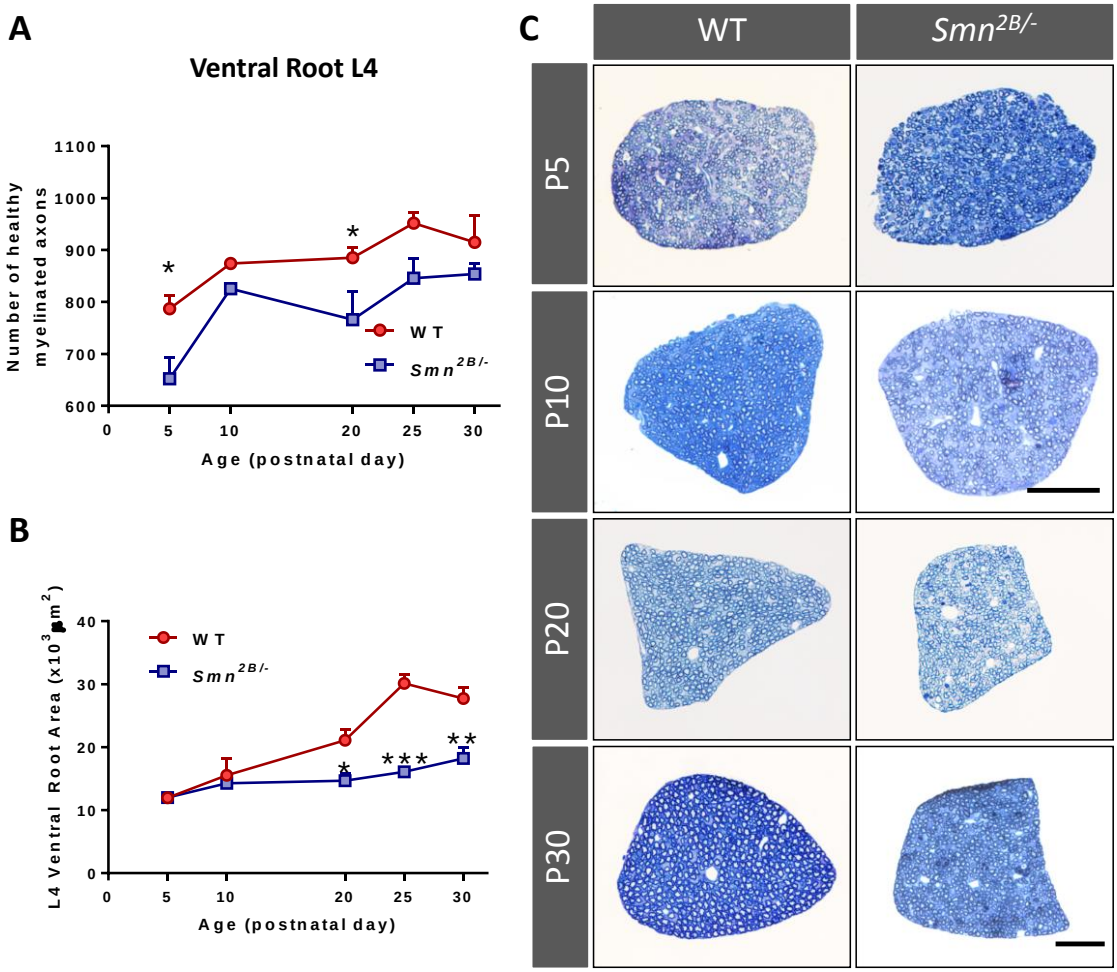


Figura 27. Afectació de l'arrel ventral L4 de la medul·la espinal en l'AME. *(A) Nombre total d'axons sans a l'arrel ventral d'animals WT i Smn*$^{2B/-}$ *al llarg del curs de la malaltia. (B) Àrea total transversal de l'arrel ventral L4. (C) Imatges representatives de seccions transversals de l'arrel ventral L4 tenyides amb blau de metilè d'animals WT i Smn*$^{2B/-}$*. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; n=3-5 animals per condició i edat. Barra de calibració=50 µm en (B).*

En el cas dels animals WT, el nombre d'axons sans mielinitzats va augmentar des de 790 a P5 fins ≈915 a P30. A més, l'àrea total de l'arrel (**Figura 27B**) i el diàmetre dels axons (**Figura 28**) van augmentar de manera progressiva al llarg del curs temporal estudiat, reflectint el procés maduratiu propi de l'edat.

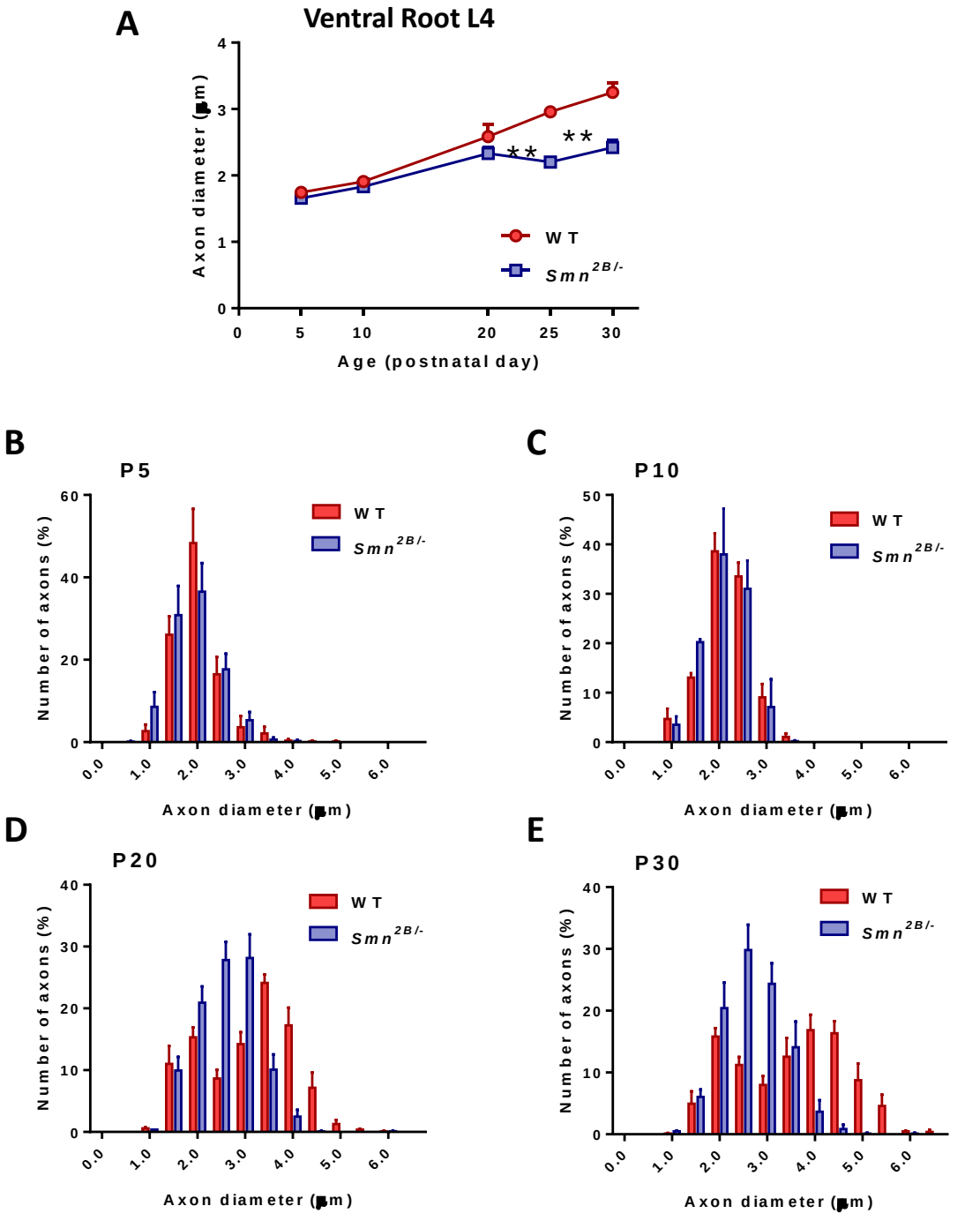


Figura 28. Alteració de la mida dels axons motors de l'arrel ventral L4 de la medul·la espinal en l'AME. *(A) Diàmetre dels axons de l'arrel ventral d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia i (B-E) freqüències relatives de la mida d'aquests, expressades com el percentatge del total d'axons. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01; n=250-300 axons de l'arrel ventral L4 obtingudes de 3-5 animals per condició.*

En tots els punts estudiats, els ratolins malalts van presentar un menor nombre d'axons sans mielinitzats, a més de valors menors tant de l'àrea de les arrels com del diàmetre dels axons per comparació als mostrats pels animals sans. La distribució de les freqüències relatives dels diàmetres dels axons va demostrar un desplaçament cap a axons de menor calibre en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ a mesura que progressava la malaltia. En el cas dels animals sans, a P30 es va visualitzar una corba bimodal, reflectint els axons provinents de MNs alfa, de major calibre, i de MNs gamma, de menor mida (**Figura 28E**). Quan es va estudiar la degeneració axonal, es va detectar la presència d'axons que presentaven un clar aspecte degeneratiu en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ a partir de P20 (**Figura 29**). Totes juntes, aquestes dades estarien indicant una atròfia i una degeneració dels axons provinents de les MNs-α dels animals malalts.

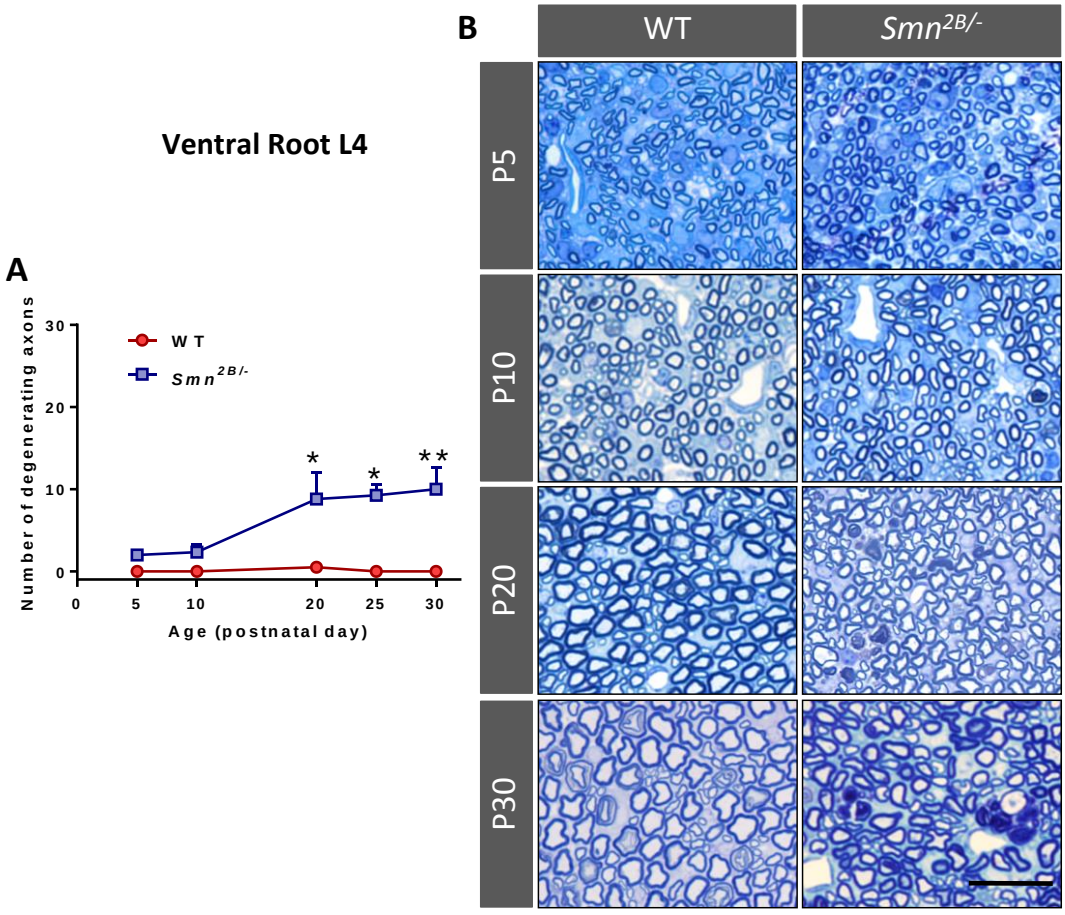


Figura 29. Degeneració dels axons motors de l'arrel ventral L4 de la medul·la espinal en l'AME. *(A) Nombre d'axons amb aspecte degeneratiu de l'arrel ventral L4 d'animals WT i Smn*$^{2B/-}$ *al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives de seccions transversals de l'arrel ventral L4 d'animals WT i Smn*$^{2B/-}$ *tenyides amb blau de metilè. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01; n=250-300 axons de l'arrel ventral L4 obtingudes de 3-5 animals per condició. Barra de calibració=20 µm en (B).*

A diferència de la mort neuronal (quantificada pel nombre de somes a la medul·la espinal), la qual va resultar significativa a partir de P10 en els animals malalts, la degeneració a nivell axonal (analitzada amb el microscopi òptic) no es va tornar evident fins P20. No obstant, a P5, va cridar l'atenció l'existència d'unes estructures que tenien aspecte de boles de mielina en els axons d'animals *Smn*$^{2B/-}$, i en menor mesura en els animals WT (fletxes negres a la **Figura 30B**).

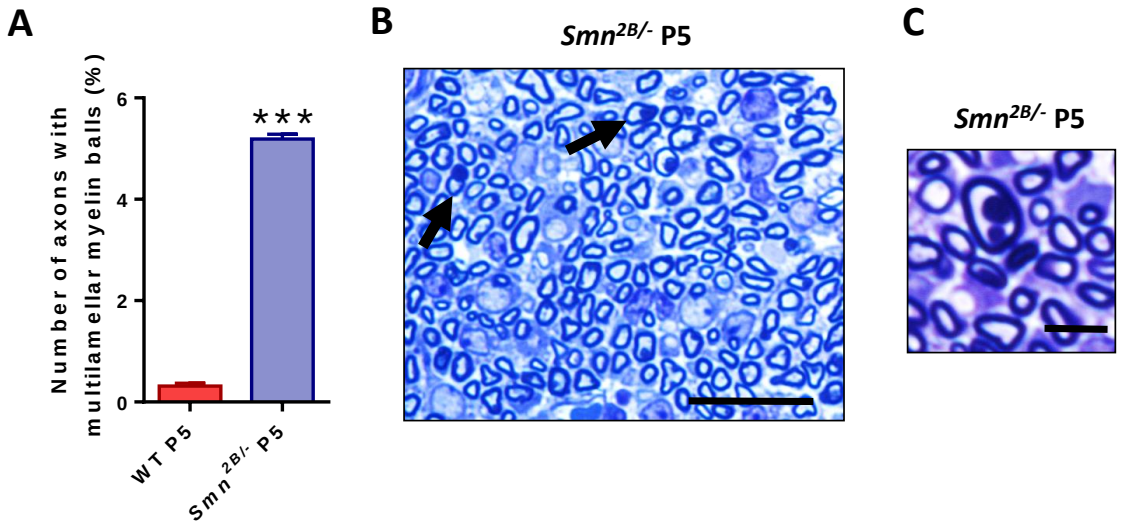


Figura 30. Patologia dels axons motors de l'arrel ventral L4 de la medul·la espinal en l'AME*. (A) Nombre d'axons que presenten inclusions de mielina en forma de boles a P5. (B-C) Imatges representatives de seccions transversals de l'arrel ventral L4 tenyides amb blau de metilè d'animals P5 Smn*$^{2B/-}$*. Les fletxes en (B) assenyalen les boles de mielina i en (C) es veu amb més detall. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test",***p<0,001; n=3-5 animals per condició. Barra de calibració=20 µm en (B) i 50 µm en (C).*

Per portar a terme un estudi més detallat d'aquesta edat, es va fer una anàlisi a nivell ultraestructural dels axons al microscopi electrònic. La majoria dels axons d'animals WT tenien una aparença sana, mentre que alguns dels axons de ratolins malalts presentaven una morfologia pròpia de la degeneració walleriana. No obstant, es va detectar algun cas de degeneració en els WT (fletxes grogues a la **Figura 31E-F**), possiblement degut a que l'estudi es va fer a P5, edat en que tenen lloc processos de remodelació nerviosa [71, 280]**.** Es va confirmar la presència d'inclusions de mielina, únicament en els axons de ratolins malalts, que per l'aspecte que presentaven es van denominar boles de mielina multilaminars (fletxes blaves a la **Figura 31F**). A diferència de les observacions del microscopi òptic, l'anàlisi ultraestructural va mostrar un augment significatiu de la mida dels axons motors del animals *Smn*$^{2B/-}$, els quals presentaven una major àrea i diàmetre (**Figura 31A-B**). A més, es va calcular la G-ràtio, indicador de l'estat estructural de mielinització [295]. Els animals malalts van presentar valors

més propers a 1, indicant un gruix de la capa de mielina menor que en el cas dels animals WT (**Figura 31C**). La disparitat dels resultats provinents de l'observació al microscopi òptic i a l'electrònic, podria ser deguda a que en el primer cas el diàmetre va ser calculat incloent la capa de mielina, mentre que aquesta no es va tenir en compte a l'anàlisi ultraestructural, de

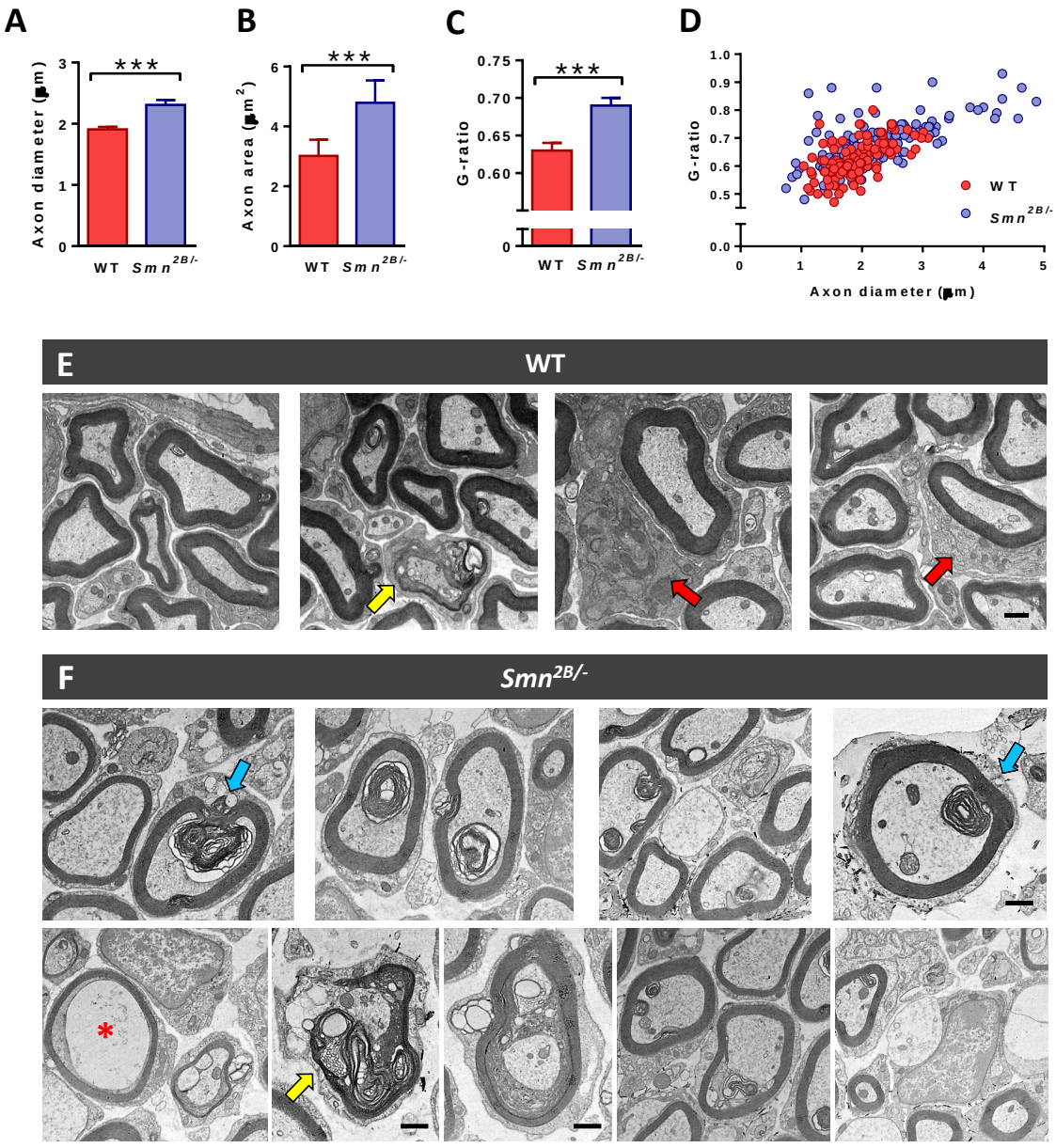


Figura 31. Estudi ultraestructural de la patologia dels axons motors de l'arrel ventral L4 de la medul·la espinal en l'AME. *(A) Diàmetre i (B) àrea dels axons de l'arrel ventral d'animals P5 WT i Smn$^{2B/-}$. (C) Valors de la G-ràtio i (D) gràfic de dispersió relacionant-se amb la mida dels axons. (E-F) Imatges representatives de l'estat dels axons d'animals P5 WT (E) i Smn$^{2B/-}$ (F). Les fletxes grogues indiquen axons degenerant, les fletxes roges assenyalen cèl·lules de Schwann i les fletxes blaves mostren inclusions de mielina; l'asterisc indica un axó inflat per la degeneració. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test",***p<0,001; n=3 animals per condició. Barra de calibració=1 µm en (E) aplicable a (F), excepte en els casos on s'indica específicament, corresponent a 0,5 µm.*

manera que les mesures axonals es van prendre per l'interior de la capa de mielina. Per tant, en el primer cas, els WT presenten una mida major ja que compten amb un major gruix de capa de mielina, mentre que si aquesta s'ignora els ratolins malalts mostren una major mida axonal, possiblement per tractar-se d'axons que estan degenerant i presenten una morfologia inflada i aberrant (asterisc roig a la **Figura 31F**). De fet, es van representar els valors individuals de la G-ratio per a cada axó en un gràfic de dispersió relacionant-los amb el diàmetre dels mateixos (**Figura 31D**), i es va observar que tots els axons dels animals *Smn*$^{2B/-}$ de major mida corresponien a valors de G-ratio majors (és a dir, a menor gruix de mielina) demostrant que aquests axons estarien degenerant. Per altra banda, es va observar una major organització i complexitat en els orgànuls de les cèl·lules de Schwann que envoltaven els axons dels animals sans (fletxes roges a la **Figura 31E**) .

Per completar i reforçar aquestes troballes, es va realitzar al microscopi òptic el mateix estudi de l'arrel ventral L5 a P30, etapa terminal de la malaltia en aquest model animal d'AME (**Figura 32**).

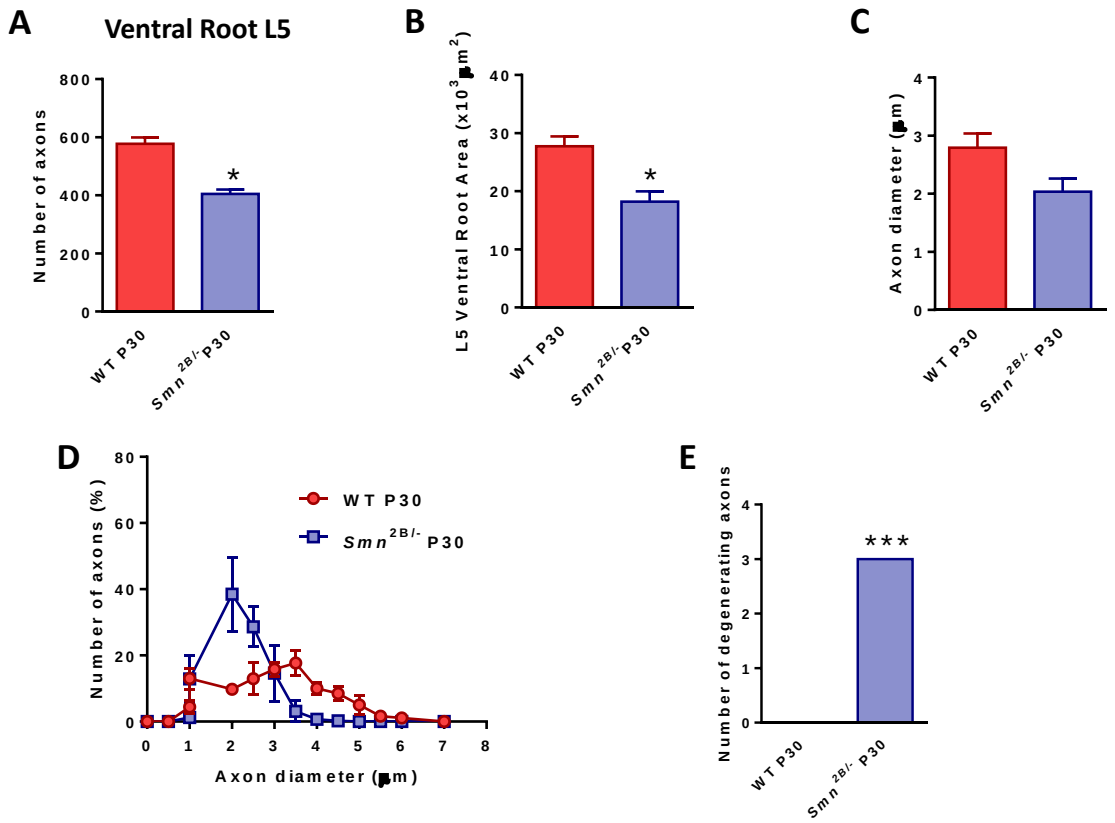


Figura 32. Afectació dels axons motors de l'arrel ventral L5 de la medul·la espinal en l'AME*. (A) Nombre d'axons sans de l'arrel ventral d'animals P30 WT i Smn*$^{2B/-}$*. (B) Àrea total transversal de l'arrel ventral. (C) Diàmetre dels axons de l'arrel ventral d'animals P30 WT i Smn*$^{2B/-}$ *i (D) freqüències relatives de la mida d'aquests, expressades com el percentatge del total d'axons. (E) Nombre d'axons amb aspecte degeneratiu en l'arrel*

*ventral L5 d'animals sans i malalts. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05; n=250-300 axons de l'arrel ventral L5 obtingudes de 3 animals per condició.*

Tant el nombre d'axons sans com l'àrea de l'arrel ventral es van veure significativament disminuïts en els animals malalts (**Figura 32A-B**). El diàmetre dels axons, malgrat no assolir diferències significatives, també es va trobar reduït, de manera que la corba bimodal que presentaven els animals WT no es visualitzava en els animals *Smn*$^{2B/-}$ com a conseqüència de l'atròfia dels axons de major calibre (**Figura 32C-D**). Únicament en els ratolins malalts es van observar axons amb fenotip degenerant, tal i com s'havia observat en L4 (**Figura 32E**).

Activació astroglial i microglial en la banya ventral de la medul·la espinal dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$.

Les cèl·lules glials presenten un paper clau en l'establiment, la funció, la plasticitat i l'eliminació de les sinapsis neuronals [180]. L'astroglia i la micròglia es tornen reactives durant el progrés de la malaltia, exhibint canvis tant a nivell morfològic com funcional. Diversos estudis defensen que aquestes cèl·lules estan implicades directament en la patologia de l'AME [183, 184]. Amb la intenció d'esbrinar si els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ presentaven canvis en la glia al llarg de la malaltia, es van realitzar tincions immunohistoquímiques sobre seccions de medul·la espinal de diferents edats amb anticossos contra GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), i IBA-1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), per marcar, respectivament, l'astroglia i la micròglia i es va analitzar la immunoreactivitat en la banya ventral, quantificant l'àrea relativa ocupada pels perfils positius per als marcadors utilitzats. Els resultats es van expressar com el percentatge de canvi de la immunoreactivitat que presentaven els animals malalts respecte als animals sans en les diferents edats estudiades. En el cas del GFAP, no es van observar diferències entre els animals sans i malalts a P10; a P20 és va observar un augment en la immunoreactivitat en la banya ventral dels animals *Smn*$^{2B/-}$, però aquesta astrogliosi no va ser significativa fins P30 (**Figura 33**). Pel que fa a la microgliosi, no es van observar canvis a P10, mentre que a P20 les cèl·lules microglials marcades amb l'anticòs contra IBA-1 es van veure duplicades en els animals malalts en comparació dels ratolins WT; a P30 la presència de perfils positius al voltant de les MNs va continuar sent estadísticament major, tot i que no va assolir valors tan elevats com a P20 (**Figura 34).**

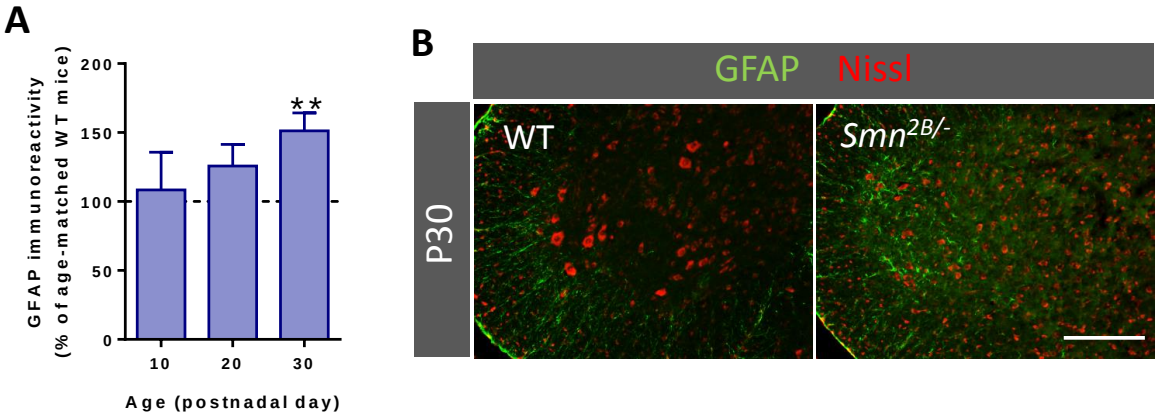


Figura 33. Reacció astroglial en la medul·la espinal en l'AME. *(A) Percentatge de canvi de la immunoreactivitat a l'anticòs GFAP que presenten els animals Smn$^{2B/-}$ respecte als WT al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal. (B) Imatges representatives de la reacció astroglial al voltant de les MNs (marcades amb Nissl, roig) en seccions de medul·la espinal immunomarcades amb l'anticòs GFAP (verd) d'animals sans i malalts de P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,001; n=15-48 seccions de medul·la espinal obtingudes a partir de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=200 µm en (B).*

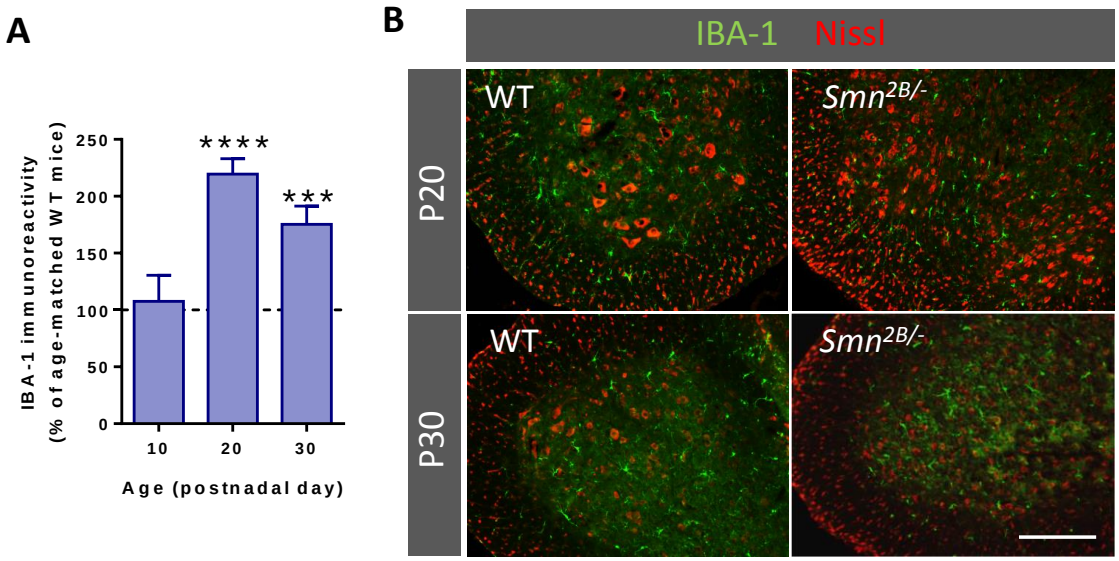


Figura 34. Reacció microglial en la medul·la espinal en l'AME. *(A) Percentatge de canvi de la immunoreactivitat a l'anticòs IBA-1 que presenten els animals Smn$^{2B/-}$ respecte als WT al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal. (B) Imatges representatives de la reacció microglial al voltant de les MNs (marcades amb Nissl, roig) en seccions de medul·la espinal immunomarcades amb l'anticòs IBA-1 (verd) d'animals sans i malalts de P20 i P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ***p<0,001, ****p<0,0001; n=13-28 seccions de medul·la espinal obtingudes a partir de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=200 µm en (B).*

En les edats en les quals la reacció microglial era evident, va cridar l'atenció la presència d'estructures que envoltaven els somes de les MNs dels animals *Smn*$^{2B/-}$ a les seccions de medul·la espinal tenyides amb hematoxilina-eosina (**Figura 35**). Aquestes estructures semblaven ser nuclis, possiblement de cèl·lules microglials que estaven exercint el seu paper bé en la fagocitosi de les MNs degenerants o bé en el procés d'*stripping* (mecanisme pel qual la micròglia contacta físicament amb la MN i s'interposa entre aquesta i els terminals nerviosos aferents per a la seua desconnexió i eliminació de les sinapsis centrals [296]).

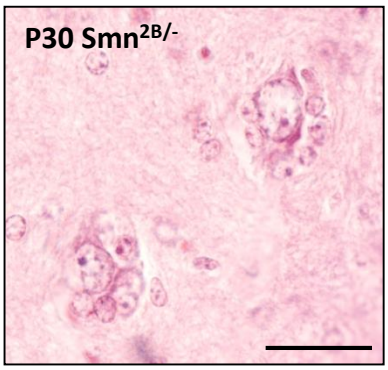


Figura 35. Perfils nuclears possiblement de micròglia al voltant de MNs degenerants en els animals Smn$^{2B/-}$ a P30. *Barra de calibració=25 µm.*

Canvis en els ínputs aferents de les MNs de la medul·la espinal en ratolins *Smn*$^{2B/-}$.

En diversos models d'AME s'han descrit alteracions en la connexió sensoriomotora i en les sinapsis aferents glutamatèrgiques [115, 163, 164, 173-176]. Per estudiar si hi havia una correlació entre els canvis en la reacció glial, la presencia de nuclis possiblement de cèl·lules glials al voltant de les MNs i les sinapsis aferents a aquestes en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$, es va quantificar el nombre de sinapsis excitadores glutamatèrgiques i inhibidores GABAèrgiques que estaven en contacte amb el soma de les MNs. Es va realitzar un immunomarcatge amb fluorescència utilitzant anticossos contra VGluT1 (*Vesicular glutamate transporter 1*) i VGAT (*Vesicular GABA transporter*) en combinació amb la tinció de Nissl per identificar les MNs. Els resultats es van expressar com el percentatge de canvi del nombre d'aferències que presentaven els animals malalts respecte als animals sans en les diferents edats estudiades. A P10, es va detectar que el nombre d'aferències excitadores glutamatèrgiques, marcades amb l'anticòs contra VGluT1, era similar en els animals WT i en els *Smn*$^{2B/-}$, mentre que a P20 es van veure significativament reduïdes en els ratolins amb AME, assolint el màxim nivell de reducció a P30 (**Figura 36**)**.** En el cas dels botons inhibidors GABAèrgics, marcats amb l'anticòs contra VGAT, es van observar nivells similars en les dos condicions a P10 i P20, mentre que a P30 la disminució de les sinapsis inhibidores va ser estadísticament significativa en l'AME (**Figura 37**).

Per minimitzar l'efecte de la variació en la mida de les MNs analitzades i evitar que qualsevol possible diferència fóra conseqüència de la menor mida de les MNs dels animals malalts, es va calcular la densitat sinàptica normalitzant el nombre de sinapsis per cada 100 unitats de longitud del perímetre de la MN (nº botons/ 100µm). Els resultats obtinguts van ser similars als observats en l'anàlisi del nombre absolut, amb els mateixos nivells de significació.

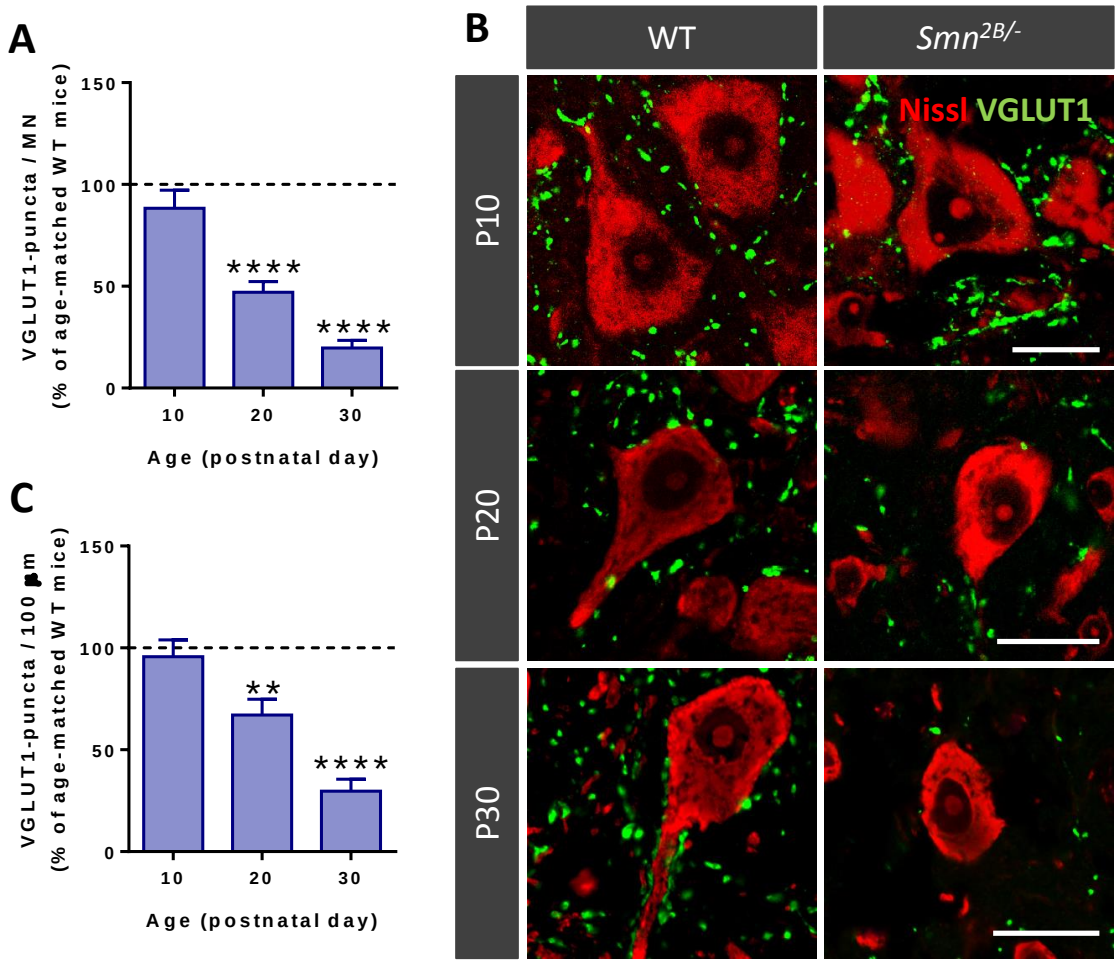


Figura 36. Afectació de les sinapsis glutamatèrgiques en l'AME. *(A) Percentatge de canvi del nombre absolut de sinapsis positives per a VGluT1 que estan en contacte amb cada MN en els animals Smn$^{2B/-}$ respecte als WT. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl fluorescent (roig) d'animals sans i malalts mostrant inputs glutamatèrgics marcats amb l'anticòs contra VGluT1 (verd). (C) Percentatge de canvi de la densitat sinàptica dels animals malalts respecte als sans, expressada com el nombre de sinapsis per 100 µm de perímetre. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01, ****p<0,0001; n=35-55 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (D) per a edats P10 i P20 i 30 µm per a P30.*

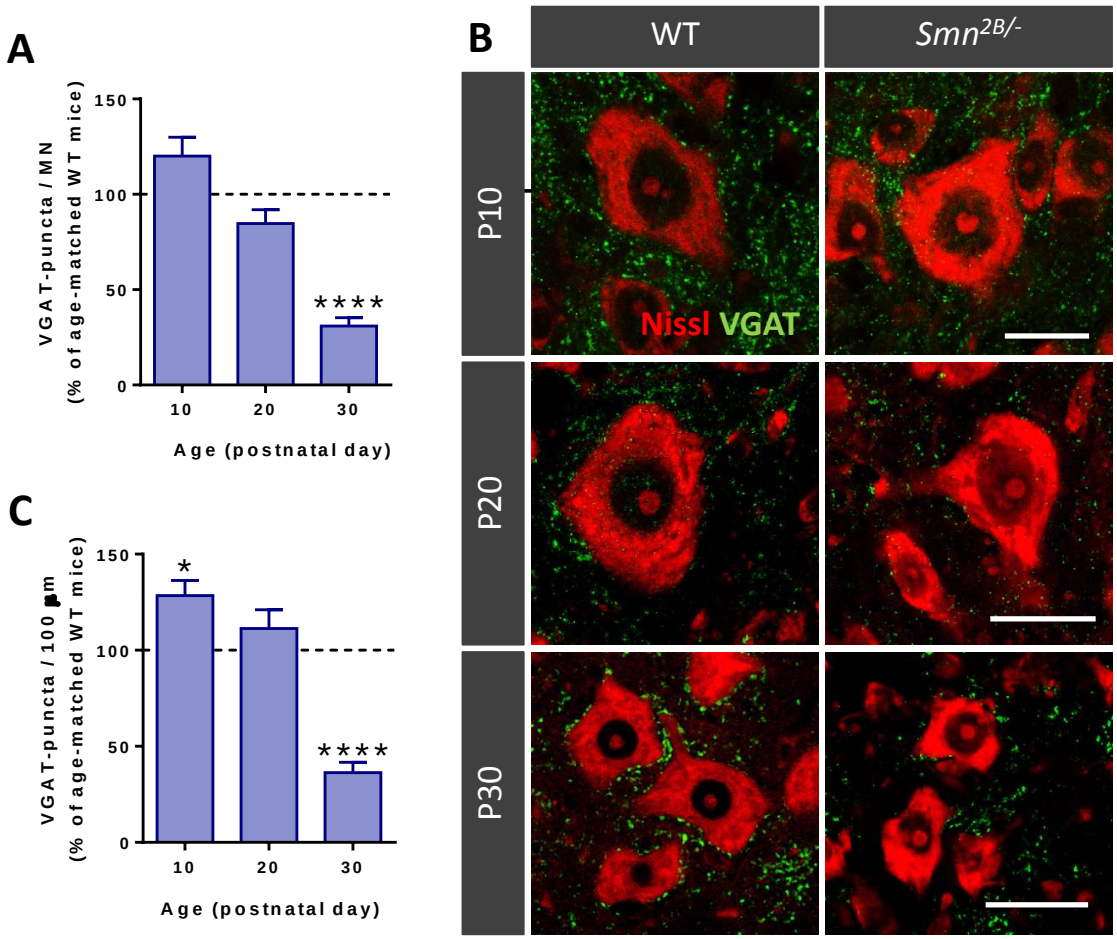


Figura 37. Afectació de les sinapsis gabaèrgiques en l'AME. *(A) Percentatge de canvi del nombre absolut de sinapsis positives per a VGAT que estan en contacte amb cada MN en els animals Smn$^{2B/-}$ respecte als WT. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl fluorescent (roig) d'animals sans i malalts mostrant inputs GABAèrgics marcats amb l'anticòs contra VGAT (verd). (C) Percentatge de canvi de la densitat sinàptica dels animals malalts respecte als sans, expressada com el nombre de sinapsis per 100 µm de perímetre. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05, ****p<0,0001; n=31-52 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (D) per a edats P10 i P20 i 30 µm per a P30.*

Tot junt estaria indicant que, les MNs dels ratolins *Smn$^{2B/-}$* són capaces de rebre sinapsis centrals durant el desenvolupament postnatal, i aquestes no presenten diferències en quant a abundància comparades amb els animals WT en les etapes inicials de l'AME. No obstant, a mesura que la malaltia progressa, les diferents sinapsis es van perdent, quedant les MNs pràcticament desprovistes d'aferències a P30. Caldria remarcar que, les aferències excitadores positives per a VGluT1 són les que primerament es van veure afectades.

Degeneració cel·lular al gangli de l'arrel dorsal i afectació de l'arrel nerviosa dorsal L4 en el model murí d'AME *Smn$^{2B/-}$*.

L'AME s'ha considerat una malaltia de la motoneurona, de manera que la majoria de la investigació s'ha centrat en la pròpia MN i en les sinapsis que aquestes cèl·lules estableixen amb el múscul esquelètic (unions neuromusculars, NMJs). No obstant, en la medul·la espinal, les MNs reben ínputs de diferent origen, com per exemple els procedents de les interneurones i de les neurones sensorials del gangli de l'arrel dorsal.

Partint de l'observació que les sinapsis glutamatèrgiques es trobaven afectades als ratolins *Smn$^{2B/-}$* a P20, es va proposar l'estudi del gangli de l'arrel dorsal (DRG), així com dels axons de l'arrel nerviosa dorsal, amb la intenció d'analitzar si aquesta alteració en la connexió sinàptica anava acompanyada d'una afectació de les neurones propioceptives del DRG, les quals són les responsables de les aferències primàries glutamatèrgiques que reben les MNs, i que poden ser detectades amb el marcatge amb l'anticòs contra VLGUT1 [297-299].

En primer lloc, utilitzant animals P20, moment en que l'afectació sinàptica ja era notable, es va fer un estudi general de la mida dels somes neuronals del DRG L4. Es van realitzar comptatges a partir de seccions de criòstat del DRG tenyides amb Nissl per marcar les neurones. Els animals malalts van mostrar somes de menor mida en comparació als ratolins sans (**Figura 38**), evidenciant una afectació del DRG en l'AME.

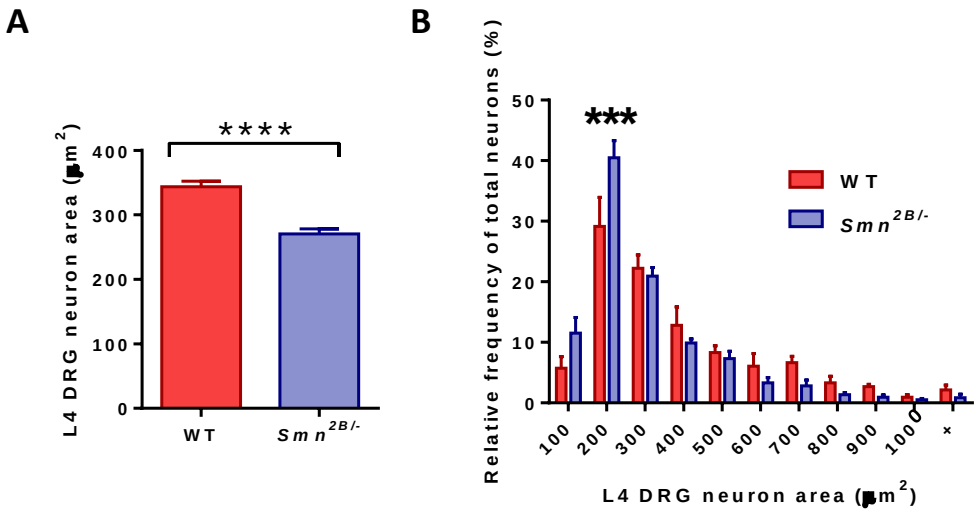


Figura 38. Estudi del gangli de l'arrel dorsal (DRG) L4 de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Àrea de les neurones del DRG i (B) freqüències relatives de l'àrea d'aquestes, expressades com el percentatge del total de neurones. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ****p<0,0001; n=632-749 neurones comptades a partir de 21-26 seccions del DRG obtinguts de 4 animals per condició.*

D'acord amb propietats citoquímiques específiques és possible distingir entre l'heterogènia població neuronal del DRG [300, 301]. El CGRP està present en neurones peptidèrgiques sensorials primàries nociceptives les quals són de mida petita i no mielinitzades. L'isolectina IB4 també és un marcador per a neurones sensorials de menor mida i no mielinitzades, però es troba únicament en neurones no peptidèrgiques. La parvalbúmina (PV), en canvi, marca neurones sensorials propioceptives de mida gran i que innerven els fusos musculars. Aquests marcadors van ser emprats per distingir i estudiar les diferents subpoblacions neuronals del DRG mitjançant l'immunomarcatge de crioseccions del DRG.

La quantificació del nombre de neurones del DRG que expressaven CGRP i IB4 en el segment L4 no va revelar canvis significatius en l'AME (**Figura 39A** i **Figura 40A**); no obstant, l'àrea d'aquestes subpoblacions específiques de neurones es va veure significativament reduïda en els animal malalts (**Figura 39B** i **Figura 40B**). Pel contrari, les neurones dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ immunoreactives per a la PV no van mostrar atròfia (**Figura 41B**), però el nombre d'aquesta subpoblació neuronal sí que va ser significativament inferior (reducció del ≈45% respecte als WT) (**Figura 41A**), demostrant una afectació de les neurones propioceptives del DRG en l'AME.

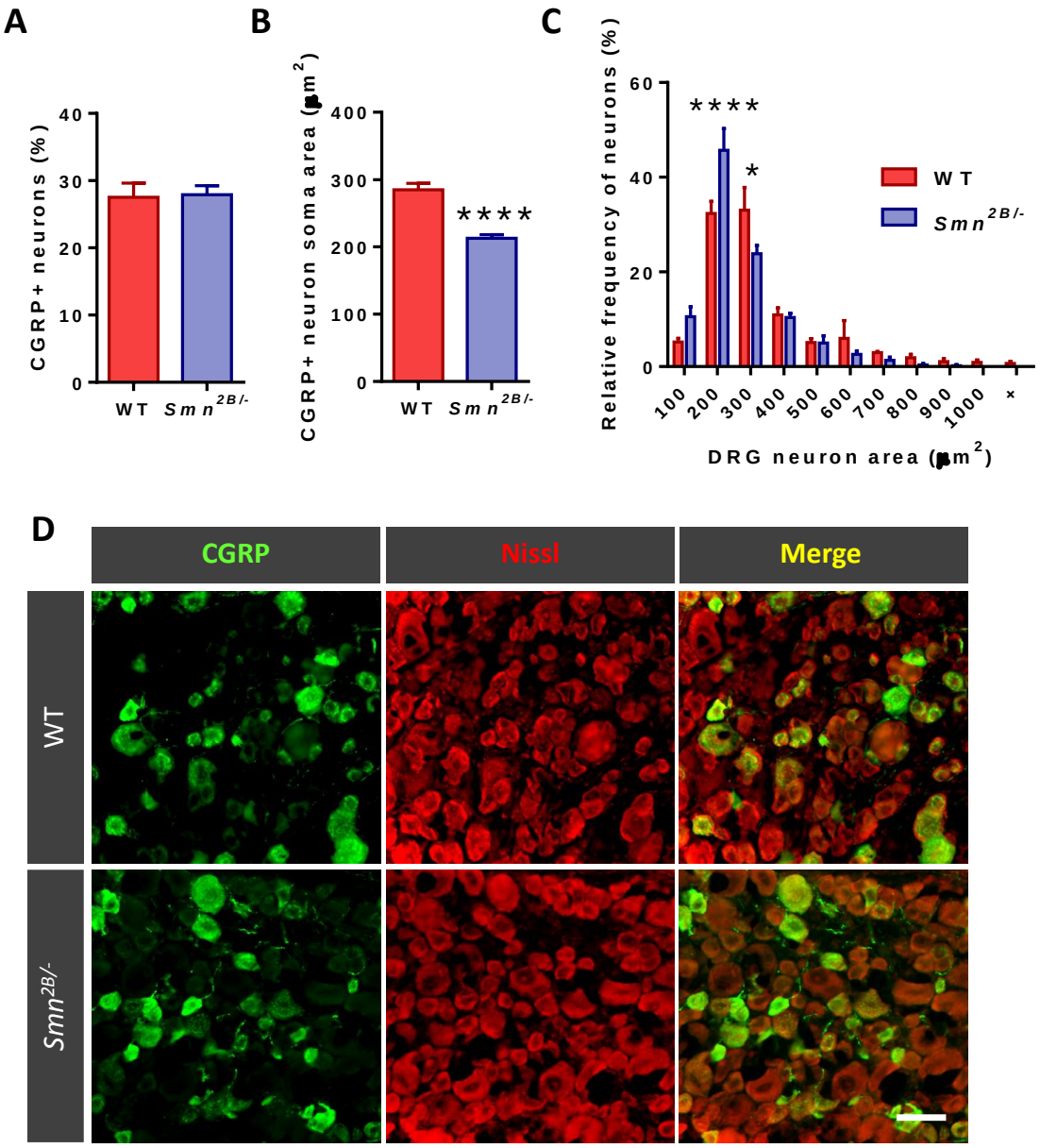


Figura 39. Estudi de la subpoblació neuronal del gangli de l'arrel dorsal (DRG) positiva per a CGRP. *(A) Percentatge de neurones immunoreactives al CGRP del DRG L4 de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$ i àrea d'aquestes (B). (C) Freqüències relatives de l'àrea de les neurones positives per al CGRP, expressades com el percentatge del total de neurones. (D) Imatges representatives de seccions del DRG mostrant la immunofluorescència al CGRP (verd) en les neurones marcades amb Nissl (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05; n=410-619 neurones comptades en 21-26 seccions del DRG obtinguts de 4 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (D).*

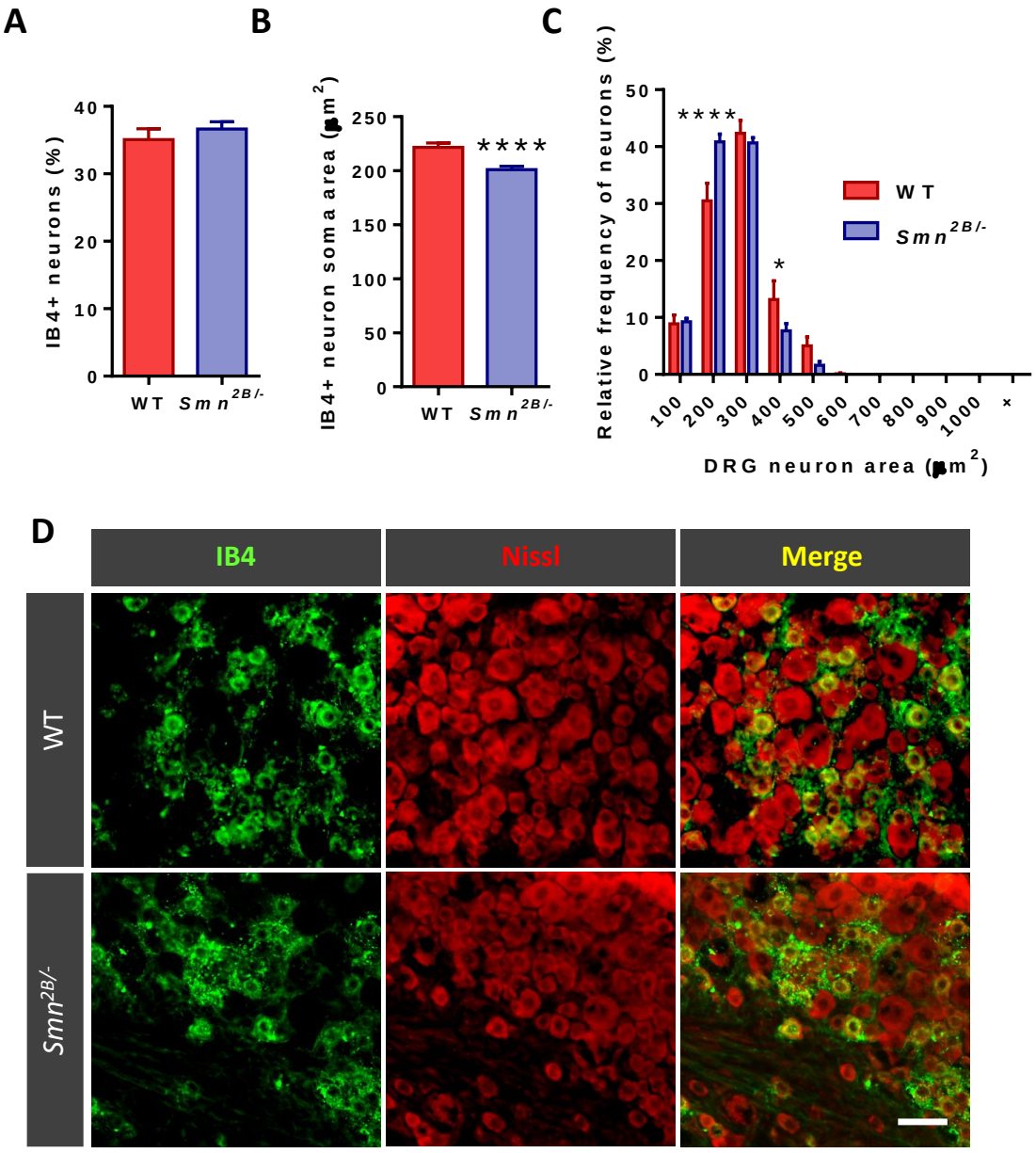


Figura 40. Estudi de la subpoblació neuronal del gangli de l'arrel dorsal (DRG) positiva per a isolectina IB4. *(A) Percentatge de neurones immunoreactives a la IB4 del DRG L4 de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$ i àrea d'aquestes (B). (C) Freqüències relatives de l'àrea de les neurones positives per a IB4, expressades com el percentatge del total de neurones. (D) Imatges representatives de seccions del DRG mostrant la immunofluorescència d'IB4 (verd) en les neurones marcades amb Nissl (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05; n=410-619 neurones comptades en 21-26 seccions del DRG obtinguts de 4 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (D).*

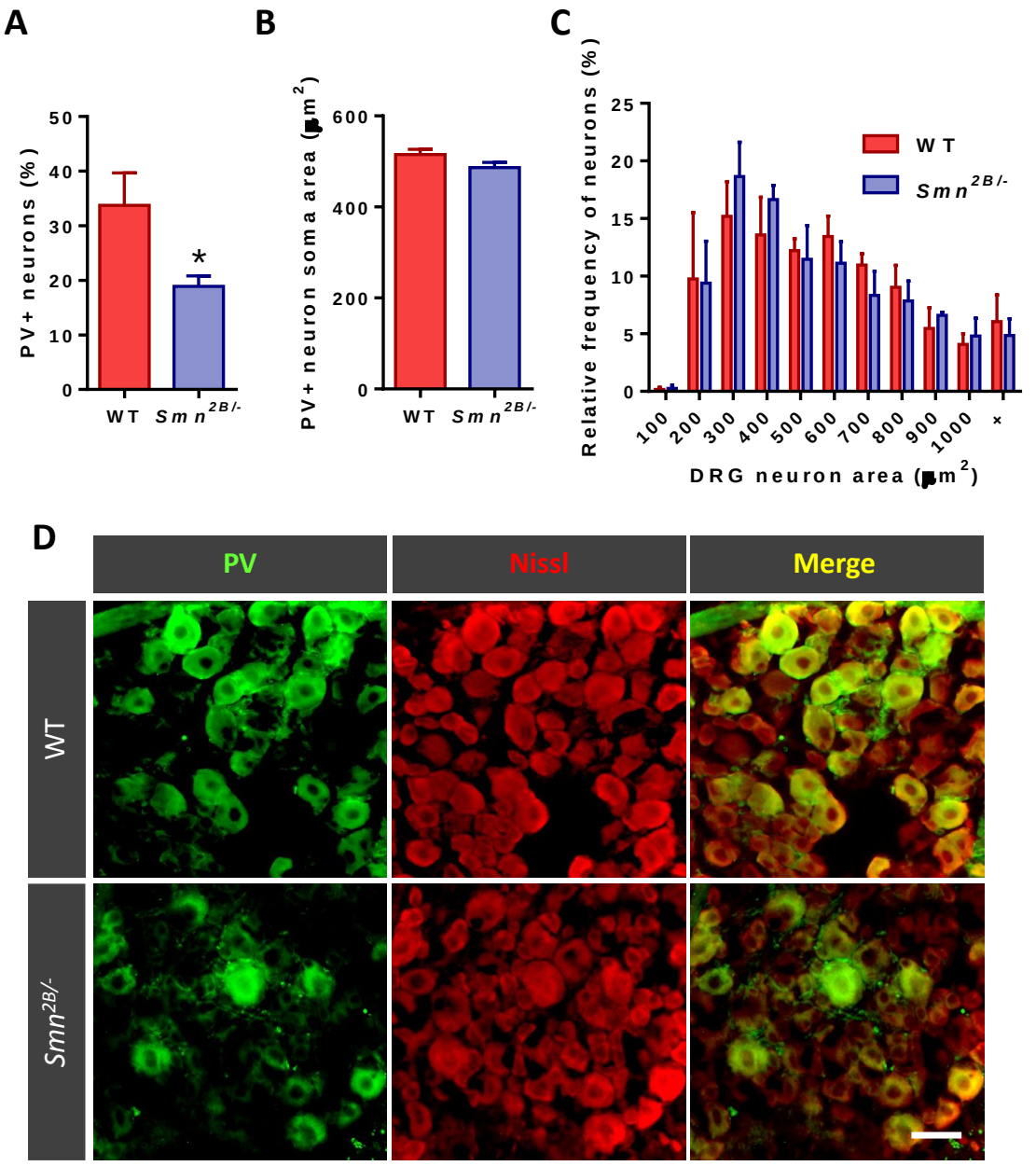


Figura 41. Estudi de la subpoblació neuronal del gangli de l'arrel dorsal (DRG) positiva per a parvalbúmina (PV). *(A) Percentatge de neurones immunoreactives a la PV del DRG L4 de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$ i àrea d'aquestes (B). (C) Freqüències relatives de l'àrea de les neurones positives per a PV, expressades com el percentatge del total de neurones. (D) Imatges representatives de seccions del DRG mostrant la immunofluorescència de la PV (verd) en les neurones marcades amb Nissl (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05; n=410-619 neurones comptades en 21-26 seccions del DRG obtinguts de 4 animals per condició. Barra de calibració=50 μm en (D).*

A continuació es va explorar si la degeneració cel·lular al DRG anava acompanyada de defectes en els axons sensorials de l'arrel nerviosa dorsal L4. Es van analitzar seccions transversals tenyides amb blau de metilè i es va observar que, en etapes inicials (P5 i P10), els animals malalts van presentar un fenotip de l'arrel dorsal L4 similar a l'observat en els animals WT. En canvi, a mesura que progressava la malaltia es va detectar un arrest en el creixement de l'arrel, amb diferències significatives en l'àrea d'aquesta a partir de P20 que es van mantenir fins a l'etapa final (**Figura 42**).

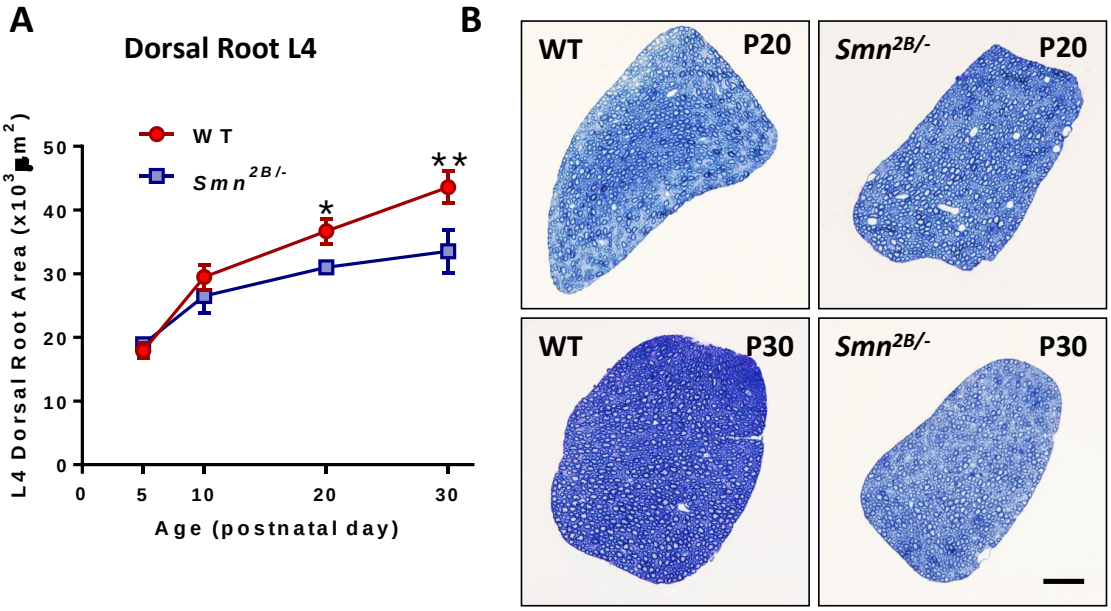


Figura 42. Afectació de l'arrel nerviosa dorsal dorsal en l'AME. *(A) Àrea total transversal de l'arrel nerviosa dorsal L4 de la medul·la espinal d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives de seccions transversals de l'arrel dorsal tenyides amb blau de metilé d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ de P20 i P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01; n= 3-5 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (B).*

Es va escollir el punt final de la malaltia, P30, per realitzar comptatges del nombre total d'axons sensorials presents a l'arrel dorsal. Tot i que no es van observar diferències significatives en el nombre total d'axons, es va detectar una atròfia dels axons sensorials en l'AME (**Figura 43**). La falta de significació en la diferència del nombre total d'axons podria ser conseqüència de que les neurones propioceptives, la subpoblació que s'ha vist reduïda en l'AME, són poc abundants en el DRG, de manera que la disminució en el nombre d'aquesta subpoblació no queda reflectit en el nombre total d'axons de l'arrel dorsal. En canvi, sí que s'observa una reducció de la mida de l'arrel deguda a l'atròfia de la resta de subpoblacions neuronals del DRG.

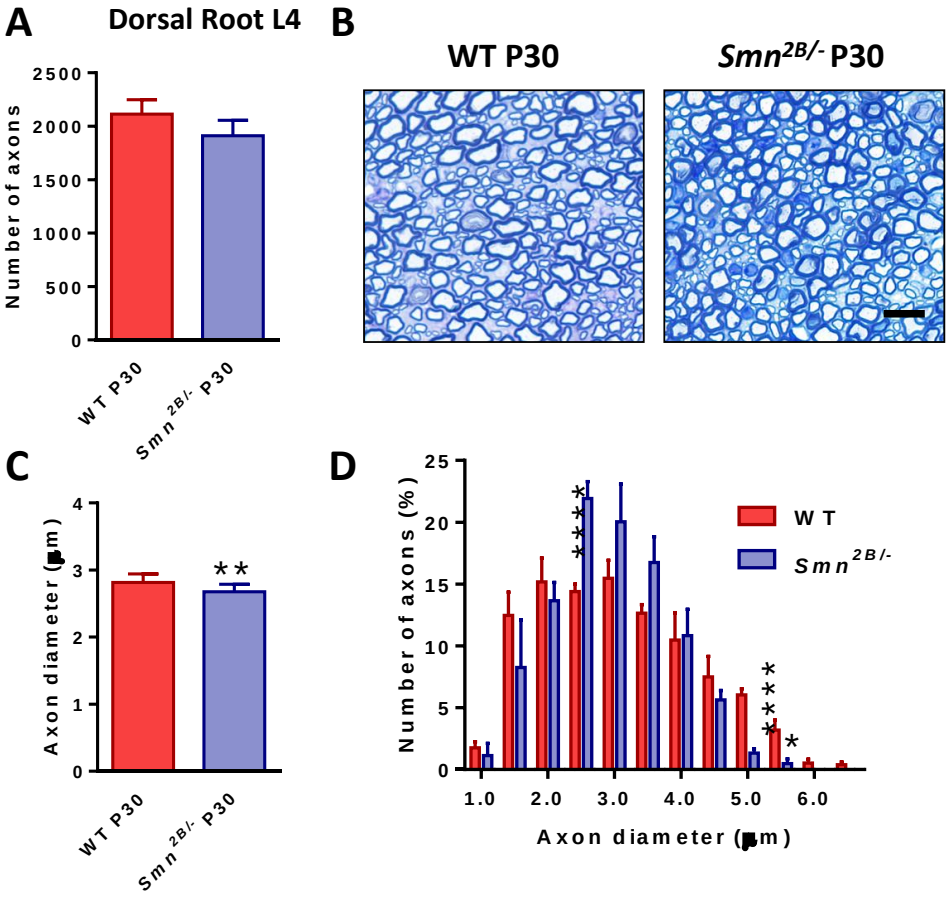


Figura 43. Afectació dels axons sensorials de l'arrel dorsal en l'AME. *(A) Nombre d'axons sans de l'arrel dorsal L4 de la medul·la espinal d'animals P30 WT i Smn$^{2B/-}$. (B) Imatges representatives de seccions transversals de l'arrel dorsal tenyides amb blau de metilè. (C) Diàmetre dels axons sensorials de l'arrel dorsal d'animals P30 WT i Smn$^{2B/-}$ i (D) freqüències relatives de la mida d'aquests, expressades com el percentatge del total d'axons. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01; n=250-300 axons de l'arrel dorsal obtingudes de 3-4 animals per condició. Barra de calibració=10 µm en (B).*

Afectació de les unions neuromusculars del múscul esquelètic en el model murí d'AME *Smn$^{2B/-}$*.

S'ha descrit el dèficit d'SMN com el responsable d'anomalies, a nivell tant presinàptic com postsinàptic, en les unions neuromusculars (NMJs) d'humans i de models murins d'AME [11, 118-122]. Amb la intenció d'esbrinar si els defectes en les NMJs dels músculs esquelètics són una característica patològica comú de tots els models murins d'AME, es va portar a terme un estudi amb els músculs tibial anterior (TA) i intercostal (IC). A partir de crioseccions dels dos músculs es van realitzar diversos marcatge i immunotincions per marcar i analitzar diferents estructures a diferents edats, que comprenien entre P10 i P30.

En primer lloc, es va estudiar el grau d'innervació dels músculs, mitjançant el marcatge amb l'anticòs contra neurofilament (NF-68) per a detectar els axons que arribaven a les plaques motores, marcades aquestes últimes amb α-Bgtx. Quan no es va observar cap axó que finalitzava en les plaques motores, aquestes es van considerar dennervades.

A diferència del TA, el qual no presentava grau de dennervació notable fins P30 (**Figura 44**), el múscul IC dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ va mostrar una reducció significativa del nombre de plaques motores innervades en edats més inicials, tals com P10 i P20 (**Figura 45**).

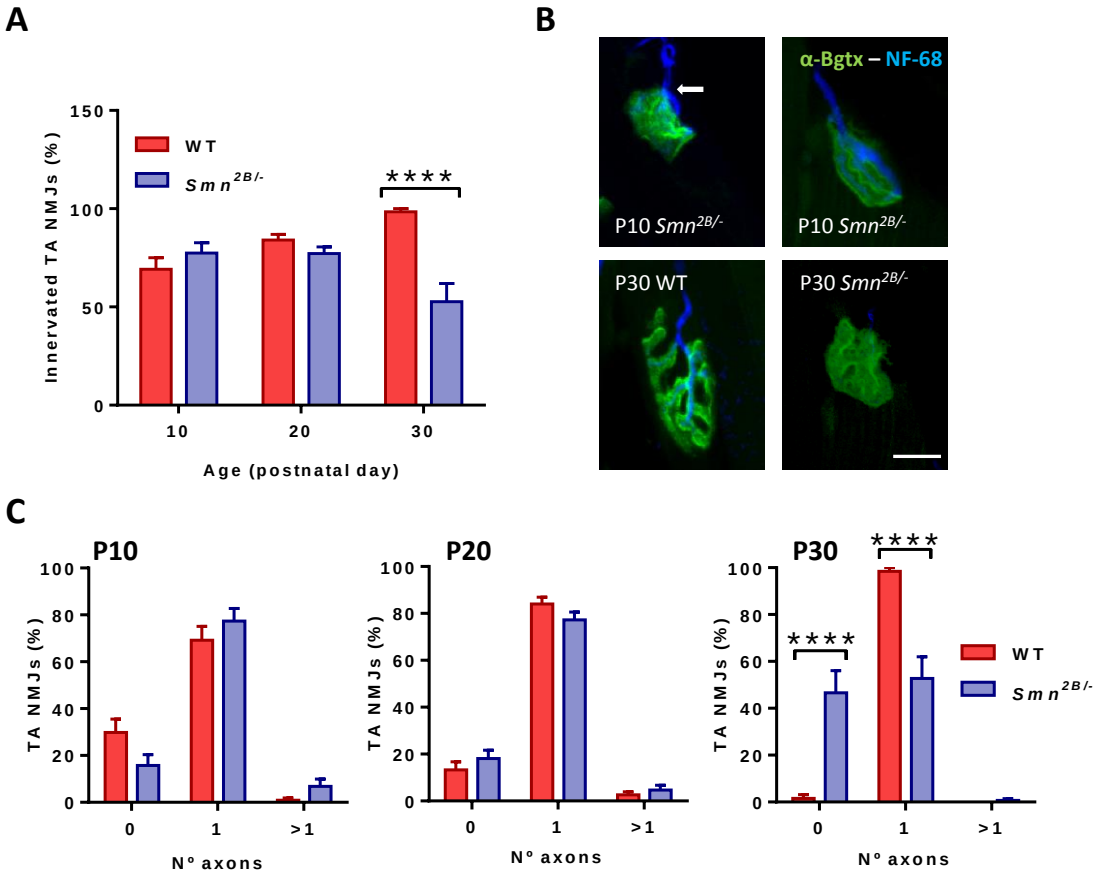


Figura 44. Grau d'innervació de les unions neuromusculars (NMJs) del múscul tibial anterior (TA) d'animals WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatges de NMJs innervades al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives il·lustrant els resultats mostrats en (A); les imatges es van obtenir a partir de crioseccions immunomarcades amb NF-68 (blau) i marcades amb α-Bgtx (verd) per identificar el terminal postsinàptic. (C) Percentatge de NMJs mostrant innervació simple i múltiple en els diferents punts estudiats; la fletxa blanca en (B) mostra una NMJs poliinervada d'un ratolí Smn$^{2B/-}$ P10. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), ****p<0,0001; n=45-68 NMJs de músculs TA de 3-4 animals per condició experimental). Barra de calibració =10 µm en (B).*

En canvi, a P30 el grau d'innervació dels IC dels WT i dels *Smn*$^{2B/-}$ va ser similar. Per altra banda, les plaques que sí que comptaven amb innervació es van representar discriminant entre aquelles que estaven innervades per un sol axó i aquelles que presentaven poliinervació, és a dir, que comptaven amb l'entrada de més d'un axó al terminal postsinàptic (**Figura 44C** i **Figura 45C**). Tot i que no es van assolir valors significatius, els ratolins afectats per la malaltia tenien un major nombre de plaques poliinervades tant en el TA com en el IC (fletxa blanca a la **Figura 44B**), denotant una major immaduresa que les plaques dels WT.

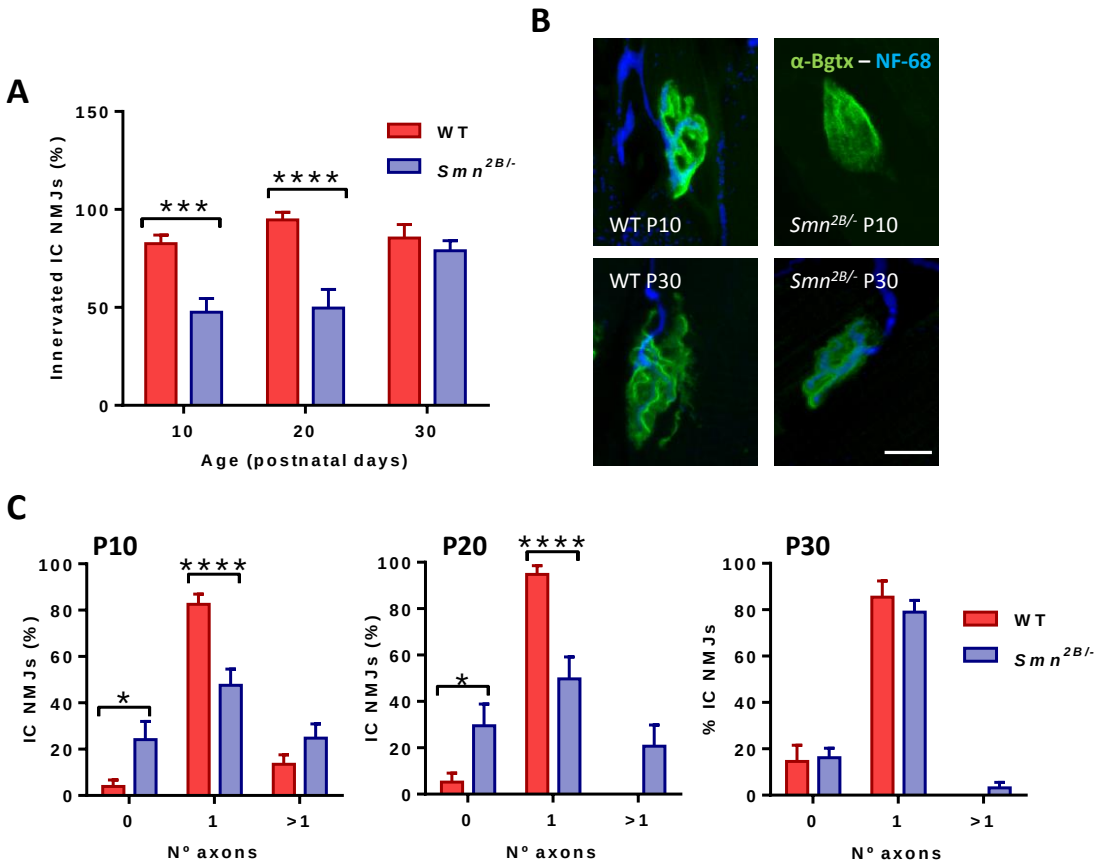


Figura 45. Grau d'innervació de les unions neuromusculars (NMJs) del múscul intercostal (IC) d'animals WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatges de NMJs innervades al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives il·lustrant els resultats mostrats en (A); les imatges es van obtenir a partir de crioseccions immunomarcades amb NF-68 (blau) i marcades amb α-Bgtx (verd) per identificar el terminal postsinàptic. (C) Percentatge de NMJs mostrant innervació simple i múltiple en els diferents punts estudiats. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, ****p<0,0001; n=57-87 NMJs de músculs IC de 3-4 animals per condició experimental). Barra de calibració =10 µm en (B).*

Els comptatges de les plaques que es presentaven positives per al marcador vesicular SV2 (*synaptic vesicle protein 2*), per identificar els terminals axonals, va evidenciar un patró idèntic a l'obtingut amb el marcador contra NF-68. El percentatge de NMJs del TA positives per a SV2, va ser similar entre els animals sans i malalts a P10 i P20, però significativament inferior a P30 en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ (**Figura 46A**). Per altra banda, en el cas del múscul IC, a P10 i P20 es van detectar ja diferències significatives entre les dos condicions, però no va ser així en l'últim punt estudiat (**Figura 46B-C**).

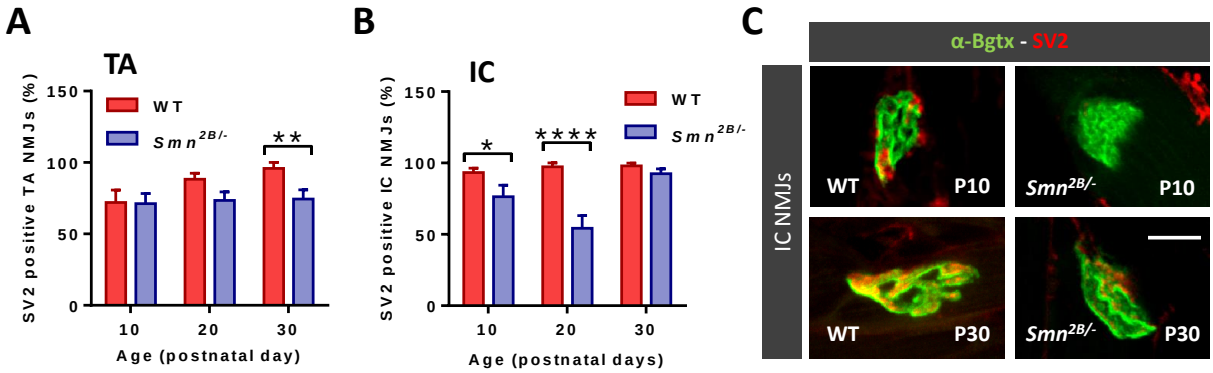


Figura 46. Grau d'innervació de les NMJs en el múscul TA i IC en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Percentatge de NMJs positives per al marcador SV2 en el TA (A) i el IC (B) al llarg del curs de la malaltia. (C) Imatges representatives dels resultats mostrats en (B); les imatges es van obtenir a partir de crioseccions immunomarcades amb SV2 (roig) i marcades amb α-Bgtx (verd) per identificar el terminal postsinàptic. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test),*p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001; n=45-87 NMJs de músculs TA i IC de 3-4 animals per condició experimental). Barra de calibració =10 µm en (C).*

A més, es van detectar defectes morfològics, tals com l'acumulació de NF, en els axons dels animals afectats. Es va considerar una acumulació aberrant de NF quan l'axó terminal exhibia un engruiximent en la morfologia i era fortament marcat amb l'anticòs contra NF-68. En aquest cas es van observar acumulacions a partir de P10 en el cas de l'IC i a partir de P20 en el TA, encara que en aquest últim ja es va observar una clara tendència a acumular-se NF a P10, si bé els resultats no van mostrar diferències significatives. Aquestes alteracions es van mantenir durant tot el curs de la malaltia (**Figura 47**).

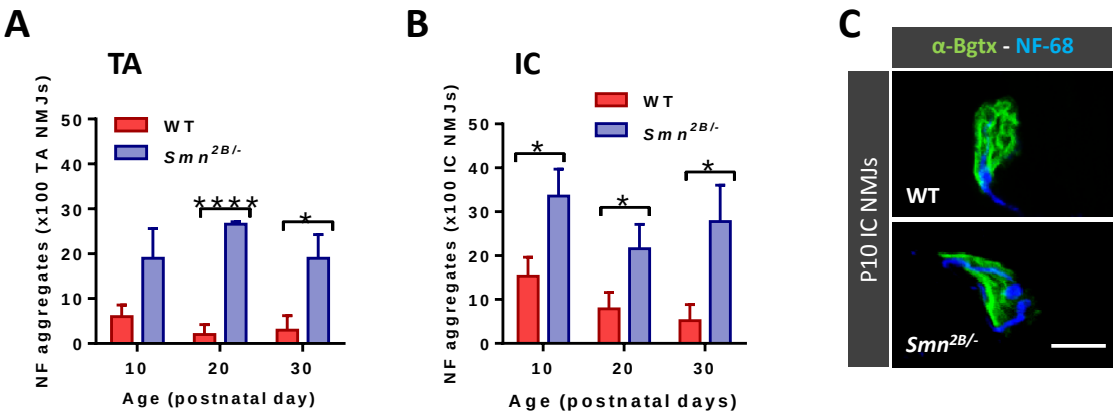


Figura 47. Acumulació aberrant de neurofilament en les NMJs en el múscul TA i IC del model murí $Smn^{2B/-}$. *Percentatge de NMJs presentant acumulació aberrant de neurofilament (marcat amb el marcador NF-68) en el TA (A) i el IC (B) al llarg del curs de la malaltia. (C) Imatges representatives de NMJs del múscul IC a P10, mostrant acumulació de neurofilament en la NMJ de l'animal malalt. Les imatges es van obtenir a partir de crioseccions immunomarcades amb NF-68 (blau) i marcades amb α-Bgtx (verd) per identificar el terminal postsinàptic. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test),*p<0,05, ****p<0,0001; n=45-87 NMJs de músculs TA i IC de 3-4 animals per condició experimental). Barra de calibració =10 µm.*

Per altra banda es va analitzar la citoarquitectura de la part postsinàptica de les NMJs, marcada amb α-Bgtx, i les plaques motores van ser classificades en funció de si presentaven morfologia de "*placa*", és a dir la tipologia pròpia de les plaques immadures (arrodonida i uniforme), o de "*pretzel*", característica de les plaques més madures (amb invaginacions i plecs). Quan es van comparar animals sans i malalts, a P10, en el cas del múscul TA, no es van observar diferències en el nombre de NMJs que presentaven morfologia de tipus *pretzel*; no obstant, els comptatges a P20 i P30 van revelar una disminució significativa d'aquesta tipologia en els ratolins $Smn^{2B/-}$ (**Figura 48A**). Aquesta alteració estructural, que reflectia una immaduresa de les NMJs dels animals afectats per l'AME, va ser més manifesta en el múscul IC, observant-se ja a P10 una disminució significativa del ≈30% de les NMJs de tipus més madur o *pretzel*, i augmentant aquesta reducció fins al ≈80% en l'últim punt estudiat, P30 (**Figura 48B**).

Els resultats obtinguts suggereixen un grau d'afectació major, o almenys més primerenc del múscul intercostal quan es compara amb el múscul tibial anterior. Diferents estudis defensen que, en diversos models murins, la dennervació característica de l'AME té lloc en músculs específics mentre que en altres músculs únicament s'observen canvis discrets i semblen estar completament innervats malgrat el progrés de la malaltia [174, 302]. La falta de significació a P30 en el comptatge de les plaques dennervades en el múscul IC podria ser deguda a

mecanismes compensatoris tals com l'*sprouting*, els quals no han tingut lloc a P30 en el TA degut a l'afectació més tardana d'aquest múscul.

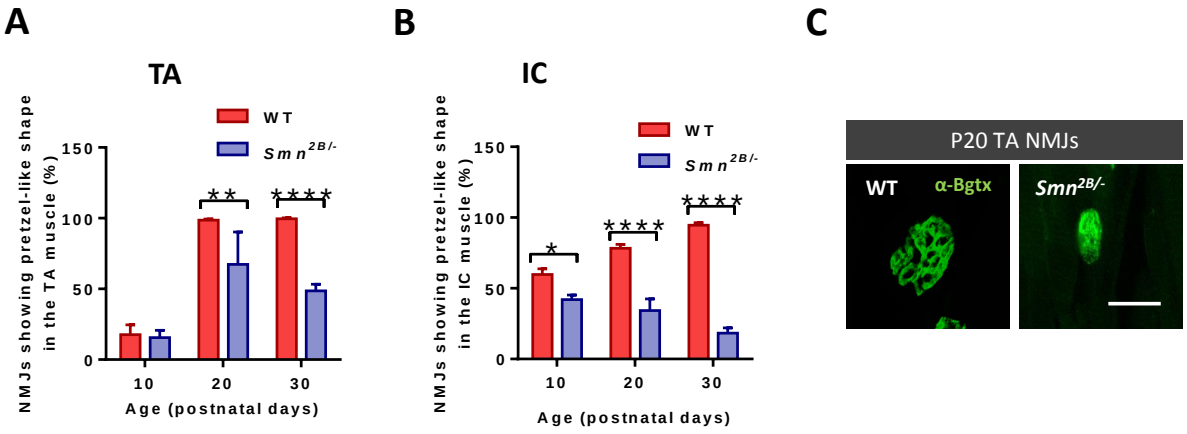


Figura 48. Grau de maduració postsinàptica de les NMJs del múscul TA i IC del model Smn$^{2B/-}$. *Percentatge de NMJs mostrant morfologia de tipus "pretzel" al llarg del curs de la malaltia en el múscul TA (A) i IC (B). (C) Imatges representatives de NMJs del múscul TA a P20, mostrant el terminal postsinàptic marcat amb α-Bgtx (verd) amb forma de "pretzel" en l'animal WT i de "placa" en el malalt. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001; n=217-320 NMJs de músculs TA i IC de 3-4 animals per condició experimental). Barra de calibració =10 µm.*

El CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) és un neuropèptid que es genera per l'*splicing* alternatiu del gen de la calcitonina i es transporta des del cos neuronal cap a les terminacions nervioses, on queda emmagatzemat en vesícules grans de nucli dens, i actua com a component clau en el desenvolupament de les NMJs i en el manteniment de les mateixes [278, 303-305]. Es va estudiar si els canvis histopatològics observats a les NMJs anaven acompanyats d'alteracions en l'expressió del CGRP, tal i com anteriorment s'havia observat en aquest laboratori en altres models murins d'AME [122, 306]. Així, d'acord amb els anteriors defectes detectats en les NMJs dels músculs TA i IC, es va observar una disminució significativa de l'expressió del neuropèptid a P20 en els dos músculs, sent aquesta més marcada a P30. A P10, únicament en el cas de l'IC, es van veure diferències significatives entre els ratolins WT i els *Smn*$^{2B/-}$, suggerint de nou una major afectació d'aquest múscul (**Figura 49**). A més, aquests resultats van ser coherents amb els resultats de l'anàlisi de l'expressió del CGRP als somes de les MNs de la medul·la espinal, trobant-se una disminució significativa en el cas dels animals afectats per l'AME (**Figura 50**). Tot i que a P10 es va observar una reducció en l'expressió de les motoneurones d'aproximadament el 17%, aquesta no va resultar estadísticament significativa.

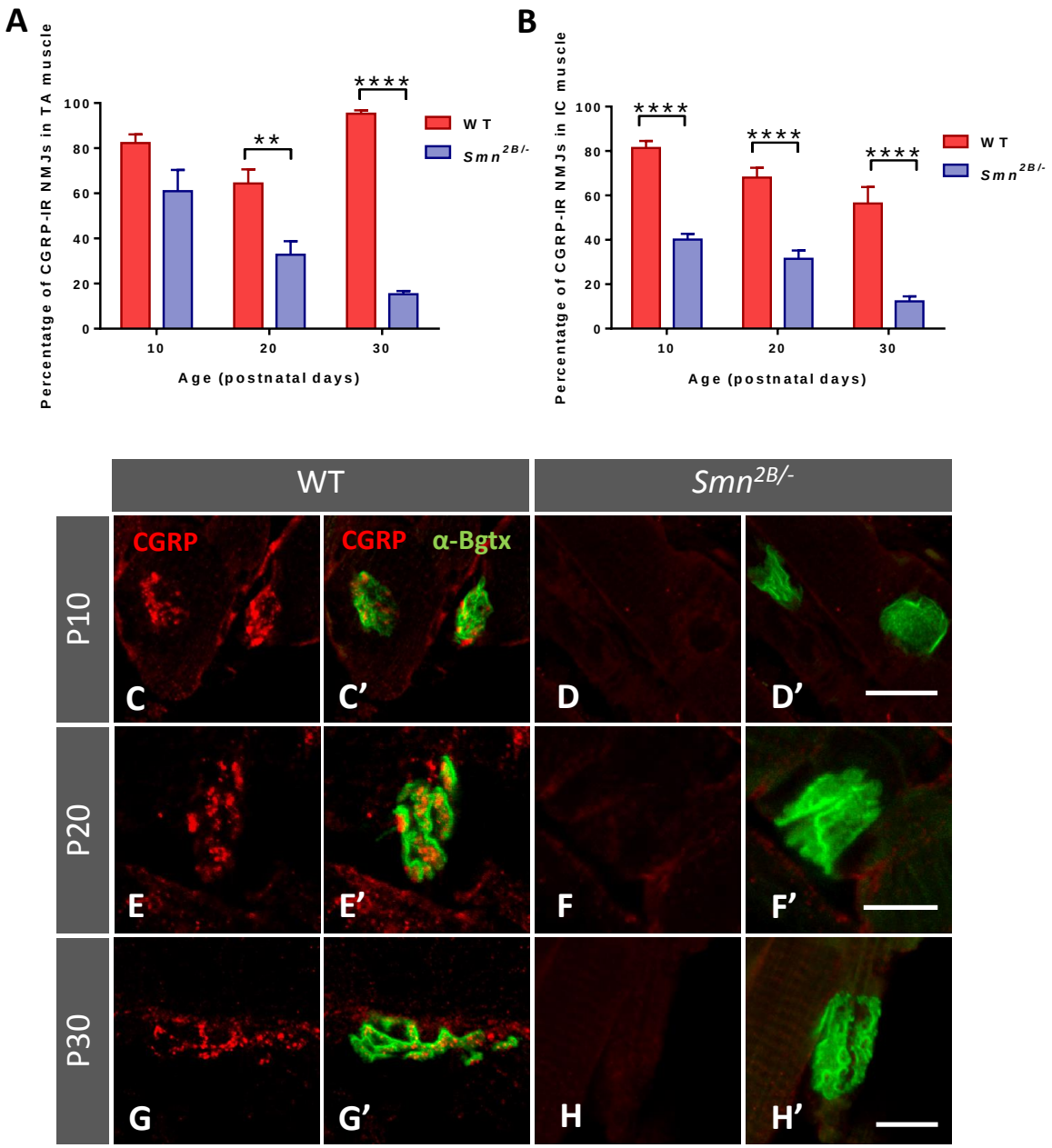


Figura 49. Expressió del neuropèptid CGRP al múscul TA i IC d'animals WT i Smn$^{2B/-}$. *Percentatge de NMJs que expressen CGRP durant el curs temporal estudiat al TA (A) i a l'IC (B). (C-H') Imatges representatives mostrant immunomarcatge per al CGRP (roig) en NMJs (marcades amb verd, α-Bgtx) de l'IC. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01, ****p<0,0001; n=320-687 NMJs del múscul TA i IC de 3-10 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (D') s'aplica a (C-H'), 10 µm en (F') s'aplica a (E-F') i en (H') s'aplica a (G-H').*

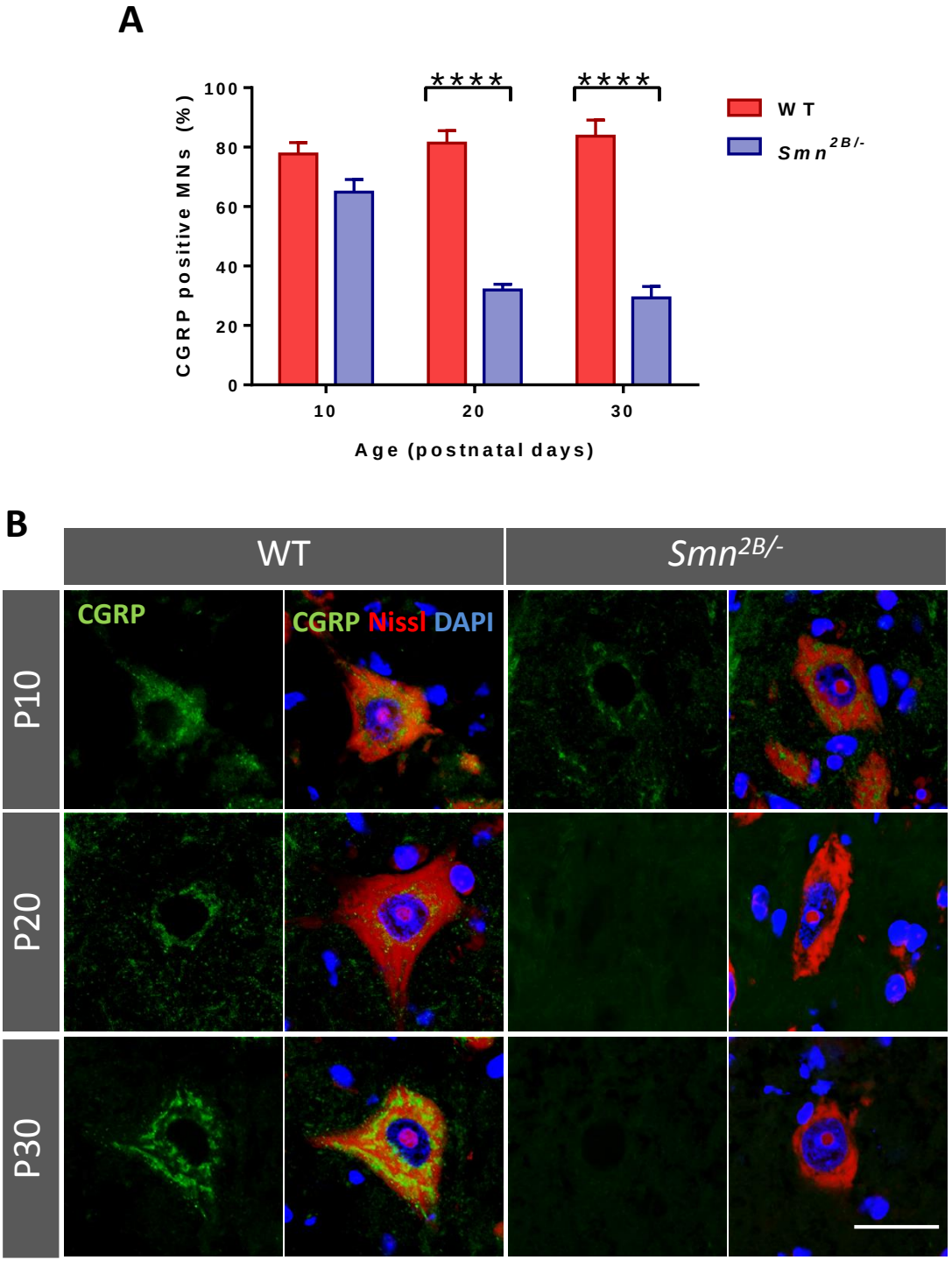


Figura 50. Expressió del neuropèptid CGRP a la medul·la espinal d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ *(A) Percentatge de MNs que expressen CGRP durant el curs temporal estudiat. (B) Imatges representatives mostrant immunomarcatge per al CGRP (verd) en MNs amb el soma marcat amb tinció de Nissl (roig) i el nucli amb DAPI (blau). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), ****p<0,0001; n=3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=30 µm en (B).*

Afectació del múscul esquelètic en el model muri *Smn$^{2B/-}$*.

A més dels defectes a nivell sinàptic, es va estudiar l'estat del múscul TA per tal esbrinar si hi havia algun signe d'afectació intrínseca independent de l'alteració de les NMJs.

En primer lloc, l'anàlisi morfomètrica de les fibres musculars a P10, P20 i P30 a partir de tincions amb hematoxilina-eosina de crioseccions transverasals del TA va mostrar una aturada en el desenvolupament muscular en els animals afectats per l'AME. L'histograma de les freqüències relatives de l'àrea de les fibres va evidenciar una tendència de les miofibres WT a un creixement (que va quedar reflectit en el desplaçament cap a la dreta), mentre que les fibres dels ratolins *Smn$^{2B/-}$* no van augmentar pràcticament la seua mida, mantenint-se en valors menors que denoten un retard o una aturada del creixement (**Figura 51**).

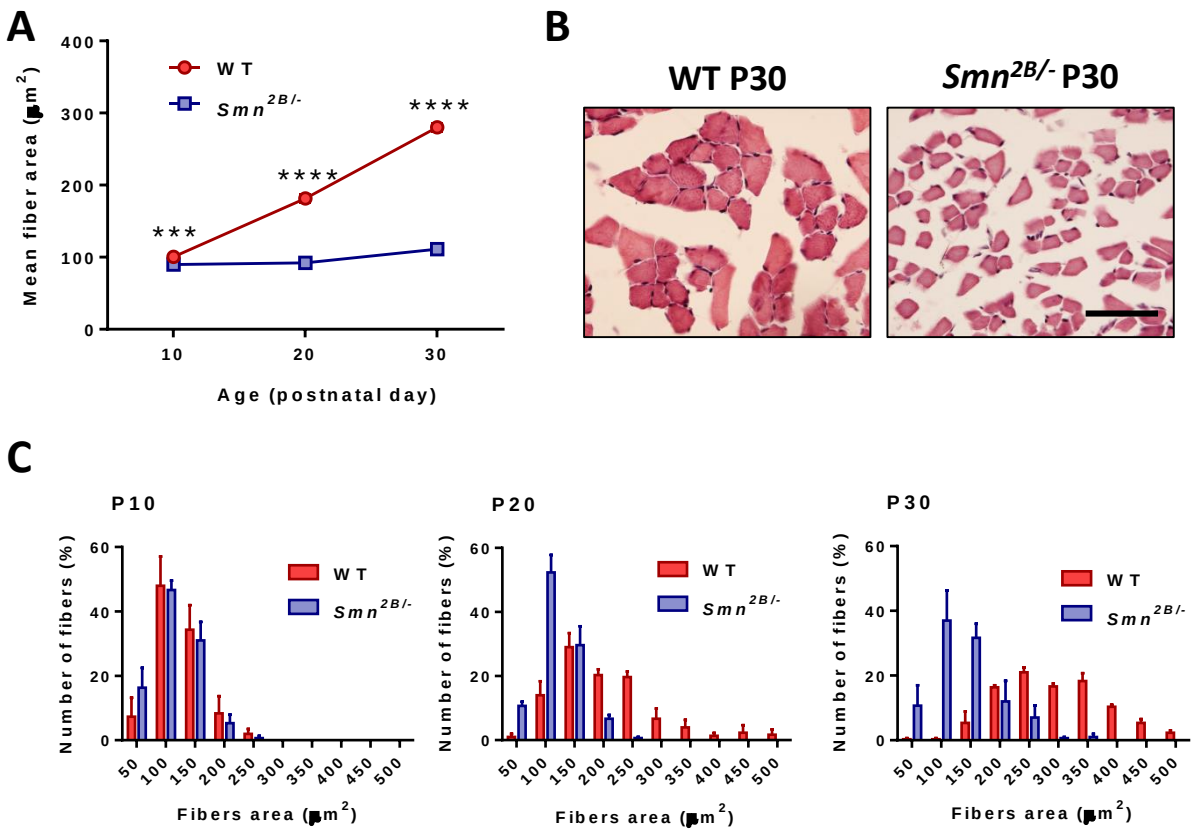


Figura 51. Afectació del múscul TA en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Àrea transversal de les miofibres d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ durant el curs de la malaltia. (B) Imatges representatives de crioseccions del múscul TA, tenyides amb hematoxilina-eosina, d'animals P30 WT i Smn$^{2B/-}$. (C) Freqüències relatives de la mida de les miofibres del TA, expressades com el percentatge del total de fibres, d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ de P10, P20 i P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ***p<0,001; ****p<0,0001; n=300 fibres del TA obtingudes de 3 animals per condició i edat. Barra de calibració=50 µm en (B).*

Acte seguit es va analitzar la tipologia de les miofibres (**Figura 52A**), les quals poden ser diferenciades mitjançant l'estudi de l'expressió d'isoformes específiques de les cadenes pesades de miosina (MyHC, de l'anglès *myosin heavy chain*). En aquest aspecte, les fibres musculars que presenten un metabolisme oxidatiu i una contracció lenta expressen l'isoforma MyHC I (fibres de tipus I), mentre que les fibres amb un metabolisme glicolític i una contracció

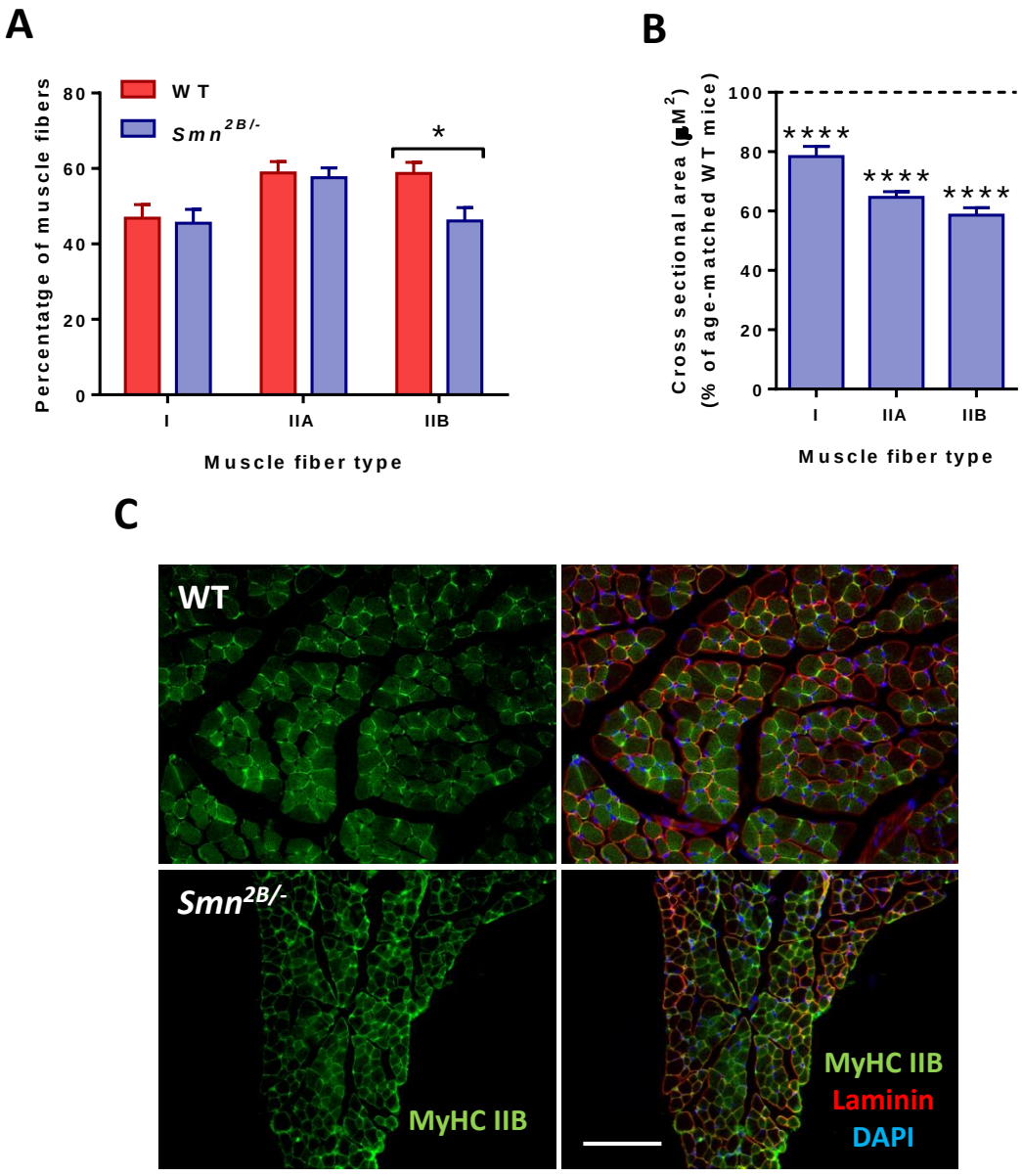


Figura 52. Tipologia de fibres musculars en l'AME. *(A) Resum gràfic del percentatge de fibres immunomarcades amb MyHC I, MyHC IIA i MyHC IIB (miofibres de tipus I, tipus IIA i tipus IIB, respectivament) en el TA d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$. (B) Àrea transversal de les diferents miofibres. (C) Imatges representatives de l'immunomarcatge de la cadena pesada de miosina IIB en el TA d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ (MyHC IIB en verd, laminina en roig i marcatge nuclear en blau). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ***p<0,001; n=20 seccions de múscul TA de 4 animals per condició. Barra de calibració=100 µm en (C).*

més ràpida expressen MyHC IIA o IIB (fibres de tipus IIA i IIB, respectivament). El patró d'expressió de les diferents isoformes de miosina guarda relació amb la classificació de les MNs en "*Slow*" o "*Fast*", tal i com s'ha comentat anteriorment (pag. 67). Amb aquest objectiu, es van realitzar immunotioncions amb anticossos específics contra les diferents isoformes de miosina (MyHC I, IIA i IIB) en criosseccions transversals de TA d'animals P20. Aquest múscul en condicions normals està compost, majoritàriament, per fibres de contracció ràpida [307]. Els resultats van mostrar valors similars en els animals sans i malalts del percentatge de fibres musculars de tipus I, així com de tipus IIA, però es va observar una reducció significativa en la proporció de miofibres que expressaven MyHC IIB (glicolítiques i de contracció ràpida). A més, l'estudi de l'àrea de les diferents poblacions de fibres musculars va revelar que les fibres IIB presentaven un major grau d'atròfia que la resta (**Figura 52B**).

A continuació, i basant-se en el fet que diversos estudis proteòmics han revelat una sobreexpressió de proteïnes implicades en la mort cel·lular en diferents models murins d'AME, es va estudiar l'apoptosi en el TA del model *Smn*$^{2B/-}$. Mitjançant el mètode TUNEL es va quantificar la densitat d'apoptosis a P10 i P30 a partir de crioseccions del múscul (**Figura 53**). Tot i que en l'etapa terminal els esdeveniments apoptòtics en el múscul dels ratolins afectats no van ser tant marcats com en els estadis anteriors, en els dos punts estudiats es va detectar un increment significatiu de l'apoptosi.

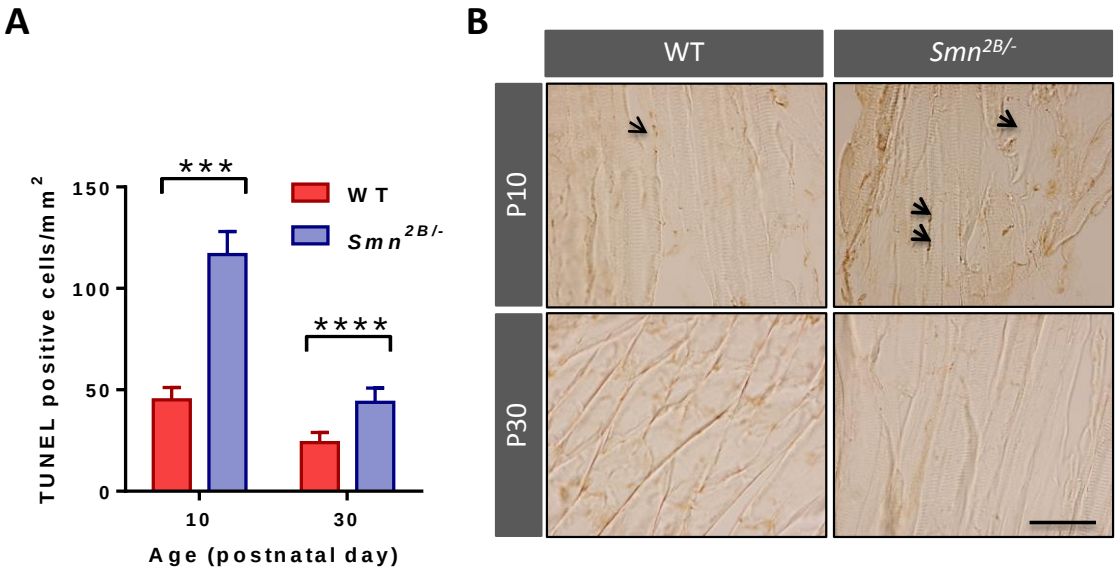


Figura 53. Apoptosi en el múscul TA d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació dels esdeveniments apoptòtics a les diferents edats i (B) imatges representatives, les fletxes indiquen apoptosis. (C) L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ***p<0,001, ****p<0,0001; n=3-4 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (B).*

Les motoneurones i el múscul deficients en SMN no mostren una major vulnerabilitat a la desconnexió neuromuscular.

Diversos estudis apunten la possibilitat que el trastorn primari causant de la mort de les MNs en l'AME podria localitzar-se en el terminal motor, en concret en les sinapsis neuromusculars, i no en el propi soma neuronal [120, 121]. Segons aquesta teoria, la lesió seguiria un curs en el qual l'afectació de les MNs seria l'últim pas del procés degeneratiu.

Estudis realitzats en aquest [308, 309] i en altres laboratoris [310] han posat de manifest que, en rosegadors, la supervivència de les MNs espinals depèn del suport tròfic de la seua diana d'innervació (les fibres musculars) per a la seua supervivència durant els primers dies de la etapa postnatal. Així, l'axotomia unilateral del nervi ciàtic en ratolins WT neonats abans de P5 indueix la mort d'aproximadament el 30% de les MNs de la medul·la espinal lumbar en els 5-7 dies posteriors a la cirurgia; contràriament, la mateixa intervenció efectuada en ratolins P15 no comporta la pèrdua d'un nombre significatiu de MNs en els 15 dies posteriors.

Basant-se en aquests fets, es va procedir a axotomitzar unilateralment el nervi ciàtic d'animals WT i $Smn^{2B/-}$ a P15 (edat en que les MNs ja no depenen de la seua diana per sobreviure i, per tant, en condicions normals la desconnexió de les MNs mitjançant la lesió nerviosa no induiria mort neuronal aparent). Passats 10 dies (P25) es va recollir la medul·la lumbar dels animals operats amb l'objectiu d'estudiar si el dèficit d'SMN conferia a les MNs dels ratolins afectats per la malaltia una major vulnerabilitat front a la desconnexió. Per altra banda es va recollir el TA per tal de discriminar si l'apoptosi és un procés intrínsec del múscul esquelètic dels animals amb AME o és una resposta secundària a la dennervació.

En primer lloc, es va realitzar una tinció amb hematoxilina-eosina de seccions de la medul·la espinal i es va fer un recompte de les MNs de la banya ventral tant del costat operat (ipsilateral, ipsi) com del no operat (contralateral, contra) de la medul·la lumbar. Tal i com cabia esperar, els comptatges de MNs aparentment sanes dels animals WT van ser similars en el costat contra i en el ipsi, demostrant que la lesió nerviosa no indueix la mort de les MNs en aquesta edat. Tot i que el nombre absolut de MNs va ser considerablement inferior en els ratolins $Smn^{2B/-}$, la comparativa entre el costat ipsi i el contra va ser similar a l'observat en els animals sans, revelant que les MNs deficients en SMN no presenten una major vulnerabilitat a la lesió nerviosa o a la dennervació (**Figura 54**).

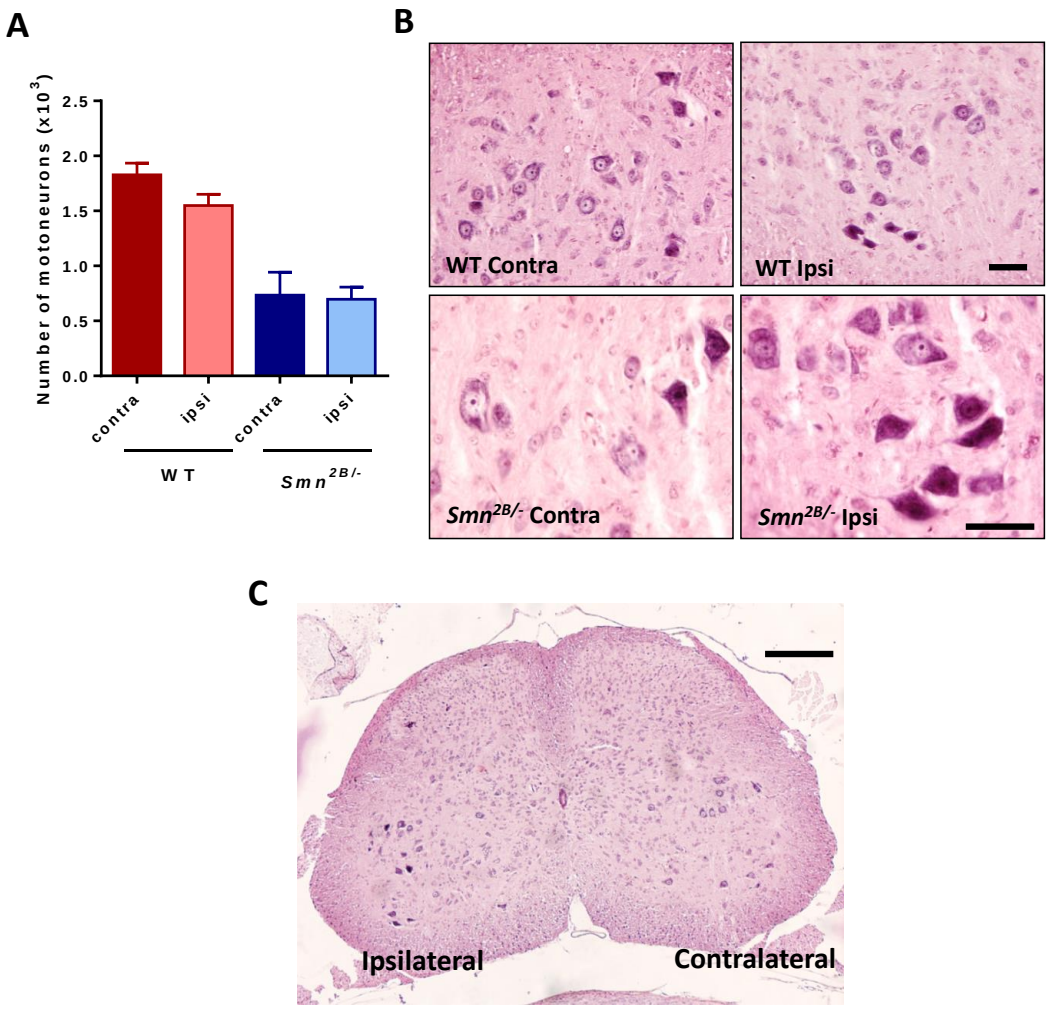


Figura 54. Supervivència de les MNs en la medul·la espinal d'animals P25 WT i Smn$^{2B/-}$ sotmesos a una axotomia unilateral del nervi ciàtic a P15. *(A) Nombre de MNs en la banya ventral del costat no operat (contra) i del costat axotomitzat (ipsi). (B) Imatges representatives de les MNs d'animals axotomitzats WT i Smn$^{2B/-}$ posteriorment a la tinció amb hematoxilina-eosina. (C) Secció transversal de la medul·la espinal lumbar d'un animal WT mostrant el costat contra i el ipsi posteriorment a l'axotomia unilateral del nervi ciàtic. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", p>0,05; n=6-10 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (B) i 200 µm en (C).*

L'anàlisi muscular va revelar una disminució del pes del TA del costat axotomitzat tant en els animals WT com en els animals malalts quan es comparaven amb el TA del costat contralateral i del TA d'animals no operats de la mateixa edat, no observant-se diferències significatives entre aquests dos últims (**Figura 55**). Tot i que en tots els casos el pes dels músculs dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ va ser marcadament inferior al dels animals sans, es va calcular el percentatge del pes del TA respecte al pes total dels animals, per poder comparar el grau d'atròfia causat per l'axotomia en els dos grups experimentals. Així, es va observar com posteriorment a l'operació, encara que en els dos casos es perdia massa muscular, la reducció del pes del TA va ser del 57% en el cas dels WT i únicament del 40% en el cas dels animals *Smn*$^{2B/-}$.

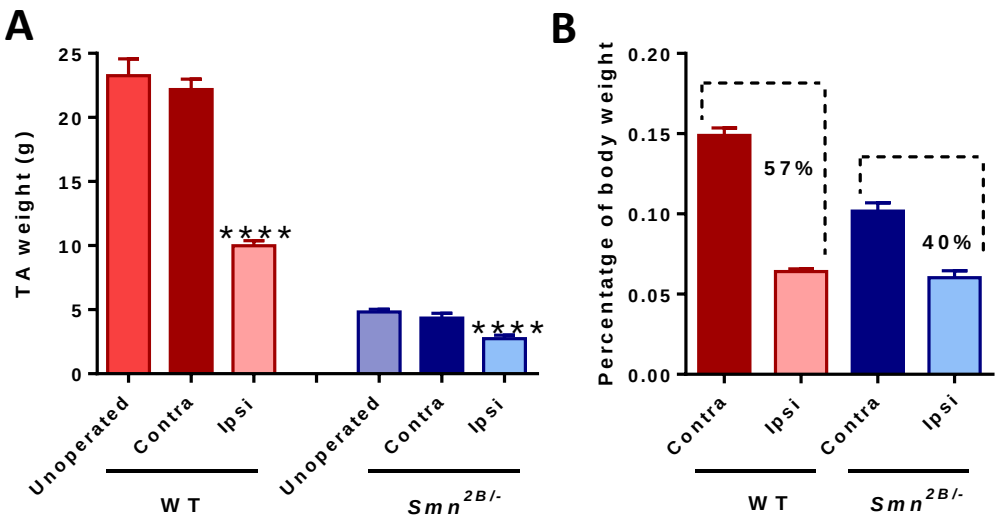


Figura 55. Efectes de l'axotomia del nervi ciàtic sobre el pes del múscul TA d'animals P25 WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Pes absolut del TA d'animals no operats i d'animals sotmesos a l'axotomia. (B)Pes relatiu dels músculs TA del costat no operat (contra) i del costat axotomitzat (ipsi). S'indica el percentatge de pèrdua de massa muscular del costat ipsi respecte al contra de la corresponent condició. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) en (A), ****p<0,0001; n=5-10 animals per condició.*

Per tal d'esbrinar si la desconnexió causada per l'operació produïa un augment de la mort muscular en l'AME, es va portar a terme un recompte de les cèl·lules apoptòtiques evidenciades mitjançant la tècnica TUNEL en seccions de músculs TA del costat operat, no operat i procedents d'animals no axotomitzats. En comparació dels ratolins sans, els *Smn*$^{2B/-}$ no sotmesos a lesió van mostrar una elevada presència de perfils apoptòtics (**Figura 56A-B**), que no va ser addicionalment augmentada per l'axotomia (**Figura 56E-F**), de manera que la desconnexió no va incrementar la mort cel·lular existent com a conseqüència del dèficit d'SMN. En canvi, en el cas dels WT, el comptatge de perfils apoptòtics en el costat operat va revelar un increment significatiu degut a la lesió (**Figura 56C-D**).

Per tant, el fet que en els animals WT l'axotomia del nervi ciàtic cause una major atròfia del múscul TA que en els animals sans i, a més, un augment de l'apoptosi en el costat ipsi, que no s'observa en els músculs operats de ratolins *Smn*$^{2B/-}$, estaria suggerint que els animals afectats per l'AME presenten un menor grau de resposta a la lesió, de manera que l'atròfia i l'apoptosi muscular vista en l'AME serien causades per un procés patològic intrínsec del múscul esquelètic dels animals *Smn*$^{2B/-}$, i no com a resposta secundària al procés de dennervació que acompanya a la malaltia.

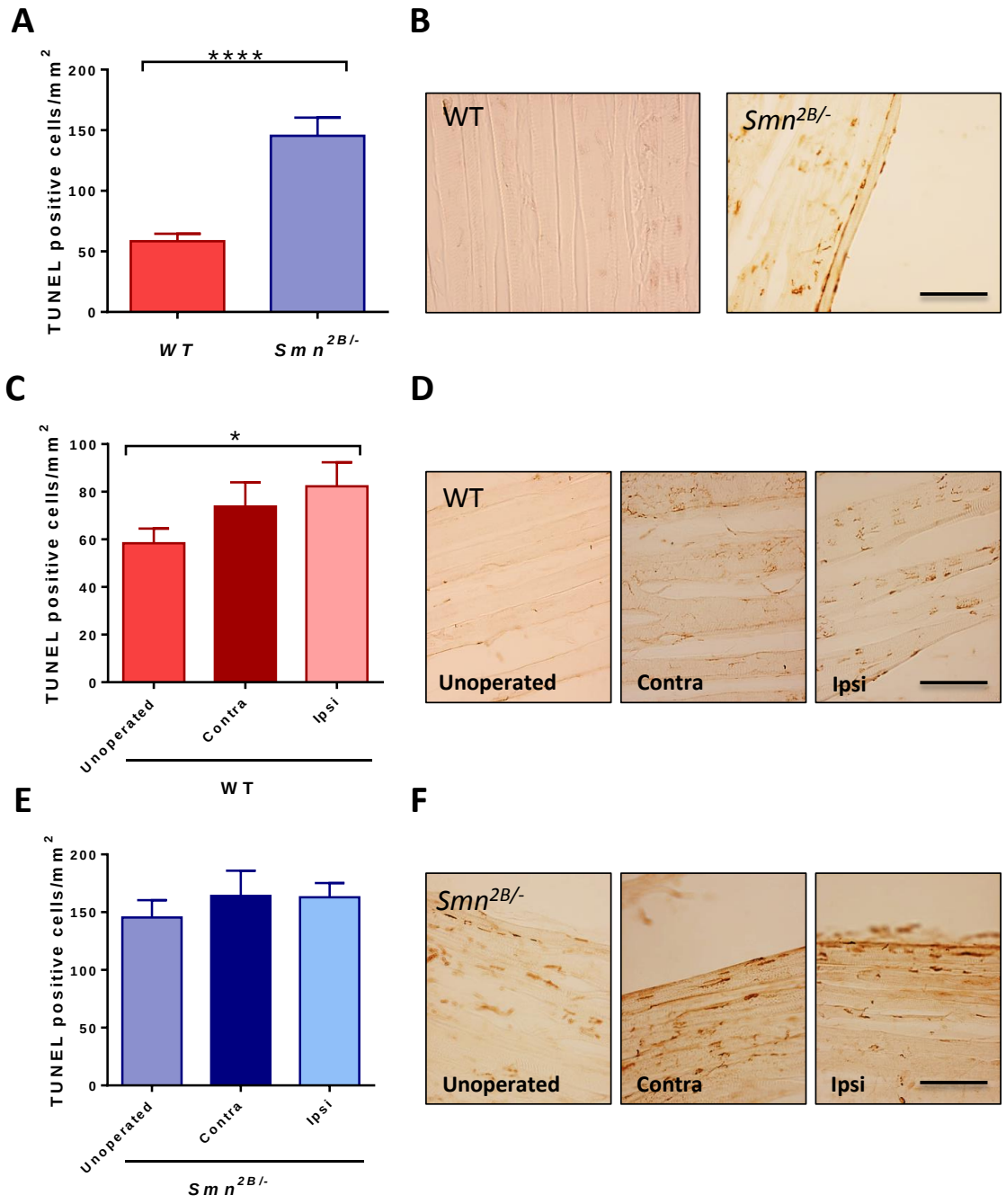


Figura 56. Efectes de l'axotomia del nervi ciàtic sobre l'apoptosi al múscul TA d'animals P25 WT i Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació de les apoptosis en músculs d'animals no operats i (B) imatges representatives. (C) Quantificació de les apoptosis en músculs d'animals WT no axotomitzats i en músculs d'animals WT sotmesos a l'operació. (D) Imatges representatives de les apoptosis en els animals sans. (E) Quantificació de les apoptosis en músculs d'animals WT no axotomitzats i en músculs d'animals Smn$^{2B/-}$. sotmesos a l'operació. (F) Imatges representatives de les apoptosis en els animals malalts. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05, ****p<0,0001; n=3-4 animals per condició. Barra de calibració=50 µm en (B, D i F).*

Les lesions als nervis i la conseqüent paràlisi modifiquen la producció de factors neurotròfics al múscul i a les cèl·lules no nervioses ubicades al voltant del nervi. Els factors produïts per aquestes cèl·lules són transportats als cossos de les MNs on promouen la seua supervivència. En aquest aspecte s'ha descrit un increment de l'expressió del CGRP als axons i dels receptors del CGRP a les cèl·lules de Schwann, on el CGRP promou els contactes axó-cèl·lula de Schwann [311] i es veu implicat en la regeneració nerviosa posteriorment a la lesió. Es va estudiar l'expressió del CGRP mitjançant immunofluorescència als somes neuronals, i tot i observar-se un modest increment en els animals malalts axotomitzats, no es van assolir diferències significatives (**Figura 57**).

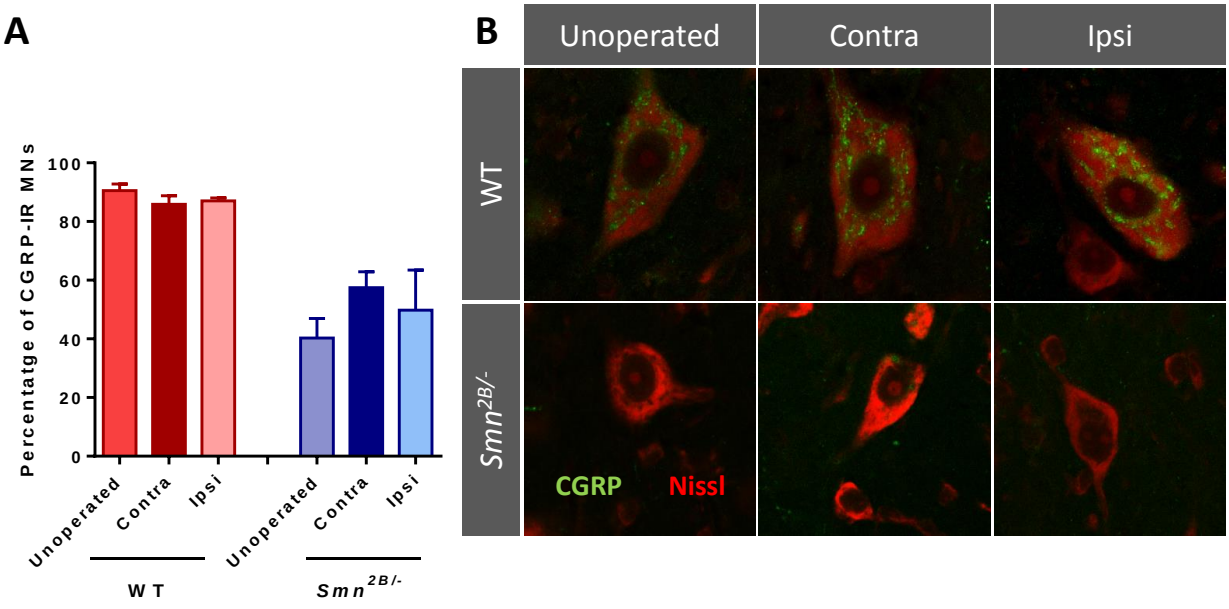


Figura 57. Efectes de l'axotomia del nervi ciàtic sobre l'expressió de CGRP en les MNs de la medul·la espinal d'animals P25 WT i $Smn^{2B/-}$. *(A) Percentatge de MNs que es presenten positives al immunomarcatge amb CGRP. (B) Imatges representatives mostrant la immunofluorescència del CGRP (verd) en MNs marcades amb Nissl (roig) d'animals WT i $Smn^{2B/-}$ operats i no operats. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), p<0,05; n=3-4 animals per condició. Barra de calibració=20 µm en (B).*

Disminució de la resposta de la motoneurona a la paràlisi induïda per toxina botulínica en els animals *Smn$^{2B/-}$*.

Existeix la possibilitat que la severitat del dèficit motor en l'AME estiga relacionada amb l'absència de mecanismes compensatoris de la dennervació muscular crònica associada a la malaltia. Un d'aquests mecanismes seria la promoció d'*sprouting* neuromuscular (ramificació i creixement d'axons intactes que s'escapen de l'àrea ocupada per la NMJ i que són projectats cap a una àrea dennervada. L'*sprouting* pot ocórrer durant la remodelació endògena de les NMJs en condicions normals [113] o en condicions patològiques [312]. A més pot ser induït per diverses toxines (com és la toxina botulínica) i factors tròfics, tals com el CNTF (*cilliary neurotrophic factor*) i l'IGF [259, 278, 313, 314].

Es poden diferenciar dos tipus d'*sprouting*: l'*sprouting* terminal (quan l'axó creix a partir del propi terminal axonal) i l'*sprouting* nodal (creixement a partir del nòdul de Ranvier) [315]. En aquest sentit, s'ha suggerit que l'*sprouting* dels nervis intramusculars podria contribuir a la progressió més lenta de la malaltia en els models murins d'AME de fenotip més lleu en relació amb aquells d'AME més severa [259].

Per estudiar si la capacitat de generar *sprouts* es veu afectada pels nivells de proteïna SMN, es va proposar avaluar la resposta de les MNs a estímuls inductors d'*sprouting* intramuscular, mitjançant la injecció per via subcutània de toxina botulínica (BotA) en el múscul LAL en el model *Smn$^{2B/-}$*. Amb aquest propòsit es van injectar animals P13 WT i *Smn$^{2B/-}$* amb BotA, així com amb solució salina (0,9% NaCl) com a control. Passada una setmana, a P20, es va recollir el múscul LAL rostral i es va procedir a la seua anàlisi mitjançant immunomarcatge amb diferents marcadors seguint el mètode del *whole mount*.

En primer lloc es va estudiar la capacitat d'*sproutar* analitzant el nombre de plaques poliinervades (innervades per més d'un terminal axonal marcat amb l'anticòs contra SMI312 i SV2; les plaques motores es van visualitzar mitjançant el marcatge amb α-Bgtx). El fet d'observar plaques innervades per més d'un terminal axonal podria estar assenyalant bé una immaduresa de les NMJs (per no haver completat el procés d'eliminació de la poliinervació durant el desenvolupament) o bé que aquestes plaques estan innervades per un nou axó provinent de l'*sprouting* nodal. Tal i com es a observar en el cas del múscul IC i TA, a diferència dels WT, els animals *Smn$^{2B/-}$* presentaven un xicotet percentatge de NMJs poliinervades en la part rostral del múscul LAL, evidenciant cert grau d'immaduresa, tot i no assolir valors estadísticament significatius. En canvi, els animals d'ambdós condicions injectats amb BotA van

mostrar un increment en el nombre de plaques poliinervades, estadísticament significatiu en el cas dels WT, però no significatiu en els ratolins malalts, l'increment del qual era molt menor (**Figura 58A**). Aquest increment en el nombre d'axons que arribaven a les NMJs semblaven provenir d'*sprouts* nodals induïts per la paràlisi amb BotA.

Així, el nombre de plaques que presentaven *sprouts* terminals va seguir un patró similar. Cal remarcar l'elevada variabilitat observada als animals malalts injectats amb salí, observant-se alguns casos on pràcticament no es detectaven *sprouts* mentre que altres animals presentaven un alt nombre de plaques amb *sprouting*. A més, es va observar axons que unien dos plaques pròximes (*inter NMJs sprouting*), sent més freqüents en els animals *Smn*$^{2B/-}$ injectats amb la toxina. D'aquesta manera, els músculs LAL d'animals WT injectats amb BotA van presentar un alt percentatge de NMJs amb *sprout*s terminals quan es comparaven amb els respectius salins (**Figura 58B**). En el cas dels animals malalts paralitzats, es va detectar un valor similar al que presentaven els ratolins del mateix genotip injectats amb la solució vehicle de les plaques que presentaven *sprouting*, no assolint diferències significatives.

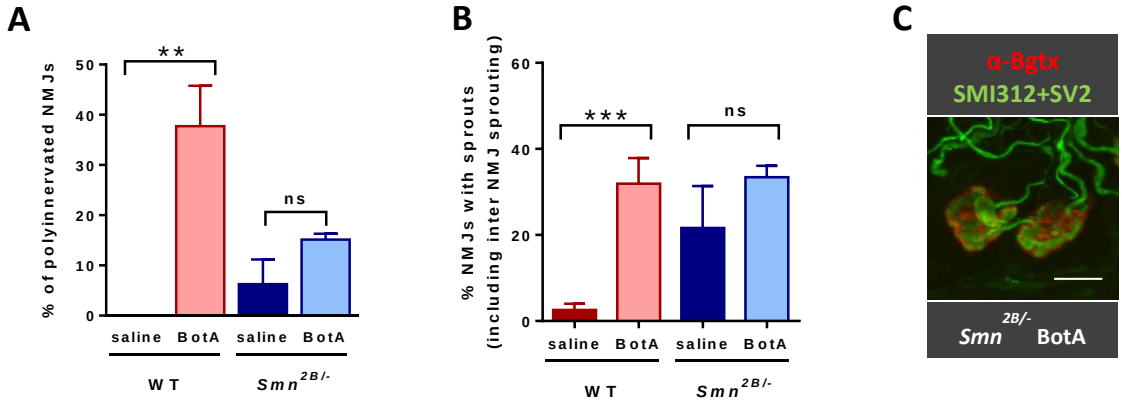


Figura 58. Efecte de la paràlisi amb toxina BotA sobre el model murí Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de plaques poliinervades en el LAL d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ posteriorment a la injecció de solució salina o toxina BotA. (B) Percentatge de NMJs amb sprouts terminals. (C) Imatge de NMJs d'un animal malalt injectat a la toxina unides per un sprout; el terminal postsinàptic marcat amb α-Bgtx (roig), i el presinàptic amb NF i SV2 (verd). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01, ***p<0,001; n=3 animals per condició.*

Tot i que els animals WT i els *Smn*$^{2B/-}$ injectats amb BotA presentaven un nombre similar de plaques amb *sprouts*, l'estudi de la longitud d'aquests (mitjançant el software ImageJ) va revelar un major creixement axonal en el cas dels animals WT, els quals presentaven *sprouts* de major longitud (**Figura 59A**).

Per altra banda, es va analitzar l'amplària de l'axó preterminal i es va observar un increment en els animals malalts injectats amb salí per comparació als animals sans, possiblement degut a l'acumulació aberrant de NF en les NMJs del múscul LAL, tal i com s'havia observat en aquesta edat en altres músculs (IC i TA). En el cas dels animals *Smn*$^{2B/-}$ injectats amb la toxina el gruix del terminal es va veure disminuït, possiblement com a conseqüència de la paràlisi induïda a P13 que estaria impedint que aquests defectes arribaren a tenir lloc en aquestes plaques a P20. En canvi, en els animals WT injectats amb la toxina, el gruix de l'axó terminal va ser significativament superior al dels WT salins (**Figura 59B**).

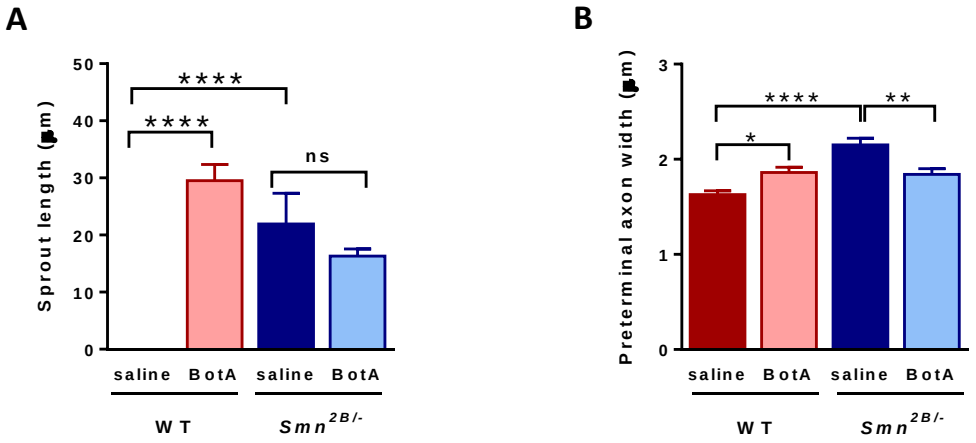


Figura 59. Sprouts en el múscul LAL del model murí Smn$^{2B/-}$ posteriorment a la injecció amb toxina BotA. *(A) Longitud dels sprouts i (B) amplària de l'axó terminal. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; n=3 animals per condició.*

Per tal d'esbrinar si la formació d'sprouts va acompanyada de canvis en la complexitat de les NMJs, es va realitzar un còmput dels punts de ramificació dels terminals per cada NMJ després d'un procés d'esquelinització realitzat amb el software ImageJ (**Figura 60**). Les NMJs dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ van mostrar una complexitat menor que les dels WT, tot i no assolir nivells significatius (WT salí: 35,45 ± 2,05 punts terminals, *Smn*$^{2B/-}$ salí: 24,14 ± 2,08; p>0,05). Els animals sans injectats amb BotA van presentar una major complexitat de les NMJs possiblement com a conseqüència del creixement de nous axons terminals (WT BotA: 68,46 ± 5,16 punts terminals), mentre que la injecció de BotA no va modificar la complexitat de les NMJs dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$.

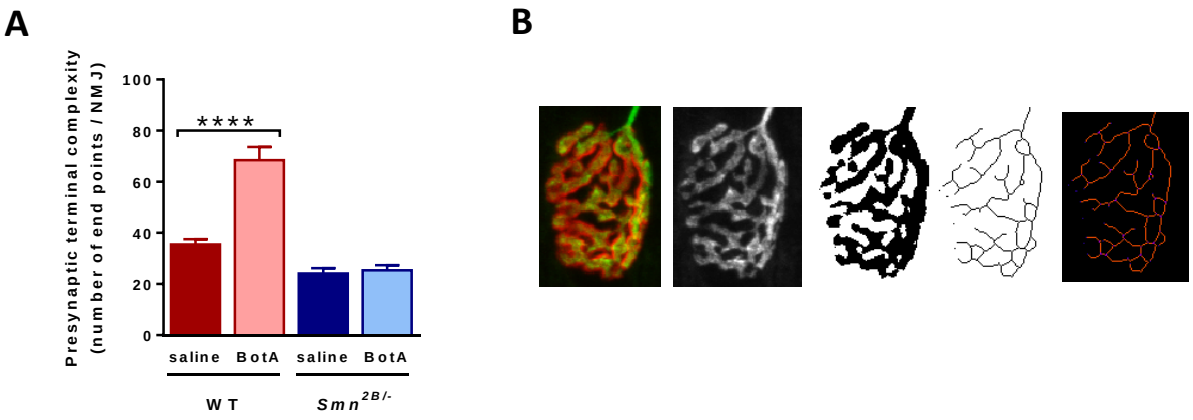


Figura 60. Complexitat dels terminals presinàptics en el múscul LAL posteriorment a la injecció de toxina BotA en el model murí Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació de les ramificacions dels terminals nerviosos en les NMJs en ratolins WT i Smn$^{2B/-}$ posteriorment a la injecció de solució salina o toxina BotA. (B) Procés d'esqueletinització del terminal presinàptic realitzat amb el software ImageJ. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; n=3 animals per condició.*

El CGRP sembla jugar un paper important en la formació de les NMJs tal com es desprèn de l'increment de l'expressió del neuropèptid en processos de reinnervació i el posterior remodelatge de les plaques motores de rates que havien sigut paralitzades amb la toxina botulínica o bé sotmeses a la secció nerviosa [305, 316, 317], a més de l'increment del neuropèptid després de la injecció del factor tròfic CNTF [278]. Per tant, a continuació es va estudiar l'expressió del CGRP per tal de relacionar-la amb la capacitat de reinnervar en els animals WT i *Smn$^{2B/-}$*. En primer lloc es va quantificar el nombre de NMJs que presentaven immunomarcatge amb l'anticòs contra el neuropèptid, i es va observar una disminució en els animals malalts respecte als WT, tal i com succeïa en el TA i IC (**Figura 61A**). La paràlisis amb toxina va provocar un increment significatiu de plaques que expressaven CGRP en ambdós condicions, però els ratolins *Smn$^{2B/-}$* no van assolir valors tan elevats d'expressió com els WT. L'anàlisi de la intensitat dels píxels ocupats pel marcatge amb l'anticòs contra CGRP mitjançant el software ImageJ va revelar un augment de la immunoreactivitat en els animals WT injectats amb toxina en comparació dels salins. Aquest increment del contingut de CGRP no es va produir en les plaques motores dels animals malalts injectats (**Figura 61B**). Malgrat que es va intentar fer una correlació individual de les NMJs que expressaven neuropèptid amb aquelles que presentaven o no *sprout* (dades no mostrades), no es va arribar a cap resultat concloent, no mostrant-se una relació entre els dos esdeveniments en una mateixa NMJ No obstant, si va ser evident l'elevat increment de CGRP als músculs dels animals injectats amb toxina. Aquests

resultats en conjunt mostren que el menor increment de CGRP en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ després de la injecció de la toxina botulínica es correlaciona amb una menor resposta en la formació d'*sprouts*.

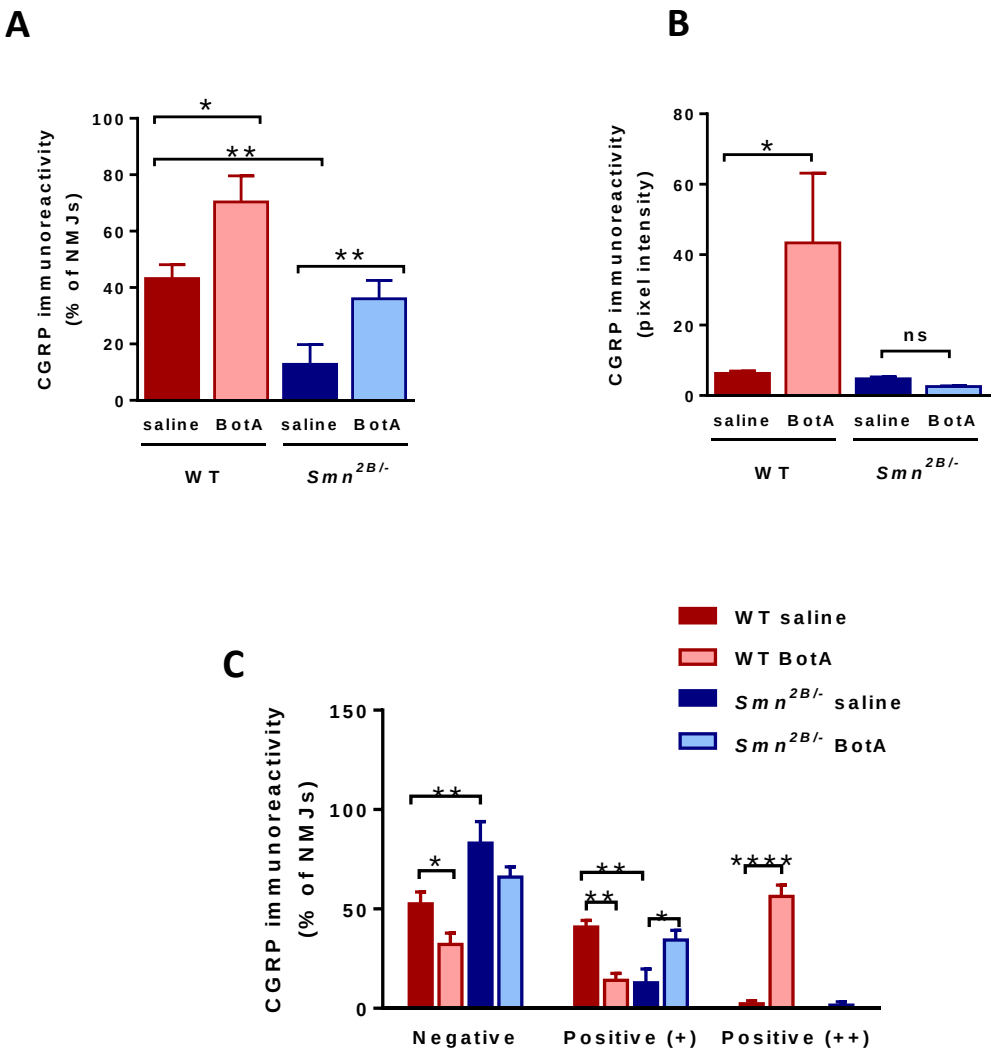


Figura 61. Expressió del neuropèptid CGRP en el múscul LAL posteriorment a la injecció de toxina BotA en el model murí Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de NMJs immunoreactives per al CGRP en el LAL d'animals WT i Smn$^{2B/-}$. (B) Intensitat d'expressió de CGRP a les NMJs calculada per la intensitat de píxel i (C) classificades en negatiu, positiu i molt positiu. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001; n=3 animals per condició.*

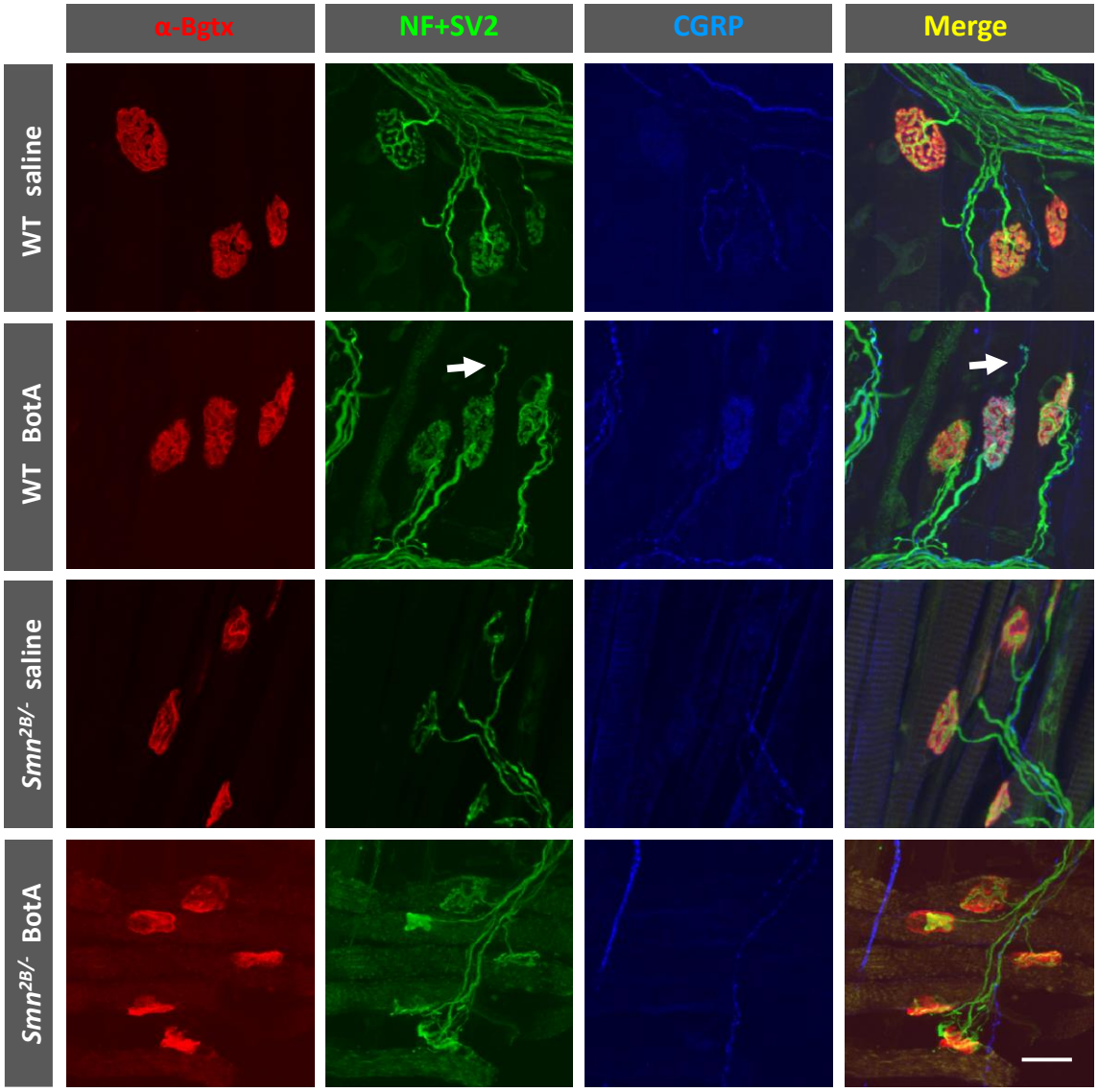


Figura 62. Imatges representatives de les NMJs del múscul LAL posteriorment a la injecció de toxina botulínica (BotA) en animals WT i Smn$^{2B/-}$. *El terminal postsinàptic es va marcar amb α-Bgtx (roig), i el presinàptic amb NF i SV2 (verd), en blau es mostra la immunoreactivitat per al CGRP. Barra de calibració= 20 µm.*

La proteïna Gap-43 està implicada en la regulació del creixement axonal i en l'estabilitat dels cons de creixement [318, 319], així com en el procés d'*sprouting* posterior al dany axonal [320, 321]. Va cridar l'atenció que, tant en la quantificació de NMJs que presentaven immunoreactivitat per a l'anticòs contra Gap-43, com en l'estudi de la intensitat de l'expressió de la proteïna, els animals malalts mostraven de base una expressió de proteïna Gap-43 incrementada quan es comparaven amb els animals sans (**Figura 63**). Posteriorment a la injecció amb BotA, es va observar un augment evident de l'expressió de la proteïna en ambdós fenotips. No obstant, aquest augment va ser estadísticament significatiu únicament en la

quantificació de la intensitat de l'expressió de Gap-43 en el cas dels animals *Smn*$^{2B/-}$. Tot i observar un augment dels nivells de la proteïna en les condicions on s'havia injectat toxina, de la mateixa manera que el CGRP no es va poder correlacionar amb les NMJs que presentaven *sprouts*, tampoc no es va trobar una relació individual directa entre les plaques positives per a Gap-43 i aquelles que presentaven *sprouting*.

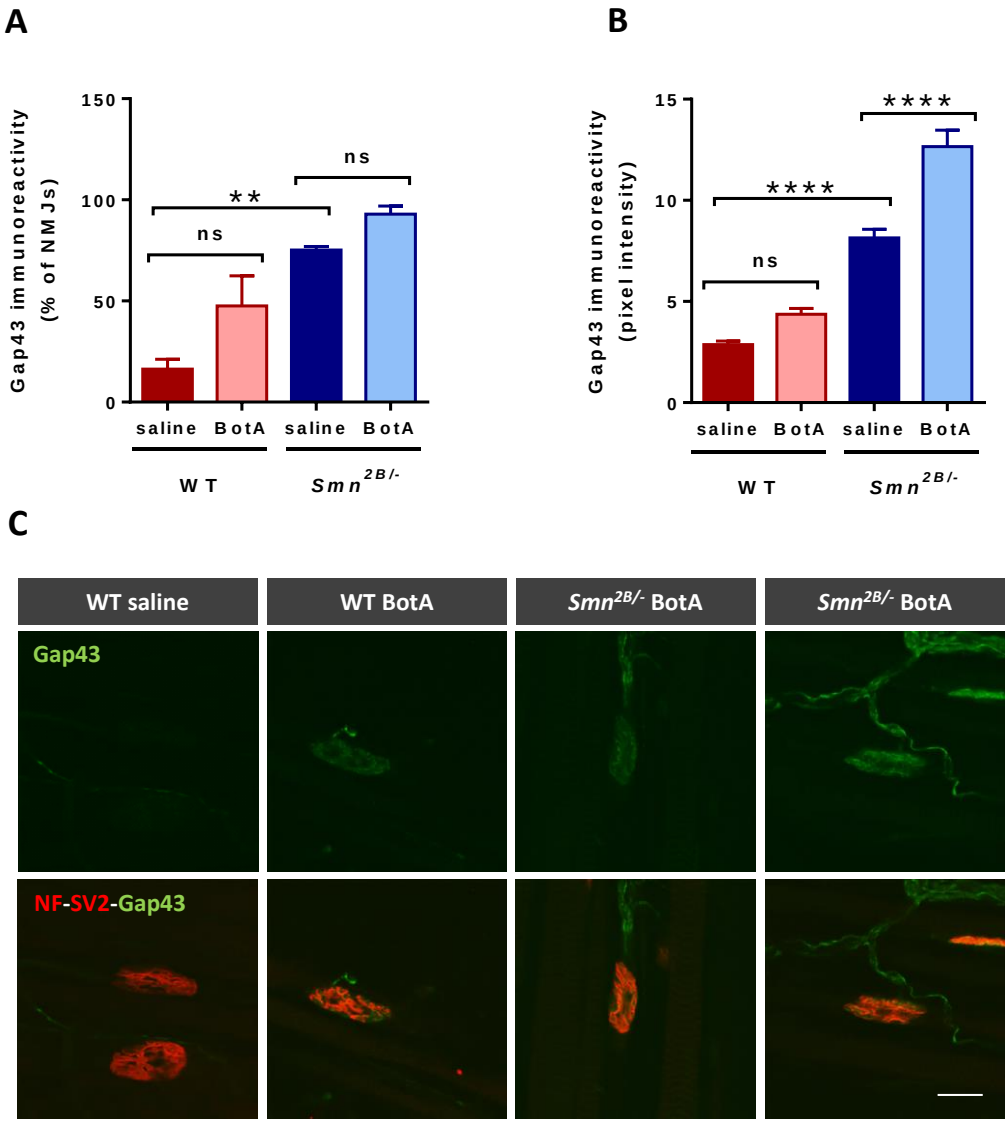


Figura 63. Expressió de la proteïna Gap-43 en el múscul LAL posteriorment a la injecció de toxina BotA en el model murí Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de NMJs immunoreactives per a Gap43 en el LAL d'animals WT i Smn$^{2B/-}$. (B) Intensitat d'expressió de Gap43 a les NMJs. (C) Imatges representatives de les NMJs del LAL després de l'immunomarcatge amb Neurofilament i SV2 (roig) i Gap-43 (verd). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01, ****p<0,0001; n=3 animals per condició. Barra de calibració= 20 µm.*

Afectació multisistèmica en el model d'AME *Smn$^{2B/-}$*.

Cada dia són més els estudis que assenyalen l'AME com una malaltia multisistèmica, havent-se reportat defectes en diversos òrgans apart del sistema neuromuscular, tant en models animals d'AME com en pacients (revisat a [322, 323]). En aquest apartat es va estudiar si el model murí *Smn$^{2B/-}$* presentava afectació de diferents òrgans i sistemes. En els animals malalts es va observar una afectació a nivell macroscòpic de tots els òrgans estudiats (cor, pulmó, fetge, ronyó, timus i melsa), mostrant tots ells i en tots els punts estudiats (P1, P10, P20 i P30) una mida i un pes menors en relació amb els presentats pels mateixos òrgans en ratolins WT. Amb l'objectiu de determinar si aquestes diferències eren degudes a una atròfia produïda per la malaltia, i no a variacions en el pes corporal dels animals de les diferents condicions, es va calcular el pes relatiu dels òrgans respecte al pes corporal. En el cas del cor, els valors obtinguts van ser similars per als ratolins *Smn$^{2B/-}$* i els WT, a excepció de P30 on el percentatge de pes corporal va ser lleugerament superior en el cas dels animals malalts (**Figura 64**). Una situació similar es va veure pel que fa al pulmó (**Figura 65**). En el cas del ronyó no es van observar diferències entre les dos condicions fins P20, moment en el qual es van detectar valors més alts en els animals afectats per l'AME, mantenint-se aquesta diferència fins a l'etapa final de la malaltia (**Figura 66**). En canvi, el fetge es va presentar similar en les dos condicions, fins l'últim punt, on els ratolins sans van mostrar valors més elevats (**Figura 67**). Va cridar l'atenció la marcada afectació dels òrgans del sistema immunitari. Tot i que en el cas del timus la diferència en el percentatge de pes corporal no va ser significativa fins P30, aquesta va ser molt notable (WT: 0,68±0,05; *Smn$^{2B/-}$*: 0,14±0,03) (**Figura 68**). Per al cas de la melsa, en edats primerenques, tals com P1 ja es van observar diferències significatives, fent-se més notables a P20 (WT: 0,54±0,03; *Smn$^{2B/-}$*: 0,03±0,006) (**Figura 69**).

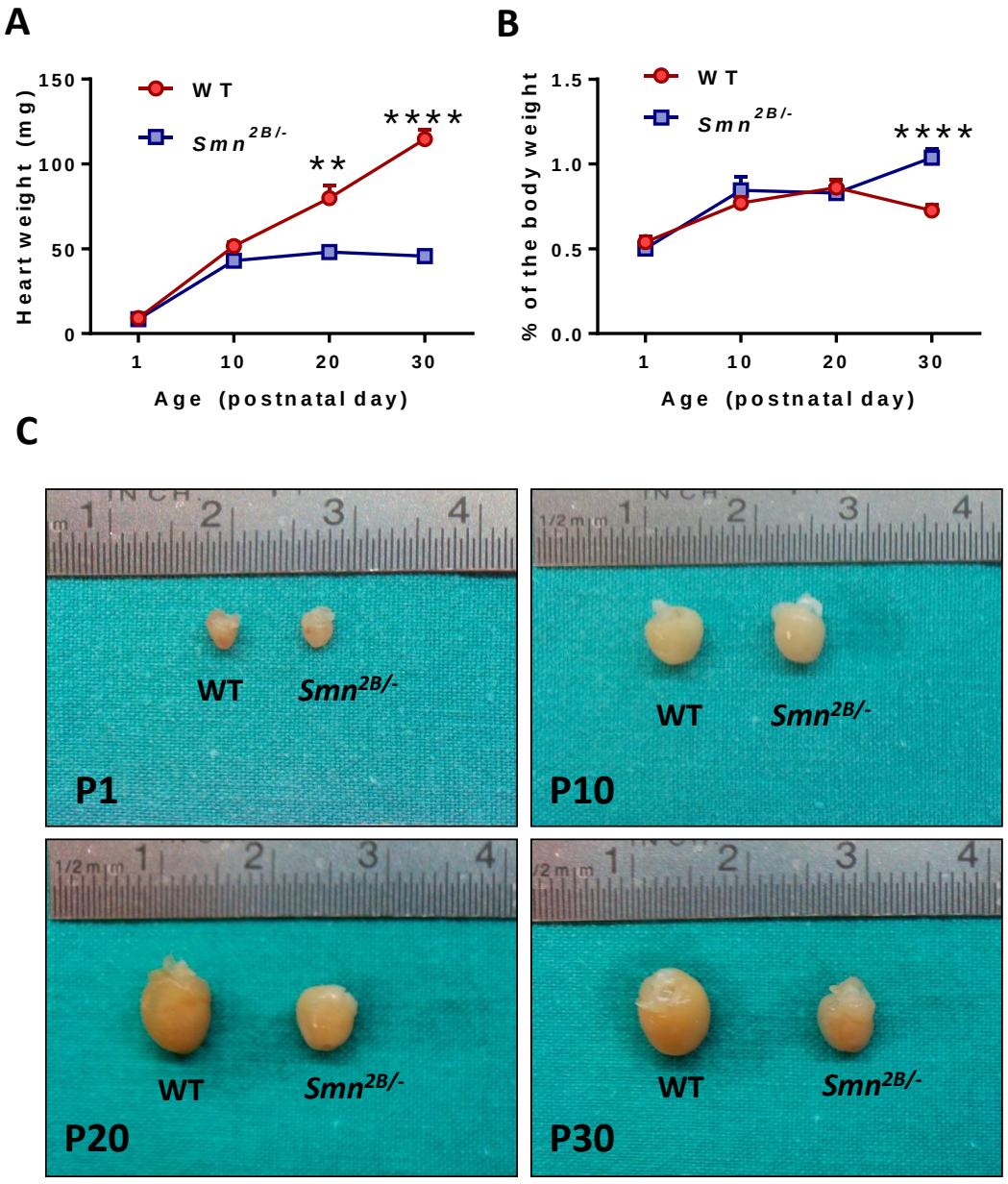


Figura 64. Afectació del cor en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) del cor dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; **p<0,01, ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia del cor en les diferents edats i condicions.*

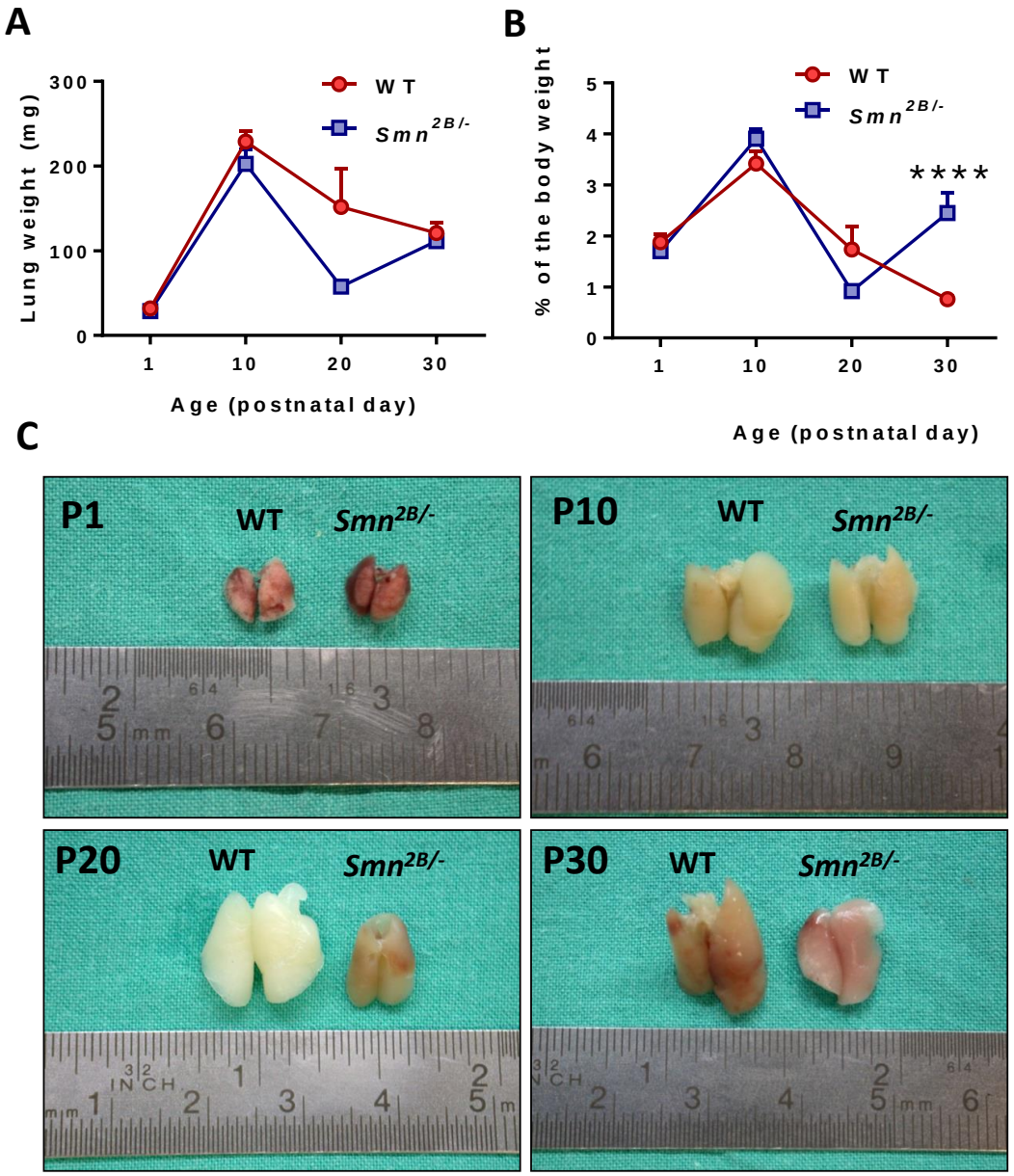


Figura 65. Afectació del pulmó en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) del pulmó dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia del pulmó en les diferents edats i condicions.*

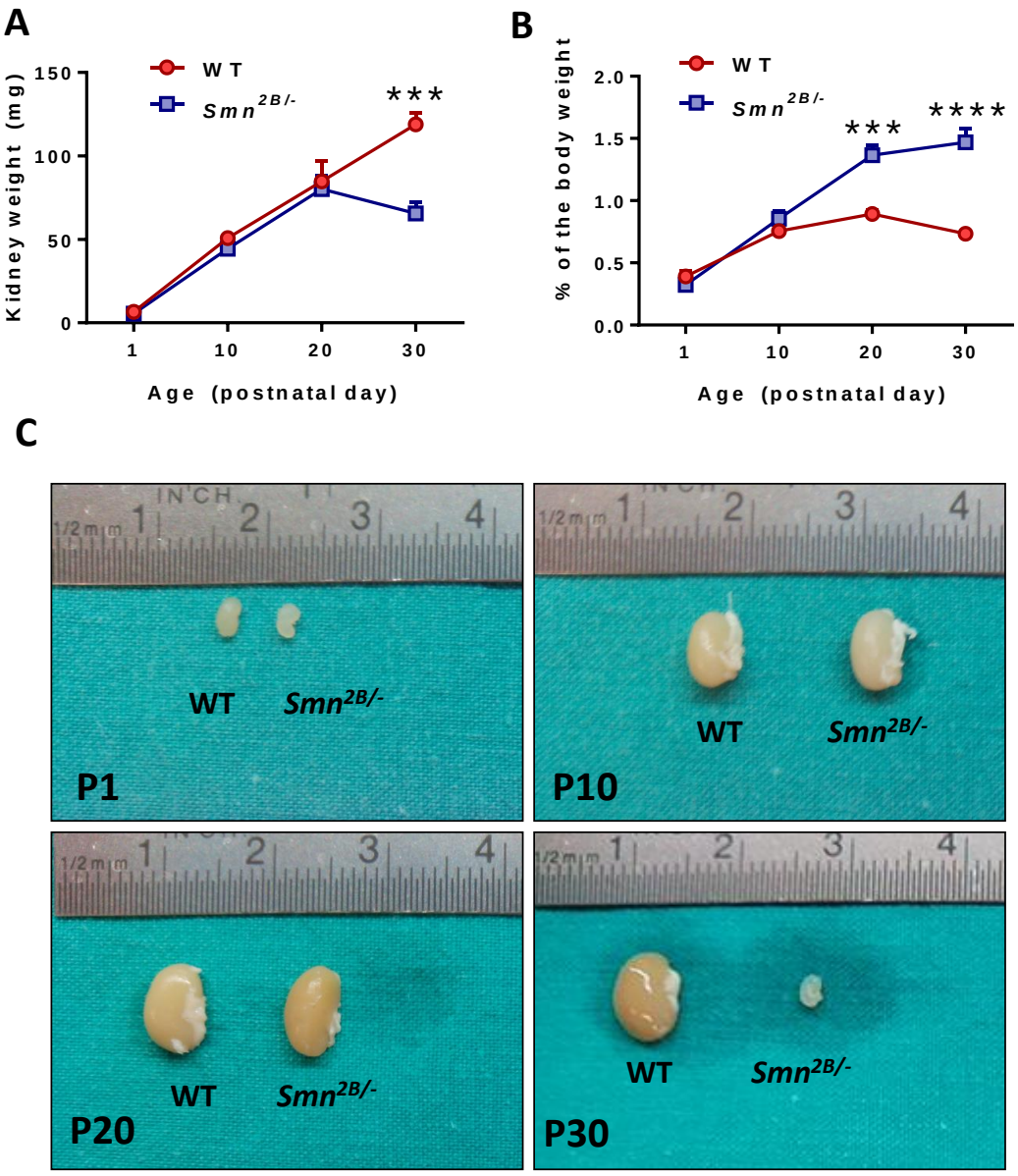


Figura 66. Afectació del ronyó en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) del ronyó dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; ***p<0,001, ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia del ronyó en les diferents edats i condicions.*

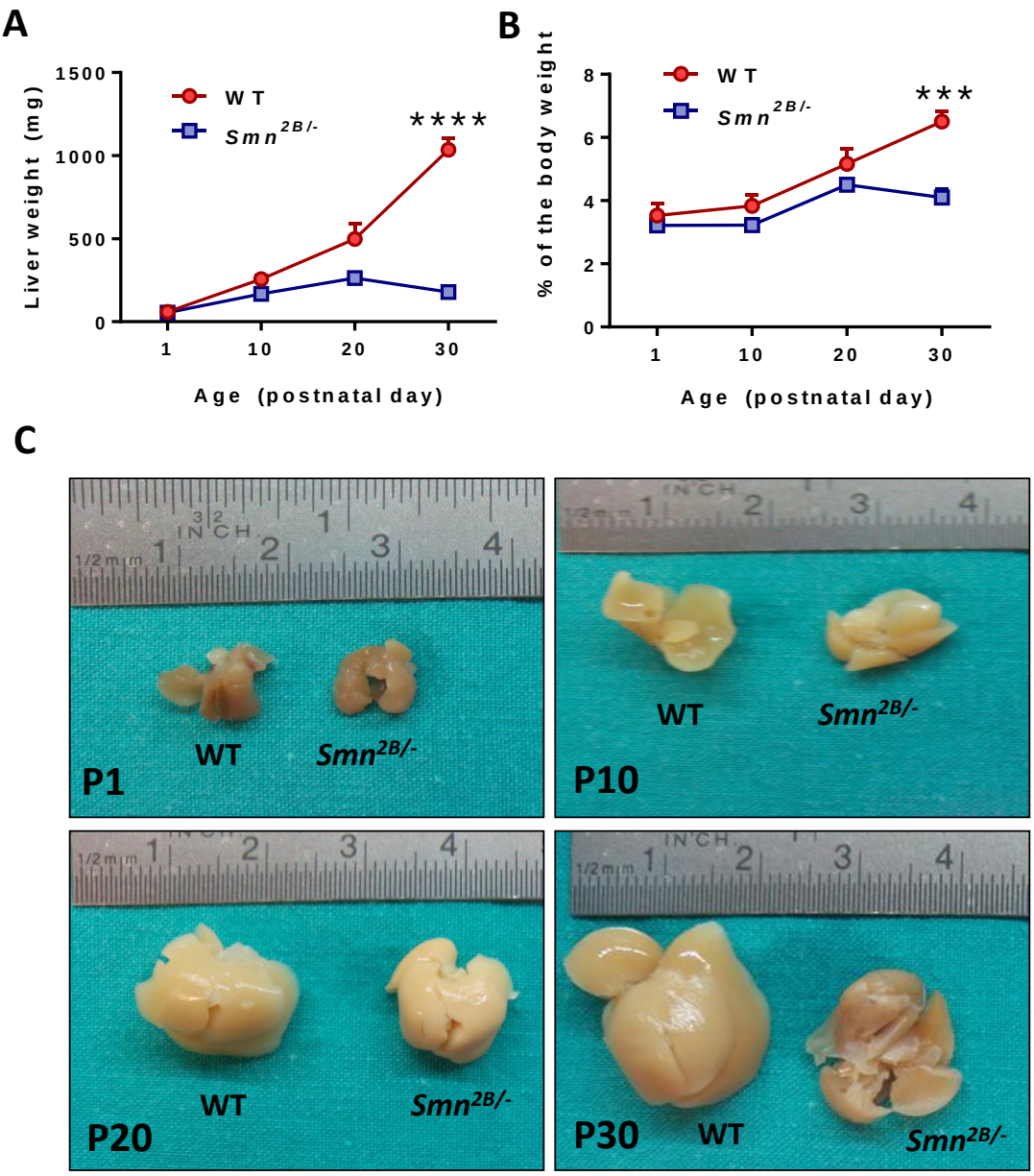


Figura 67. Afectació del fetge en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) del fetge dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; ***p<0,001, ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia del fetge en les diferents edats i condicions.*

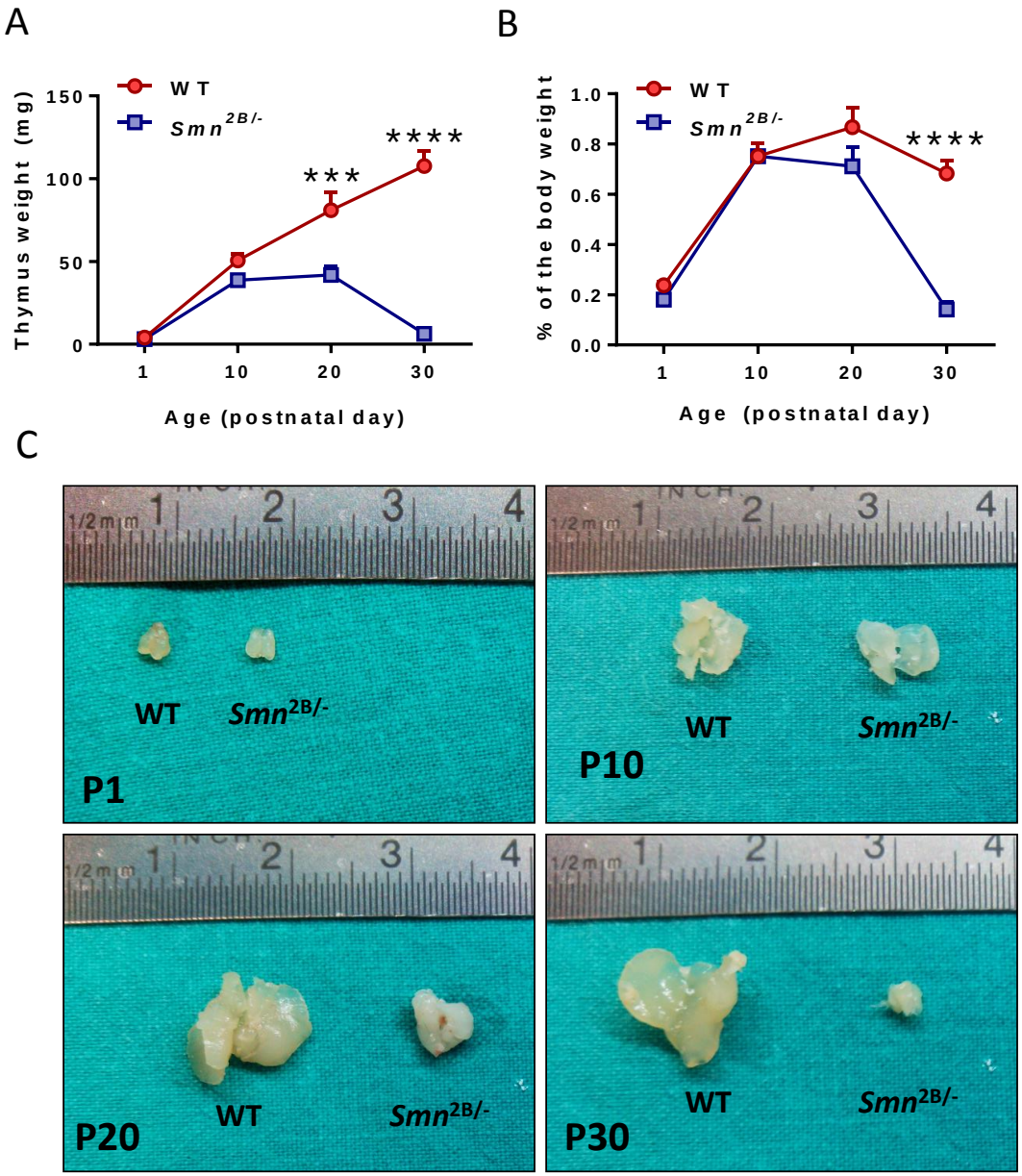


Figura 68. Afectació del timus en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) del timus dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; ***p<0,001, ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia del timus en les diferents edats i condicions.*

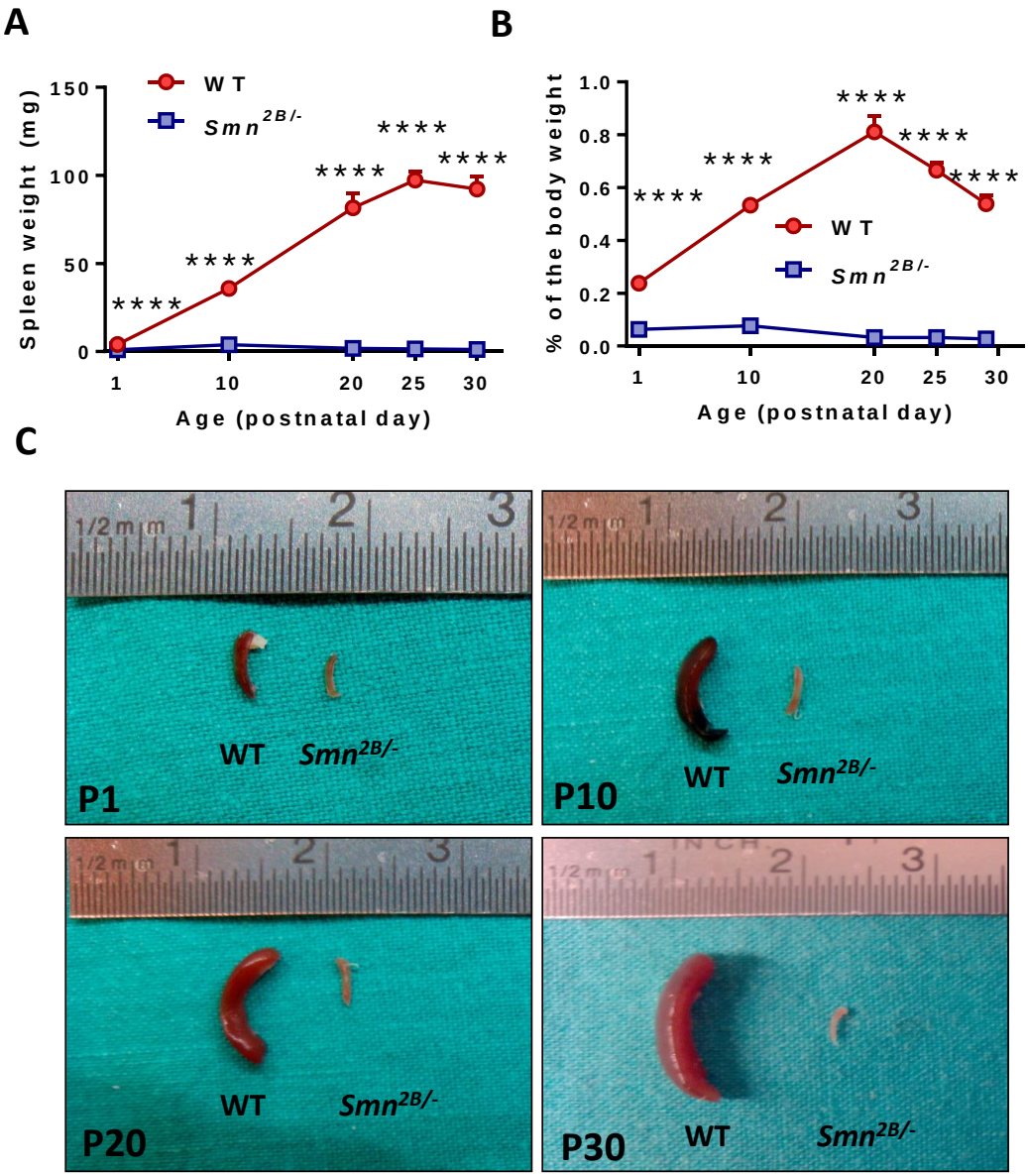


Figura 69. Afectació de la melsa en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Pes absolut (A) i relatiu (B) de la melsa dels animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia (n=6-10 animals per edat i condició experimental; ***p<0,001, ****p<0,0001, [Student's test]). (C) Imatges representatives de la macro-morfologia de la melsa en les diferents edats i condicions.*

A continuació es va realitzar un estudi histològic de la melsa amb seccions de parafina tenyides amb hematoxilina-eosina. Les melses dels animals malalts presentaven una marcada depleció limfocitària i una reducció de la mida dels fol·licles en relació amb els ratolins sans, fins al punt que era possible observar al microscopi òptic extenses àrees de teixit connectiu que envoltava l'artèria esplènica (**Figura 70**).

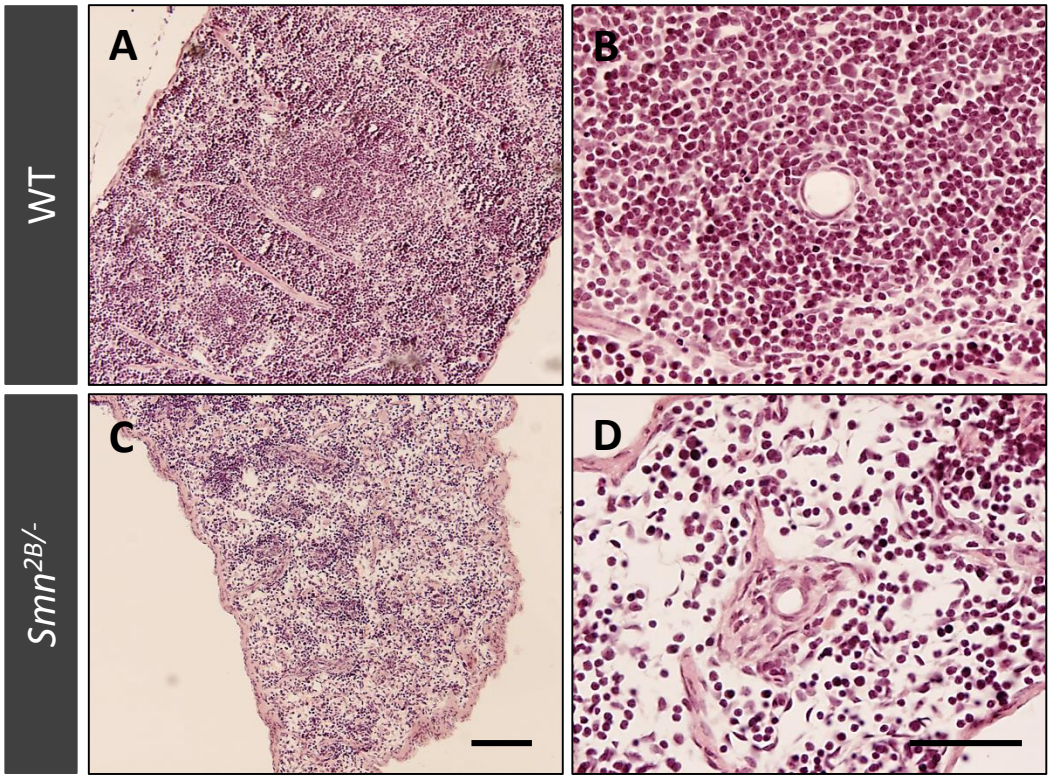


Figura 70. Afectació de la melsa en el model Smn$^{2B/-}$. *Imatges representatives de seccions de la melsa d'animals WT (A-B) i Smn$^{2B/-}$ (C-D) tenyides amb hematoxilina-eosina. Barra de calibració en (C)= 100 µm s'aplica a (A) i en (D)= 50 µm s'aplica a (B).*

Per tal d'esbrinar si la depleció de limfòcits als fol·licles de la melsa dels animals malalts era conseqüència de la mort d'aquests per apoptosi es va realitzar la tècnica del TUNEL per quantificar els esdeveniments apoptòtics presents en les melses d'animals *Smn$^{2B/-}$* i WT de P10. Els resultats van revelar un increment de mort cel·lular apoptòtica en la melsa dels ratolins afectats per la malaltia (**Figura 71**).

Paral·lelament, es va realitzar un estudi limfocitari de la melsa mitjançant citometria de flux, utilitzant anticossos que van permetre diferenciar entre les diferents poblacions de limfòcits en funció dels marcadors de superfície que aquests expressen: CD19 en el cas del limfòcits B, CD4 pel que fa als limfòcits T helper (T_h) i CD8 en el cas dels limfòcits T citotòxics (T_c). Els resultats van revelar una disminució en la melsa dels animals malalts de la població de

limfòcits T_h i dels limfòcits T_c, i un augment de limfòcits T doble positius (CD4+/CD8+), indicant una forta presència de formes immadures d'aquesta subpoblació. A més, es va observar una notable reducció de limfòcits B en la melsa dels ratolins afectats (**Figura 72A**). La mateixa anàlisi es va realitzar al timus, i a diferència de la melsa, no es van detectar diferències en les poblacions de limfòcits T immadurs, ni en els limfòcits T_c, però sí que es va observar una disminució dels T_h (**Figura 72B**).

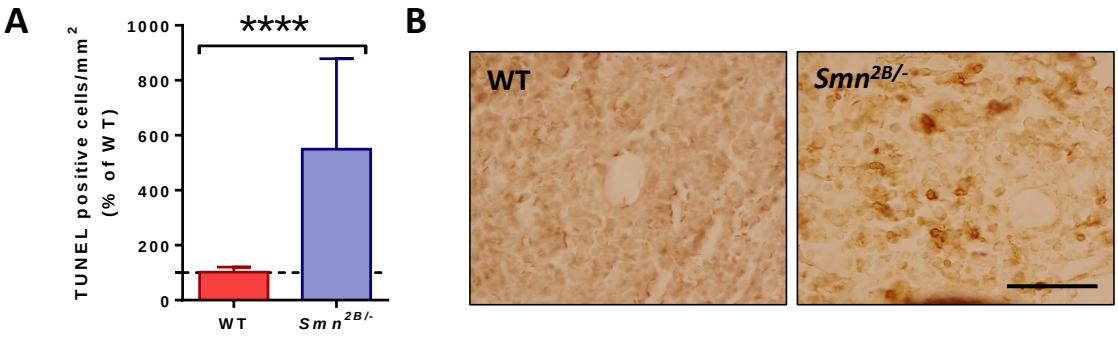


Figura 71. Mort per apoptosi en la melsa del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació de les apoptosis en la melsa d'animals WT i Smn$^{2B/-}$ quantificades en crioseccions posteriorment a la reacció TUNEL. (B) Imatges representatives de les apoptosis en la melsa. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", ****p<0,0001; n=3-4 animals per condició. Barra de calibració=50 µm.*

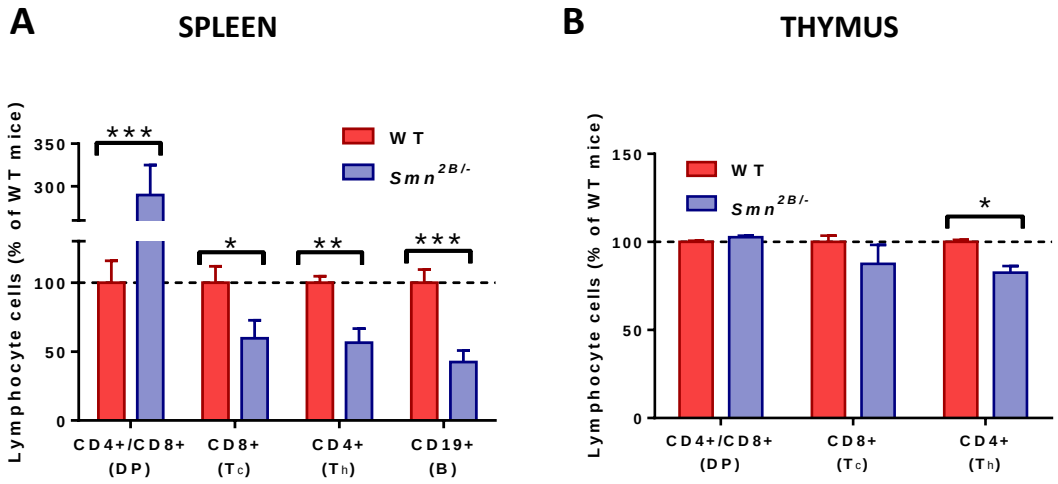


Figura 72. Població de limfòcits a la melsa i al timus del model murí Smn$^{2B/-}$. *Percentatge de limfòcits expressant diferents marcadors de superfície a la melsa (A) i al timus (B) d'animals P10 WT i Smn$^{2B/-}$ quantificats mitjançant citometria de flux. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; n=6-10 animals per condició en (A) i 3 en (B).*

A continuació, es va realitzar una immunotinció de seccions de criostat del timus, per estudiar l'expressió de MHC de classe II, així com del factor de transcripció AIRE per tal d'esbrinar si la disminució de limfòcits CD4+ estava causada per defectes en les molècules implicades en la seua maduració. La primera, MHC II, és necessària per a la selecció positiva dels limfòcits, mentre que la segona és l'encarregada de la selecció negativa d'aquests. L'anàlisi qualitativa de les immunotincions no va revelar cap diferència rellevant (dades no mostrades).

Per estudiar si la disminució de limfòcits a la melsa estava produïda únicament per la mort d'aquests, o bé per un defecte en la producció dels limfòcits B al moll de l'os, es va portar a terme un examen més exhaustiu per a detectar marcadors de superfície de les diferents etapes maduratives: c-kit o CD117, IL-7R o CD127, B220 o CD45R i CD19, de més immadur a més madur (**Figura 73**).

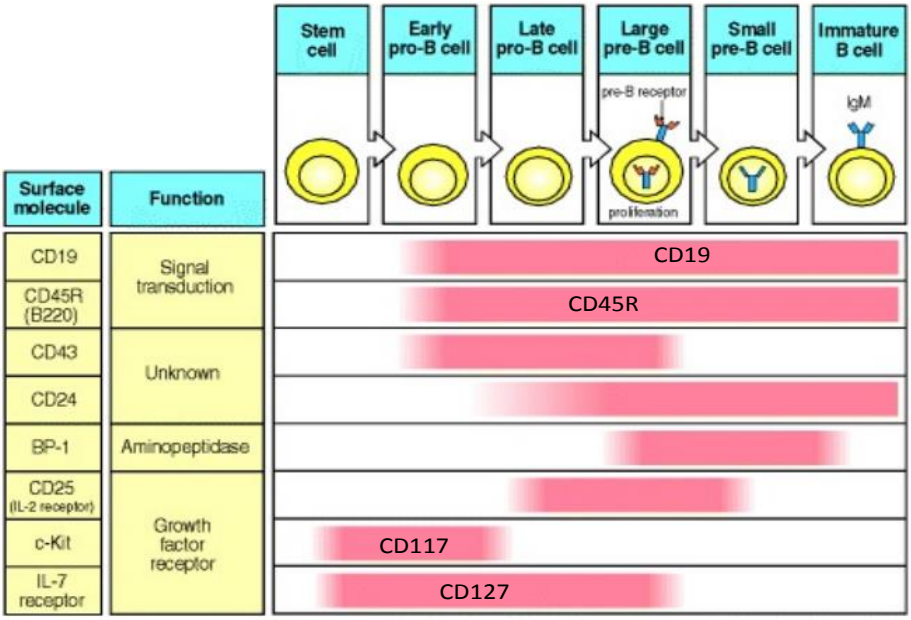


***Figura 73. Esquema del grau de maduració dels limfòcits B i marcadors de superfície que expressen**. Figura adaptada de [324].*

Al moll de l'os no es van observar diferències entre els animals WT i els *Smn*$^{2B/-}$ en les etapes més inicials de la maduració dels limfòcits B (CD117 i CD127), però sí que es va detectar una reducció de les formes més madures d'aquesta població (CD45R i CD19) (**Figura 74A**). A més, es va estudiar l'expressió del SCF (*Stem cell factor*), citoquina que s'uneix al receptor CD117, i que actua com a factor de creixement estimulant l'hematopoesi al moll de l'os. No es van observar diferències significatives en l'expressió del SCF entre els animals sans i els malalts

(**Figura 74B**). En el cas de la melsa, les diferències de les subpoblacions limfocitàries entre les dos condicions van ser més marcades, observant-se un clar increment de les formes immadures i una notable disminució de les més madures en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ (**Figura 74C**).

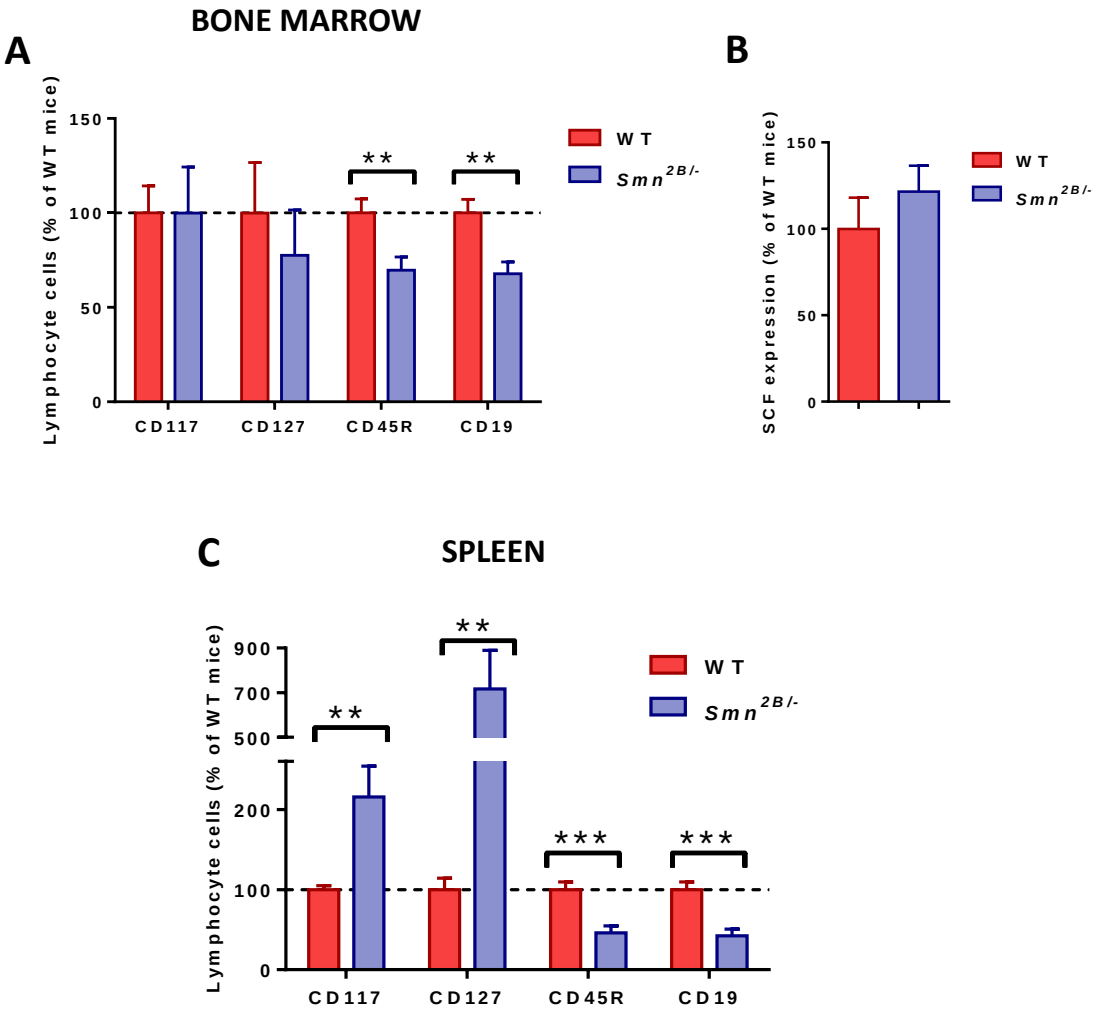


Figura 74. Expressió de diferents marcadors de superfície al moll de l'os i la melsa en el model murí Smn$^{2B/-}$ analitzats mitjançant citometria de flux. *(A) Percentatge de limfòcits expressant diferents marcadors de superfície al moll de l'os. (B) Expressió de SCF al moll de l'os. (C) Percentatge de limfòcits expressant diferents marcadors de superfície a la melsa. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01, ***p<0,001; n=6-11 animals per condició en (A) i 6-7 en (B).*

Per altra banda, es va voler explorar quina subpoblació de limfòcits B estava sofrint el procés de mort cel·lular. Així, es va analitzar la presència d'apoptosi per citometria de flux mitjançat l'ús d'annexina V combinada amb els marcadors dels diferents estadis maduratius. En condicions normals la fosfatidilserina es localitza a la part citosòlica de la membrana plasmàtica, en canvi, a l'inici del procés apoptòtic perd la seua distribució asimètrica i es transloca a la membrana extracel·lular. L'annexina V s'uneix a la fosfatidilserina i permet

identificar cèl·lules sotmeses al procés apoptòtic. L'anàlisi no va posar de manifest la presència de mort cel·lular al moll de l'os en cap de les subpoblacions estudiades (**Figura 75A**). En canvi, a la melsa es va detectar un marcat increment de la mort per apoptosi de les formes més madures dels limfòcits, aquells que expressaven el marcador CD19 (**Figura 75B**).

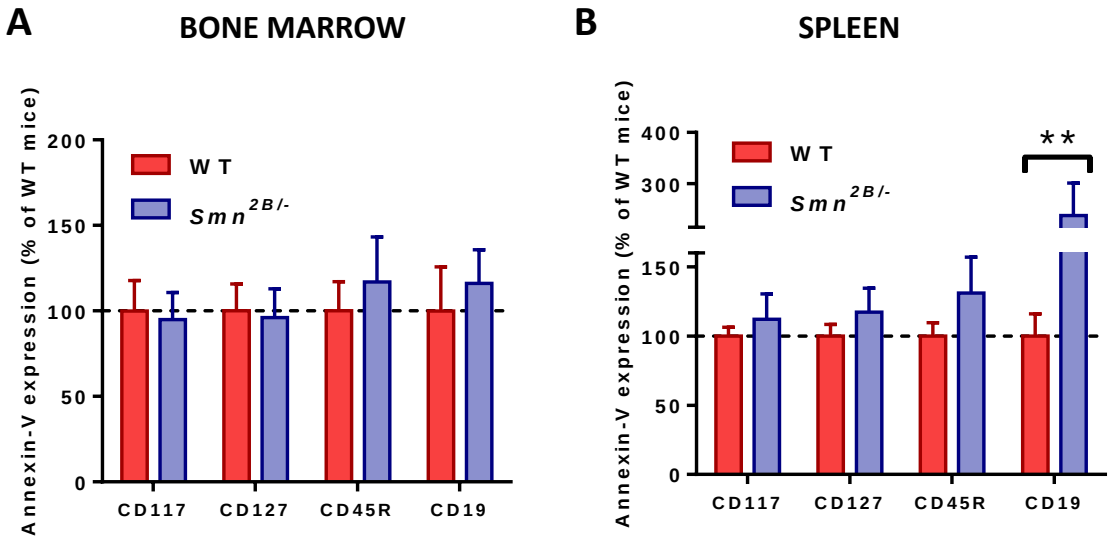


Figura 75. Expressió d'annexina-V i diferents marcadors de superfície al moll de l'os i la melsa en el model murí Smn$^{2B/-}$ analitzats mitjançant citometria de flux*. Percentatge de les diferents poblacions limfocitàries que expressen annexina- al moll de l'os (A) i a la melsa (B). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", **p<0,01, ***p<0,001; n=6-8 animals per condició.*

Tenint en compte tots els resultats comentats, es pot concloure que l'atròfia observada a la melsa dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ estaria causada, en primer lloc, per un defecte en la producció i maduració de limfòcits B al moll de l'os i, en segon lloc, per la mort d'aquests a la melsa.

Com que les poblacions de limfòcits que es van veure afectades a la melsa dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ van ser aquelles encarregades del reconeixement d'antigen (T_h i B) es va analitzar l'expressió de MHC de classe II a la melsa, molècula implicada en aquest procés. La població cel·lular que expressava MHC II es va veure dràsticament reduïda a la melsa dels animals malalts, tal i com va revelar l'estudi mitjançant citometria de flux, no obstant, la intensitat amb què aquestes cèl·lules expressaven la molècula va ser similar en ambdós condicions. A més, es va realitzar una immunotinció de crioseccions de la melsa amb l'anticòs contra MHC II i es va observar una major organització estructural de les cèl·lules immunoreactives en les mostres procedents dels ratolins WT, les quals s'observaven formant els fol·licles típics de la polpa blanca de la melsa. En canvi, en els animals *Smn*$^{2B/-}$ la distribució del marcatge amb l'anticòs

contra MHC II va ser més irregular, evidenciant una desestructuració dels fol·licles i una disminució de limfòcits al voltant de les arteries centrals (**Figura 76**).

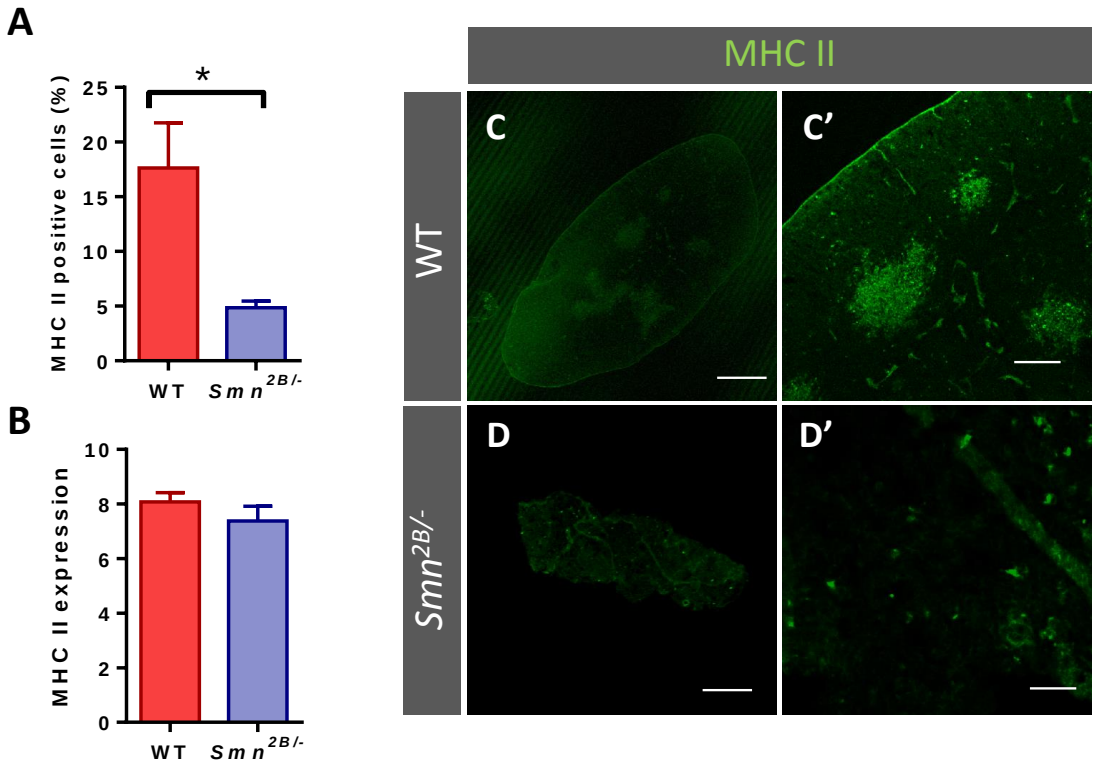


Figura 76. Expressió de MHC de classe II en la melsa del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de cèl·lules que expressen MHC II i (B) intensitat en que expressen la molècula estudiat per citometria de flux. (n=4animals; *p<0,05, [Student's test]). (C-D') Imatges representatives del immunomarcatge amb MHC de classe II en crioseccions de melsa. Barra de calibració=400 µm en (C), 200 µm en (C') i (D), 30 µm en (D').*

A continuació, es va estudiar si les diferències d'expressió d'aquesta molècula, juntament amb la reducció de les poblacions de limfòcits B i T_h, tenia com a conseqüència una disminució de cèl·lules plasmàtiques i per tant una reducció de la capacitat de produir immunoglobulines. Amb aquest propòsit, es va portar a terme una anàlisi mitjançant Western Blot d'extractes de melsa de les dos condicions estudiades. Els resultats van revelar que els animals afectats per l'AME presentaven una disminució del contingut d'immunoglobulines G a la melsa (**Figura 77**), no obstant, no es van assolir diferències significatives, probablement degut a la pròpia variabilitat entre animals i/o al baix nombre de mostres estudiades (n=4).

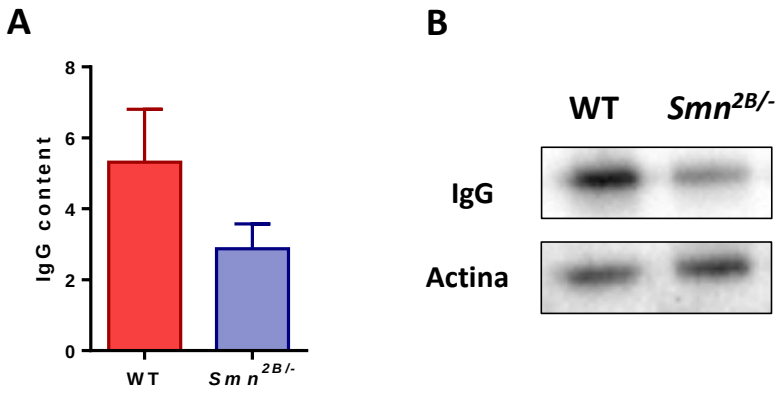


Figura 77. Expressió d'immunoglobulines G en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació dels nivells d'IgG en la melsa d'animals P10 WT i Smn$^{2B/-}$ i (B) Western Blots representatius. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", p>0,05; n=4 animals per condició.*

V. RESULTATS

CAPÍTOL 2

ASSAIG TERAPÈUTIC AMB PRE-084, AGONISTA DEL RECEPTOR SIGMA-1, EN ELS MODELS SMNΔ7 I *Smn*$^{2B/-}$

1. INTRODUCCIÓ

En les malalties neurodegeneratives les diverses subpoblacions neuronals presenten diferent susceptibilitat front a la degeneració (revisat a [325]) i aquesta sembla estar relacionada amb l'excitabilitat d'aquestes cèl·lules [326]. En condicions de repòs, la membrana plasmàtica de les neurones es troba polaritzada, però els senyals continus que li arriben provoquen que aquesta polarització oscil.le. Quan aquests estímuls assoleixen un cert llindar, s'inicia l'anomenat potencial d'acció on la neurona s'excita i la membrana plasmàtica es despolaritza degut a l'apertura de canals de sodi dependents de voltatge. Aquest potencial d'acció es propaga al llarg de la membrana plasmàtica allunyant-se del lloc d'inici i és conduit al llarg de les neurites, el que és conegut com impuls nerviós. Aquest potencial d'acció és breu, ja que la permeabilitat als ions Na^+ s'interromp i augmenta la permeabilitat als ions K^+, provocant de nou la repolarització de la membrana i la subsegüent hiperpolarització. En aquest estat, el llindar d'excitació necessari per tornar a excitar la neurona és major, de manera que es requerirà un potencial d'acció més intens per tornar a despolaritzar la membrana i, per tant, excitar la neurona. La durada i la intensitat d'aquest estat d'hiperpolarització és el tret diferencial que mostren les diferents poblacions de motoneurones: les MNs "*Fast*" presenten una major hiperpolarització, de manera que és més difícil tornar a assolir el llindar d'excitabilitat i, per tant, són neurones menys excitables; en canvi, les MNs "*Slow*" requereixen un menor potencial d'acció per tornar a ser despolaritzades i són altament excitables. Així, l'excitabilitat de les MNs i la vulnerabilitat estarien inversament relacionades, és a dir, les MNs menys excitables serien les més vulnerables (MNs "*Fast*"), mentre que les més fàcilment excitables serien les més resistents a la degeneració (MNs "S*low*") [326]. Aquests mateixos autors, entre altres [327, 328], defensen que els ínputs colinèrgics que es reben al soma de les MNs-α, i que són anomenats botons C, modulen l'excitabilitat d'aquestes cèl·lules, i serien en última instància els responsables de la major o menor vulnerabilitat de les MNs front a la degeneració en el context de les malalties de la motoneurona.

Les sinapsis del botó C estan associades a estructures postsinàptiques altament especialitzades i formades per un complex de molècules, la funció de les quals no és del tot coneguda (**Figura 78**). La característica més rellevant és la presència d'una cisterna subsinàptica (SSC), la qual es troba adjacent a la membrana postsinàptica i sembla estar relacionada amb el reticle endoplasmàtic. A més, l'organització molecular inclou clústers de receptors muscarínics metabotròpics de tipus m2 [329], canals de potassi Kv2.1 i SK [330], molècules tals com connexin 32 que suggereixen una comunicació directa entre la membrana postsinàptica i la SSC [331], així com neuregulina (NRG) [332] i clústers de receptors Sigma-1

(σ-1R) [333]. Aquesta última molècula, es localitza, en el context dels botons C, concretament a la SSC.

El σ-1R és una proteïna transmembrana [334] que consta de 223 aminoàcids i 26 kDa [335], presenta funció de xaperona i es localitza als punts de contacte de les mitocòndries amb el reticle endoplasmàtic (MAM: *mitochondrion-associated ER membrane*) [336, 337]. Mutacions en el gen σ-1R s'han relacionat amb malalties de la MN, l'ELA entre altres [338, 339], i l'eliminació del gen σ-1R en el model murí d'ELA SOD1-G93A accelera la progressió d'aquesta malaltia [340]. A més, tant en pacients amb ELA com en models murins de la malaltia s'ha descrit una disminució dels nivells de proteïna σ-1R en la medul·la espinal [341].

El 2-(4-morpholinethyl)-1-phenylcyclohexanecarboxylate hydrochloride (PRE-084) és un agonista sintètic del σ-1R. S'ha reportat que el PRE-084 confereix neuroprotecció després de lesions excitotòxiques *in vitro* [342] i posteriorment a la lesió nerviosa *in vivo* [343]. A més l'administració de l'agonista en el model murí d'ELA SOD1-G93A protegeix front a la degeneració de les MNs i millora la funció motora dels animals afectats per la malaltia [344].

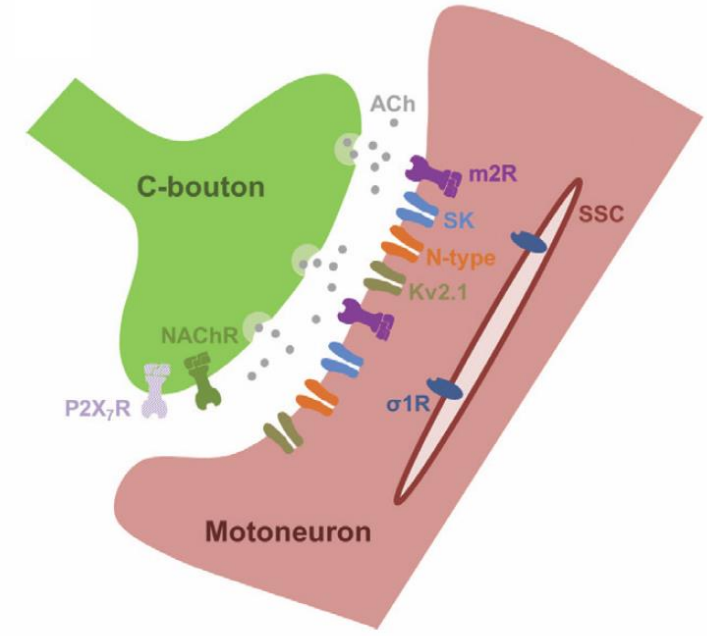


***Figura 78. Representació esquemàtic de les sinapsis al botó C**. Aquestes sinapsis són colinèrgiques, alliberant-se acetilcolina (ACh) i unint-se al seus receptors muscarínics de tipus m2 (m2R); a més, hi ha Canals de K^+ (Kv2.1) i canals de K^+ dependents de Ca^{2+} (SK). El receptor Sigma-1 (σ-1R) sembla estar localitzat a la cisterna subsinàptica (SSC). Figura extreta de [345].*

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Tenint en compte que l'ELA i l'AME comparteixen la degeneració i mort de les MNs, es va plantejar estudiar si l'agonista del receptor σ-1 (PRE-084) exerceix un efecte beneficiós en l'AME d'una manera similar a com s'ha reportat en ratolins afectats per l'ELA. Així, es va administrar el PRE-084 a dos models d'AME (el model murí *Smn*$^{-/-}$,*SMN2*$^{+/+}$, *SMNΔ7*$^{+/+}$ [SMNΔ7], i el model *Smn*$^{2B/-}$) i es va analitzar la supervivència i el comportament motor dels animals, l'expressió del receptor σ-1 i alguns dels defectes histopatològics de la malaltia.

3. RESULTATS

Expressió del receptor σ-1 en l'AME.

En primer lloc, i per caracteritzar els botons C en l'AME, es van estudiar les aferències colinèrgiques en el model *Smn*$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. Es va realitzar un immunomarcatge amb fluorescència en crioseccions de medul·la espinal utilitzant anticossos contra VAChT (*Vesicular acetylcholine transporter*) per immunotenyir els botons C, en combinació amb la tinció de Nissl per a identificar les MNs en funció de la seua mida, forma i localització i es van quantificar el nombre de sinapsis que estaven en contacte amb el soma de les MNs.

L'anàlisi al llarg del curs temporal de la malaltia va mostrar que no hi havia pèrdua d'aquestes sinapsis fins etapes terminals (**Figura 79**). Tenint en compte el grau d'atròfia de les MNs en el model *Smn*$^{2B/-}$ observat en el capítol anterior, les diferències observades a P10 en el nombre de perfils VAChT positius que estaven en contacte amb les MNs van quedar atenuades quan es va calcular la densitat sinàptica, ja que aquestes diferències serien conseqüència, no d'una pèrdua d'aferències, sinó d'una menor mida de les MNs dels animals *Smn*$^{2B/-}$. L'àrea dels botons C tampoc es va veure alterada en l'AME, calculada a P30 a partir dels perfils VAChT positius (**Figura 79D**).

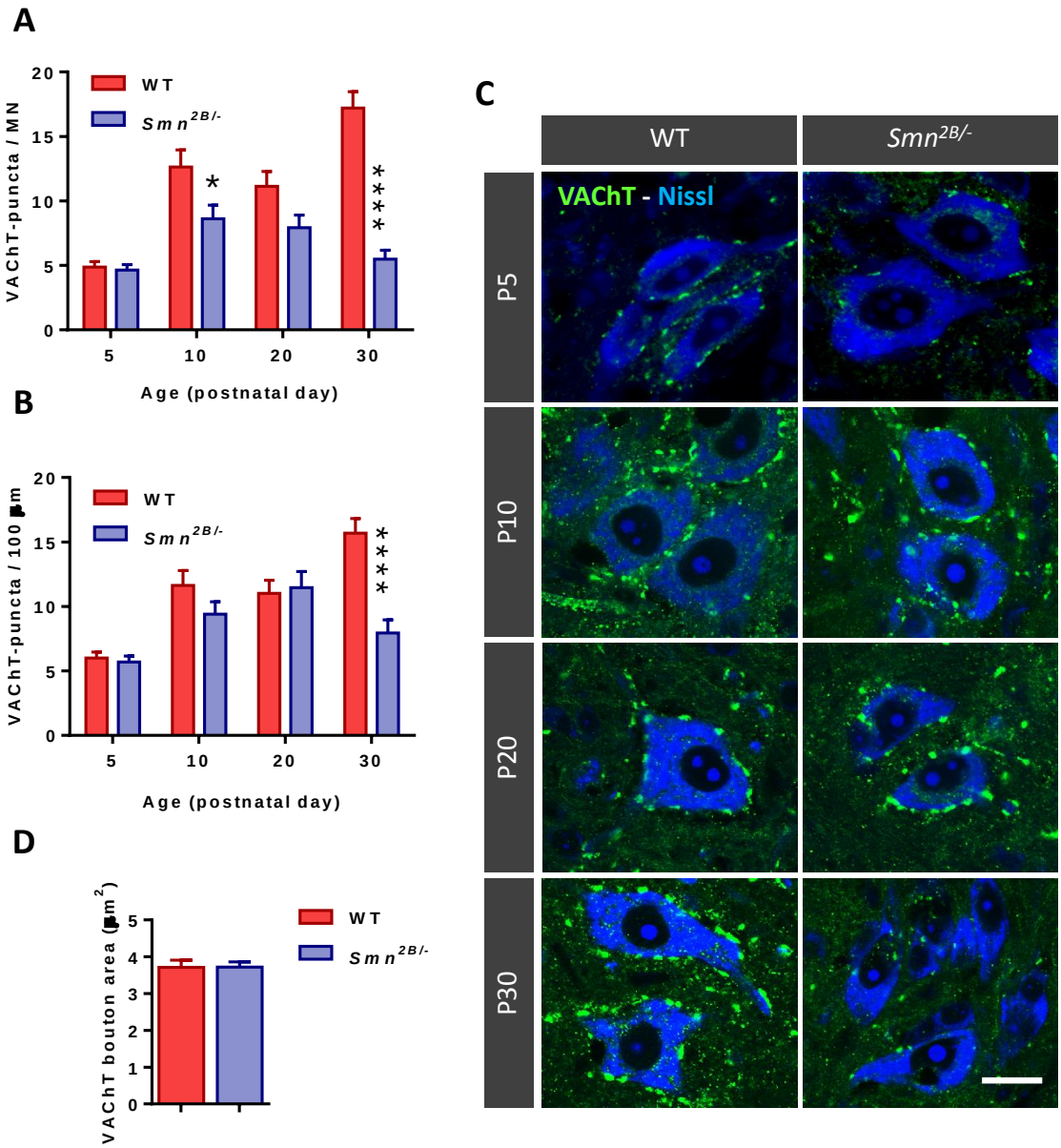


Figura 79. Afectació de les sinapsis colinèrgiques del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Nombre absolut de sinapsis positives per a VAChT que estan en contacte per cada MN que presenten els animals WT i Smn$^{2B/-}$. (B) Densitat de sinapsis colinèrgiques, expressada com el nombre de sinapsis per 100 unitats de longitud de perímetre. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, ****p<0,0001; n=20-60 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. (C) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl (blau) d'animals sans i malalts mostrant ínputs colinèrgics marcats amb l'anticòs VAChT (verd). (D) Àrea dels botons C en animals WT i Smn$^{2B/-}$ P30. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una "Student's t test", n=107-168 sinapsis de 3-4 animals. Barra de calibració=20 µm en (C).*

A més, es va estudiar la presència del receptor σ-1 i neuregulina-1 (NRG1) en els botons C, mitjançant l'anàlisi de colocalització utilitzant anticossos específics contra aquestes molècules conjuntament amb l'anticòs contra VAChT i la tinció de Nissl. A P10, els animals sans i malalts van presentar un nombre similar de sinapsis colinèrgiques que eren positives per al receptor σ-1, en canvi a P20 es va observar una disminució de l'expressió de σ-1R que es va mantenir fins P30 (**Figura 80**). A P5 no es va poder quantificar el nombre d'ínputs positius per a σ-1R, ja que no es va observar marcatge en la superfície de la MN.

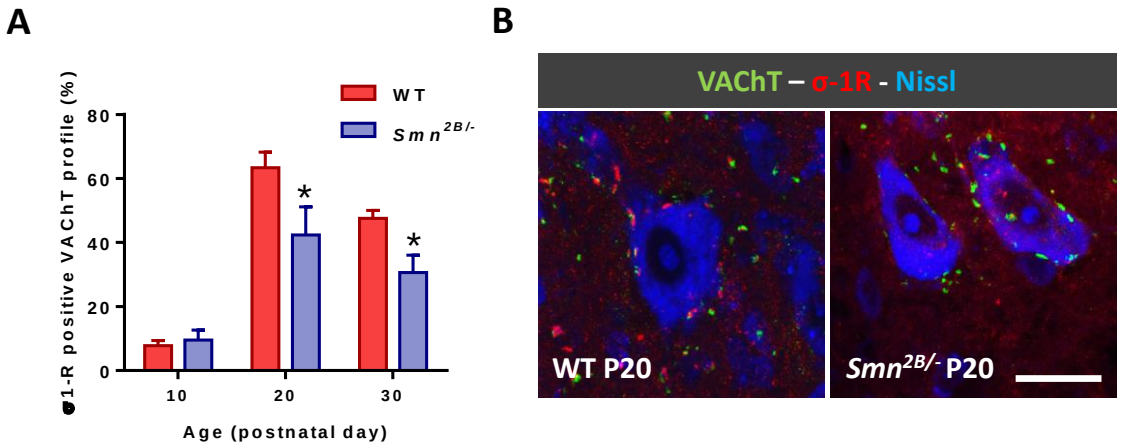


Figura 80. Expressió del receptor σ-1 en el botó C del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de sinapsis colinèrgiques que presenten immunoreactivitat per al σ-1R en animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl (blau) d'animals sans i malalts P20 mostrant ínputs colinèrgics marcats amb l'anticòs VAChT (verd) i expressió de σ-1R (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05; n=20-60 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (B).*

En el cas de la NRG, el nombre de sinapsis colinèrgiques que presentaven NRG va ser similar en els animals WT i els *Smn$^{2B/-}$* a P10 i P20, i no va ser fins P30, quan es va observar una disminució de l'expressió de NRG en els animals malalts (**Figura 81**).

Per corroborar que la pèrdua a σ-1R era anterior a la pèrdua de NRG en els botons C es va analitzar la colocalització d'aquestes dos molècules. Tal i com s'esperava, el nombre de sinapsis positives per a σ-1R que expressaven NRG no es va veure alterat fins P30 en els animals malalts (**Figura 82A**); en canvi, les sinapsis positives per a NRG que expressaven σ-1R es va trobar disminuïda a P20, però no així a P30, degut a que en aquesta edat la pèrdua de NRG probablement compensava la baixada notable de colocalització a P20 (**Figura 82B**). En conjunt, aquests resultats suggereixen que tot i que els ínputs colinèrgics no es veuen alterats

fins etapes terminals de la malaltia, l'organització dels botons C en el model *Smn*$^{2B/-}$ sí es veu afectada en edats més inicials.

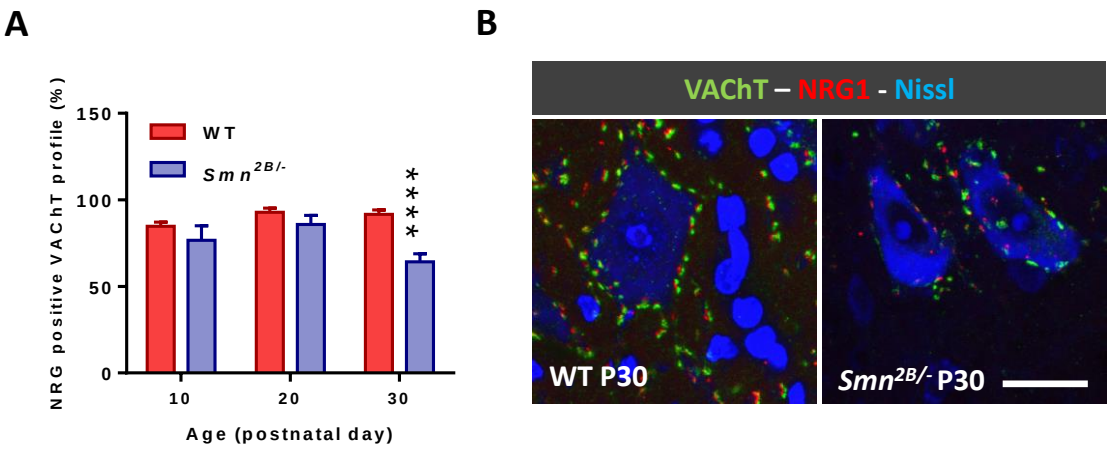


Figura 81. Expressió de neuregulina (NRG) en el botó C del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de sinapsis colinèrgiques que presenten immunoreactivitat per a la NRG en animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl (blau) d'animals sans i malalts P30 mostrant ínputs colinèrgics marcats amb l'anticòs VAChT (verd) i expressió de NRG (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), ****p<0,0001; n=20-60 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (B).*

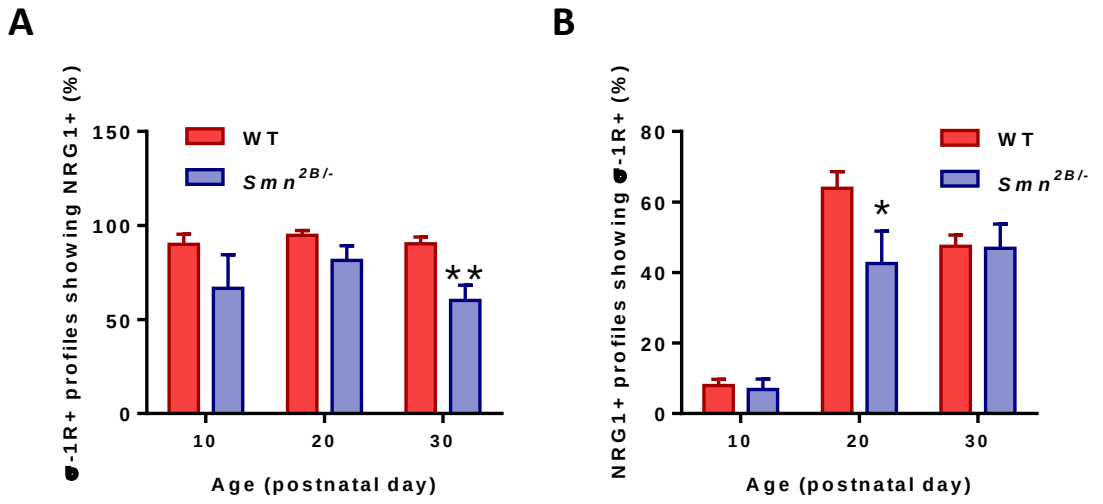


Figura 82. Expressió de σ-1R i neuregulina (NRG) en el botó C del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de perfils σ-1R que presenten immunoreactivitat per a la NRG i (B) percentatge de perfils NRG que presenten immunoreactivitat per a σ-1R en animals WT i Smn$^{2B/-}$ al llarg del curs de la malaltia. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01; n=20-60 MNs comptade s a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat.*

Va cridar l'atenció el baix nombre d'ínputs colinèrgics que expressaven σ-1R a P10 tant en els animals WT com en els animals *Smn*$^{2B/-}$ i es va observar un marcatge més citoplasmàtic en ambdós casos, malgrat que més intens en el cas dels animals malalts (**Figura 83**). Aquest marcatge disminuïa a P20 en els animals sans i, tot i que en menor mesura, també en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$. Així mateix, en el cas del model SMNΔ7, la presència d'aquesta molècula en la superfície de les MNs en els animals WT i SMNΔ7 a P7 i P12 va ser pràcticament nul·la (veure **Figura 84**). Aquesta observació concorda amb el desenvolupament del receptor σ-1R en els botons C observat per Mavlyutov *et al*. [346], els quals, malgrat detectar expressió de σ-1R en les MNs, no van observar presència del receptor en la superfície neuronal fins P11. Per tant, es podria concloure que els animals *Smn*$^{2B/-}$ presenten un retard en el procés de maduració de la distribució de la molècula σ-1R en els botons C.

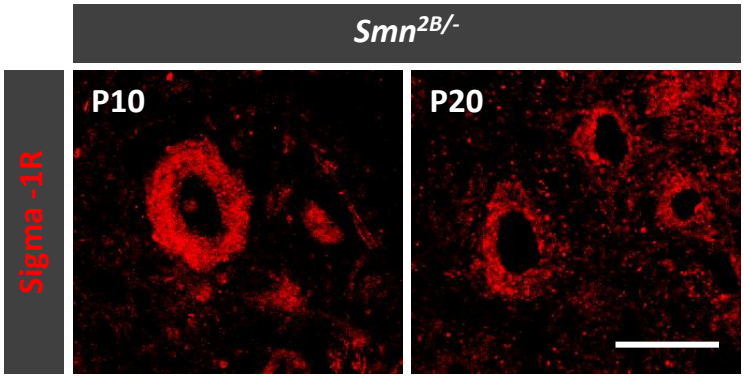


Figura 83. Expressió citoplasmàtica del receptor σ-1 en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Imatges representatives de MNs de ratolins Smn$^{2B/-}$ P10 i P20 que presenten immunoreactivitat per a l'anticòs contra σ-1R. Barra de calibració=20 µm.*

L'administració de PRE-084 no modifica l'expressió del receptor σ-1.

En primer lloc es va examinar l'efecte de l'administració del PRE-084 *in vivo* sobre els botons C. Amb aquest fi, es van injectar diàriament per via subcutània ratolins del model SMNΔ7 i paral·lelament del model *Smn*$^{2B/-}$, bé amb l'agonista del receptor σ-1 (PRE-084, 0,25 mg/kg) o bé amb el corresponent volum de solució salina (0,9% NaCl). En el cas del model SMNΔ7, el tractament es va realitzar fins P12, considerat punt terminal de la malaltia. En aquest punt, es va recollir la medul·la espinal, la qual va ser processada per realitzar l'immunomarcatge amb l'anticòs contra σ-1R i la tinció de Nissl. L'administració del PRE-084 no va modificar de manera qualitativa l'expressió del receptor σ-1R en les MNs, ni a nivell d'intensitat de marcatge ni en la seua distribució. Tampoc es van observar diferencies entre els animals WT i els SMNΔ7 (**Figura 84**).

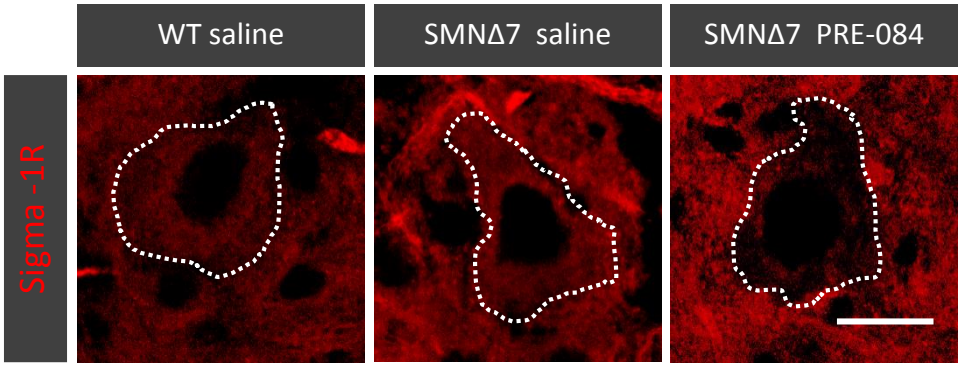


Figura 84. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre l'expressió del receptor σ-1 en el model murí d'AME SMNΔ7. *Imatges representatives de MNs de ratolins P12 WT injectats amb salí i d'animals* ***SMNΔ7 tractats bé amb salí o bé amb l'agonista del receptor*** *σ-1. Barra de calibració=20 µm.*

Pel que fa al model *Smn*$^{2B/-}$, l'obtenció de les mostres es va realitzar a P20. Tal i com s'havia observat anteriorment, el nombre de botons C va ser similar en el cas dels animals WT i els *Smn*$^{2B/-}$ injectats amb salí, i el tractament no va causar cap modificació (**Figura 85**). Els mateixos resultats es van observar quan es va analitzar l'expressió de la NRG (**Figura 86**). Pel que fa a l'expressió de σ-1R, la disminució del nombre de botons C que presentaven immunoreactivitat al receptor σ-1 observada en els animals *Smn*$^{2B/-}$ salins respecte als WT salins no va ser modificada pel tractament amb l'agonista (**Figura 87**).

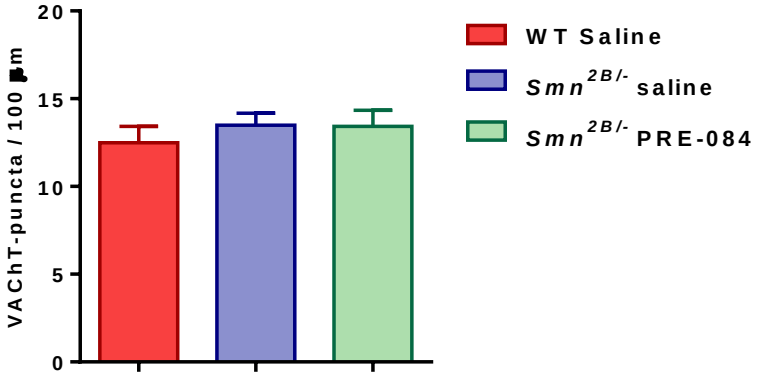


Figura 85. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre la densitat de sinapsis colinèrgiques en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), n=21-40 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició.*

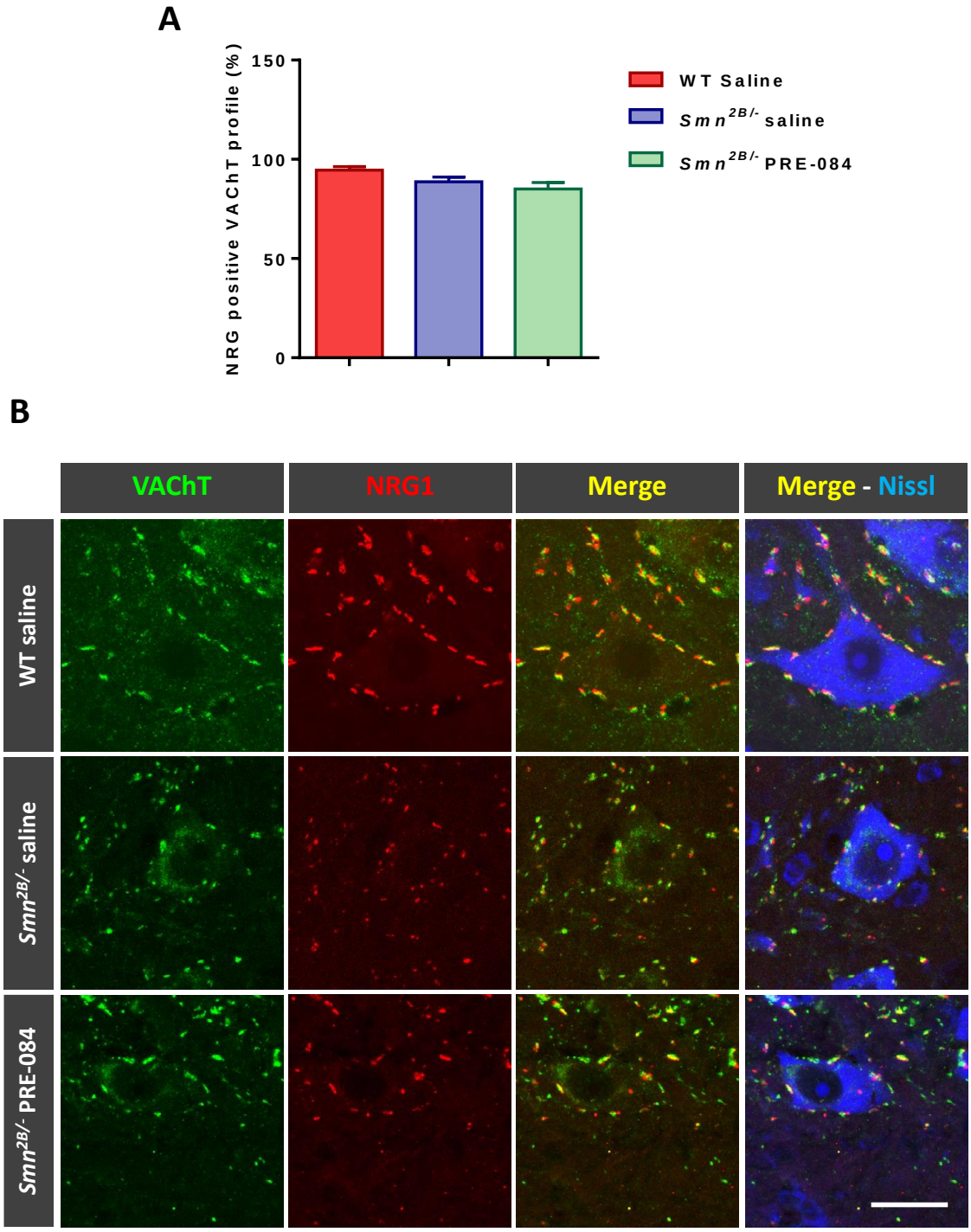


Figura 86. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre l'expressió de NRG en els botons C del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de sinapsis colinèrgiques que presenten immunoreactivitat per a la NRG en animals WT salins i Smn$^{2B/-}$ injectats amb salí o amb l'agonista del receptor σ-1R. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl (blau) d'animals P20 sans injectats amb salí i malalts tractats bé amb salí o bé amb PRE-084 mostrant ínputs colinèrgics marcats amb l'anticòs VAChT (verd) i expressió de NRG (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), n=21-40 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=20 µm en (B).*

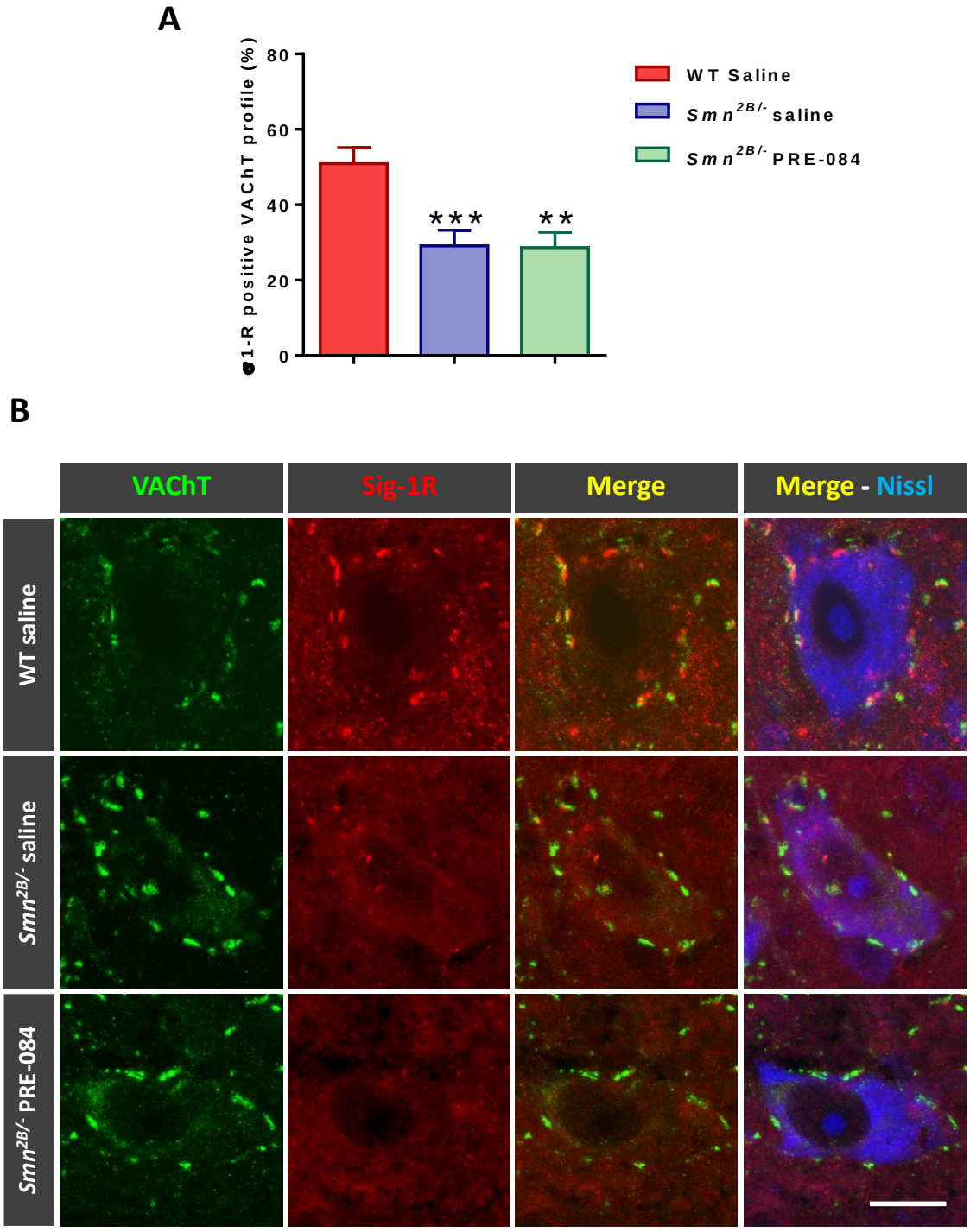


Figura 87. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre l'expressió del receptor σ-1 en els botons C del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Percentatge de sinapsis colinèrgiques que presenten immunoreactivitat per al σ-1R en animals WT salins i Smn$^{2B/-}$ injectats amb salí o amb PRE-084. (B) Imatges representatives de MNs marcades amb Nissl (blau) d'animals P20 sans injectats amb salí i malalts tractats bé amb salí o bé amb PRE-084 mostrant ínputs colinèrgics marcats amb l'anticòs VAChT (verd) i expressió de σ-1R (roig). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01, ***p<0,001; n=21-40 MNs comptades a partir de seccions de medul·la lumbar obtingudes de 3-4 animals per condició i edat. Barra de calibració=10 µm en (B).*

A més, es va portar a terme una anàlisi dels nivells d'expressió de la proteïna σ-1R mitjançant Western Blot en extractes de medul·la espinal del model *Smn*$^{2B/-}$. Els resultats van corroborar que l'administració crònica de PRE-084 no altera el contingut de proteïna ja que no es van observar diferències significatives entre els diferents grups experimentals (**Figura 88**).

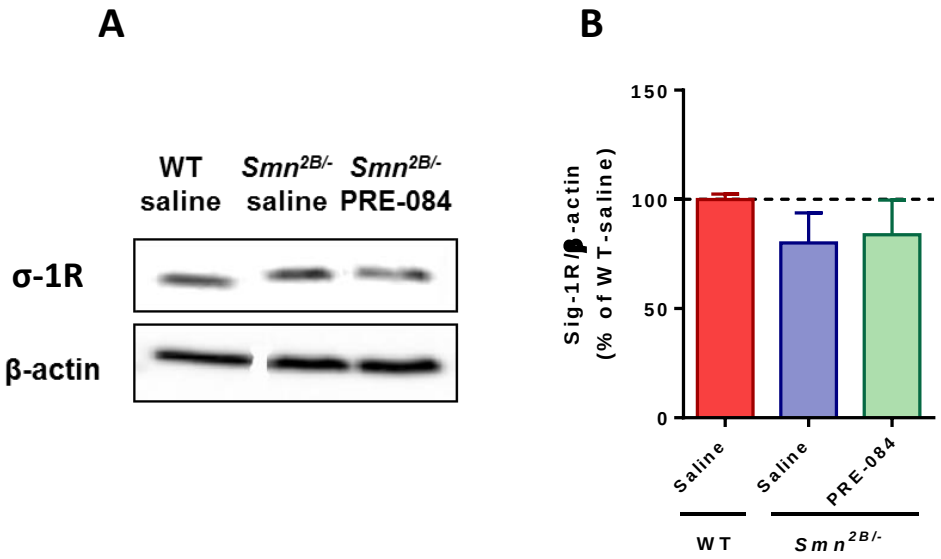


Figura 88. Efecte de l'administració crònica de PRE-084 sobre l'expressió de la proteïna σ-1R en la medul·la espinal del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Western Blots representatius dels nivells de σ-1R i β-actina com a control de càrrega. (B) Quantificació dels nivells de la proteïna σ-1R a la medul·la espinal d'animals P20 WT salins i Smn$^{2B/-}$ salins i injectats amb PRE-084. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test); n=3 animals per condició.*

El tractament crònic amb PRE-084 no millora la supervivència ni les habilitats motores dels ratolins amb AME.

La progressió de l'AME en models murins cursa amb una pèrdua gradual del pes corporal i del rendiment motor [157]. Per altra banda el tractament d'animals afectats per l'ELA amb PRE-084 ha demostrat tenir resultats favorables en quant a la supervivència, al fenotip muscular i el comportament motor [344].

En primer lloc es va estudiar si l'administració de l'agonista tenia algun efecte sobre la supervivència i el pes corporal dels ratolins SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$. Els ratolins malalts d'ambdós models van mostrar un menor augment del pes en relació amb l'augment observat en els WT en les etapes inicials de la malaltia, i una fase en que no incrementaven el pes seguida d'un període de pèrdua de massa corporal (a partir de P10 en el cas del SMNΔ7 i P15 els *Smn*$^{2B/-}$). En cap punt es van observar diferències entre els animals malalts injectats amb salí i els injectats amb PRE-084, ni entre els WT injectats amb els mateixos agents (**Figura 89**).

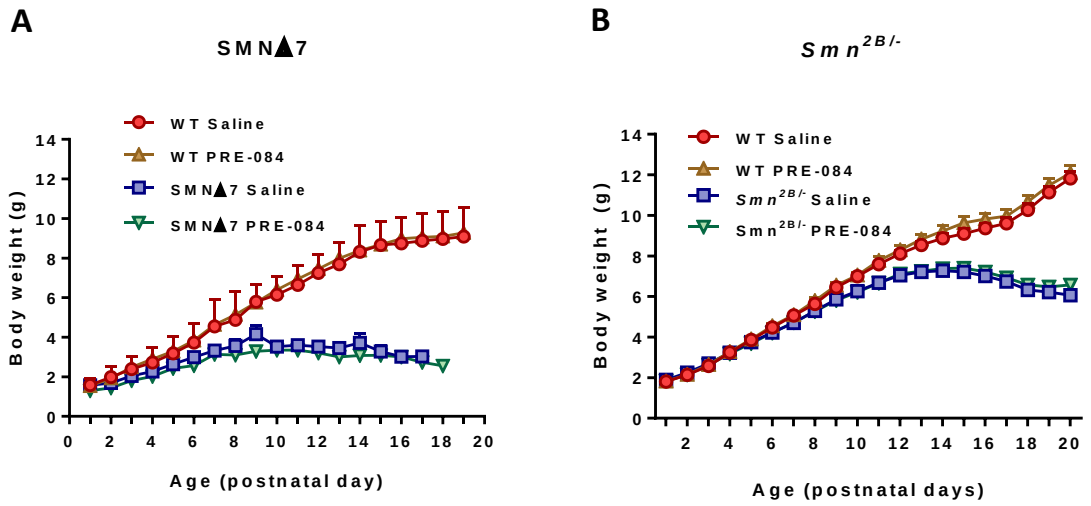


Figura 89. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre el pes corporal en els models murins d'AME SMNΔ7 i $Smn^{2B/-}$. *Pes corporal dels animals WT i SMNΔ7 (A) injectats bé amb salí o bé amb PRE-084 i dels animals WT i $Smn^{2B/-}$ (B). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA-one way (Bonferroni's post-hoc test) a partir dels valors de 15-20 animals per grup experimental.*

El període d'observació de la supervivència va ser fins P21 en el cas de l'estudi amb el model SMNΔ7 punt en que tots els animals malalts ja havien mort. Tant els ratolins SMNΔ7 injectats amb salí com aquells tractats amb l'agonista del receptor σ-1 van presentar una vida mitjana de 15 dies (**Figura 90A**). En el cas del tractament dels ratolins *$Smn^{2B/-}$*, tal i com es va observar en la caracterització del model en el capítol anterior, un xicotet percentatge dels animals injectats van sobreviure més enllà de P150, en concret un injectat amb salí (mort a P160) i dos del grup dels animals tractats (morts a P189 i P202). No obstant, aquests animals no van afectar la vida mitjana del conjunt, motiu pel qual no són representats a la corba de supervivència. Durant aquest temps, cap ratolí WT va morir, mentre que la vida mitjana dels ratolins malalts salins va ser de 21,50 dies i dels tractats amb PRE-084 de 23 dies (**Figura 91A**).

Per estudiar si el PRE-084 exercia algun efecte sobre la força muscular i la coordinació motora, es van portar a terme les proves del *Righting Reflex* (RR) i el *Tube test* (TT) en el model SMNΔ7 des de P1 fins a la mort de l'animal i les proves del *Grid test* i *Pen test* a partir de P8 en el cas del model *$Smn^{2B/-}$*. Pel que fa al model SMNΔ7, i en totes les proves conductuals realitzades, els animals afectats per l'AME tractats amb l'agonista no van mostrar diferències significatives quan es comparaven amb els resultats obtinguts en els animals malalts injectats amb salí (**Figura 90**). Únicament, i en punts aïllats, es va observar una millor puntuació en el TT. Tal i com cabia esperar, els animals WT van portar a terme les proves amb major facilitat que els animals SMNΔ7.

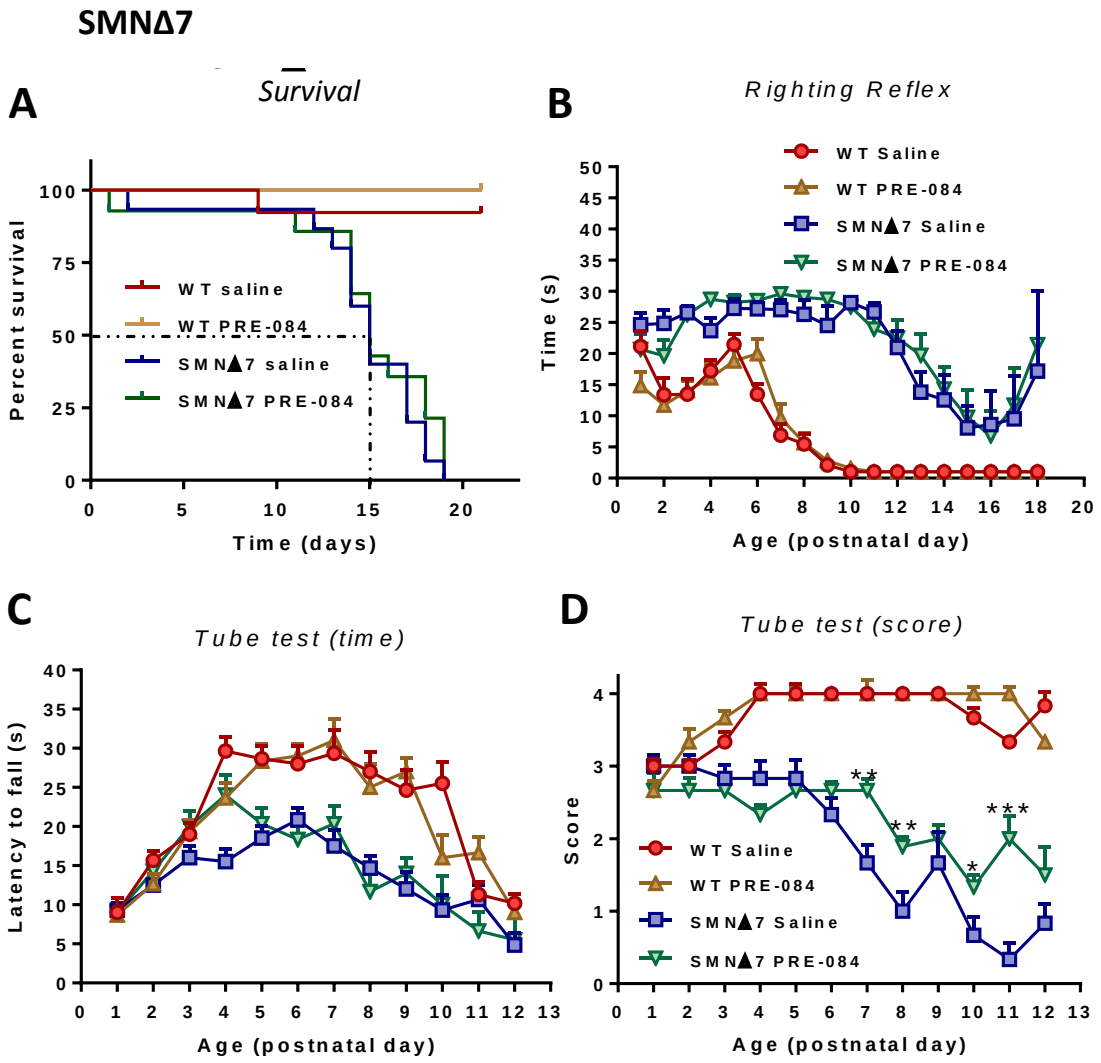


Figura 90. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre la supervivència i el comportament motor en el model murí d'AME SMNΔ7. *(A) Corba de supervivència. (B) Prova del Righting Reflex i (C-D) Prova del Tube test analitzant el temps de caiguda (C) i la puntuació obtinguda pels animals WT i SMNΔ7 injectats amb salí i amb PRE-084. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA-one way (Bonferroni's post-hoc test) a partir dels valors de 15-20 animals per grup experimental; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.*

En el model *Smn*$^{2B/-}$, en cap de les proves motores realitzades es va observar una millora de les habilitats motores dels animals tractats amb PRE-084 respecte als injectats amb salí, ni en el cas dels WT ni dels *Smn*$^{2B/-}$ (**Figura 91**). Únicament es van observar diferències en la latència de caiguda de la prova del *Pen test* a P12 i en la puntuació obtinguda a P10 entre els WT salins i els WT tractats amb l'agonista del receptor σ-1; no obstant, aquestes diferències podrien ser atribuïdes a la pròpia variabilitat de la prova, ja que es tracta de punts aïllats i no van perdurar al llarg del curs temporal estudiat.

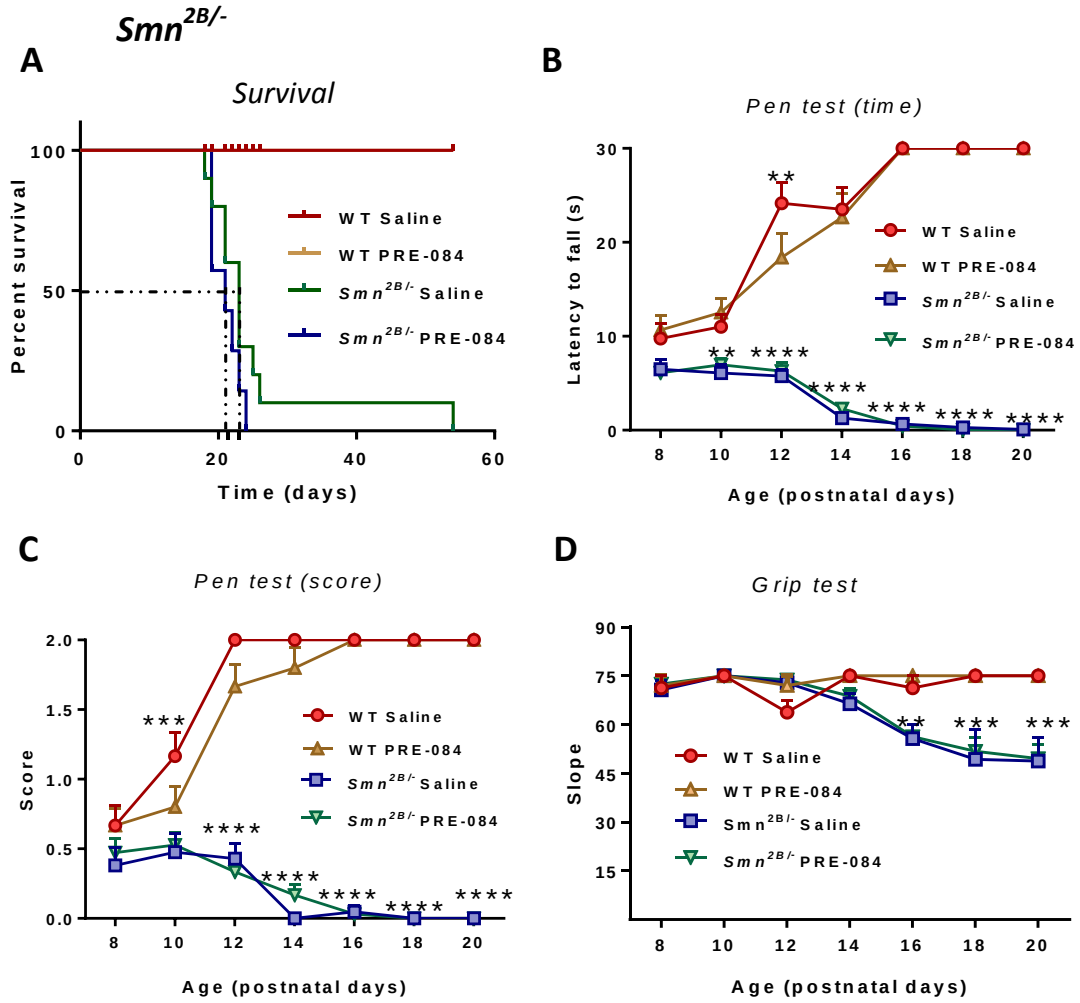


Figura 91. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre la supervivència i el comportament motor en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Corba de supervivència. (B-C) Prova del Pen test analitzant el temps de caiguda (B) i la puntuació obtinguda (C) pels animals WT i Smn$^{2B/-}$ injectats amb salí i amb PRE-084. (D) Prova del Grip test. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA-one way (Bonferroni's post-hoc test), n=valors de 9-12 animals per grup experimental; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.*

El PRE-084 no confereix neuroprotecció en el model murí *Smn*$^{2B/-}$.

A continuació es va estudiar si l'administració del fàrmac protegia contra la mort de MNs associada a l'AME. Es va quantificar el nombre de MNs aparentment sanes a la medul·la espinal d'animals P20 WT tractats amb salí, i ratolins *Smn*$^{2B/-}$ injectats tant amb salí com amb PRE-084. Tal i com cabia esperar, els animals malalts tractats amb salí presentaven una marcada reducció del nombre de MNs (resultats similars als observats al capítol anterior amb els animals no tractats de la mateixa edat: reducció d'aproximadament el 70%). Aquesta pèrdua no es va veure atenuada en els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ tractats amb l'agonista del receptor σ-1, de manera que el PRE-084 no protegeix contra la neurodegeneració pròpia de l'AME (**Figura 92**).

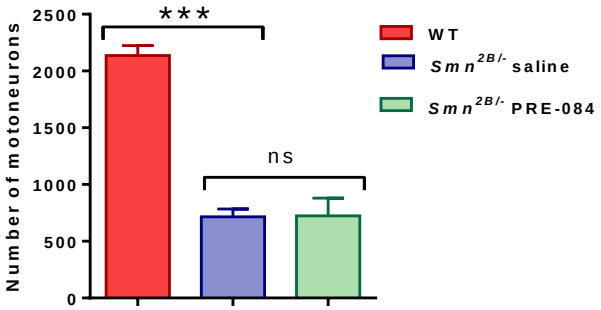


Figura 92. Efecte del tractament amb PRE-084 sobre la supervivència de les MNs en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *Nombre de MNs a la medul·la espinal d'animals P20 sans salins i malalts injectats amb salí o tractats amb l'agonista del receptor σ-1. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA-one way (Bonferroni's post-hoc test) a partir dels valors de 4-6 animals per grup experimental; ***p<0,001.*

Canvis en l'astroglia i la micròglia en els animals afectats per l'AME després del tractament amb PRE-084.

L'astrogliosi i la microgliosi són un tret característic de l'AME, les quals podrien estar directament implicades en la patologia de la malaltia [183, 184]. Per tant, a continuació es va explorar si el PRE-084 tenia algun efecte sobre l'activació de les cèl·lules glials. Es van realitzar tincions immunohistoquímiques sobre seccions de medul·la espinal de P12 en el cas dels ratolins SMNΔ7 i de P20 en el model *Smn*$^{2B/-}$ amb anticossos contra GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) i IBA-1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*), per marcar, respectivament, l'astroglia i la micròglia reactiva i es va analitzar la immunoreactivitat en la banya ventral, quantificant l'àrea relativa ocupada pels perfils positius per als marcadors utilitzats. Els resultats es van expressar com el percentatge de canvi de la immunoreactivitat que presentaven els animals malalts respecte als animals sans.

Tant en el model SMNΔ7 com en l'*Smn*$^{2B/-}$ es va detectar una clara astrogliosi en els animals malalts en comparació dels ratolins sans. Aquesta activació astroglial, tot i veure's reduïda en els dos models posteriorment al tractament amb PRE-084, únicament en el model SMNΔ7 va assolir nivells significatius (p=0,068 en la comparació *Smn*$^{2B/-}$ salí *vs*. *Smn*$^{2B/-}$ PRE-084) (**Figura 93**). La quantificació de la micròglia, positiva per a Iba-1, va mostrar una marcada microgliosi tant en els ratolins SMNΔ7 com en els *Smn*$^{2B/-}$ quan es comparaven amb els corresponents controls. En ambdós casos, el tractament amb l'agonista del receptor σ-1 va disminuir significativament la reacció microglial lligada a la malaltia assolint-se, en els animals malalts tractats, valors similars als observats en els ratolins WT (**Figura 94**).

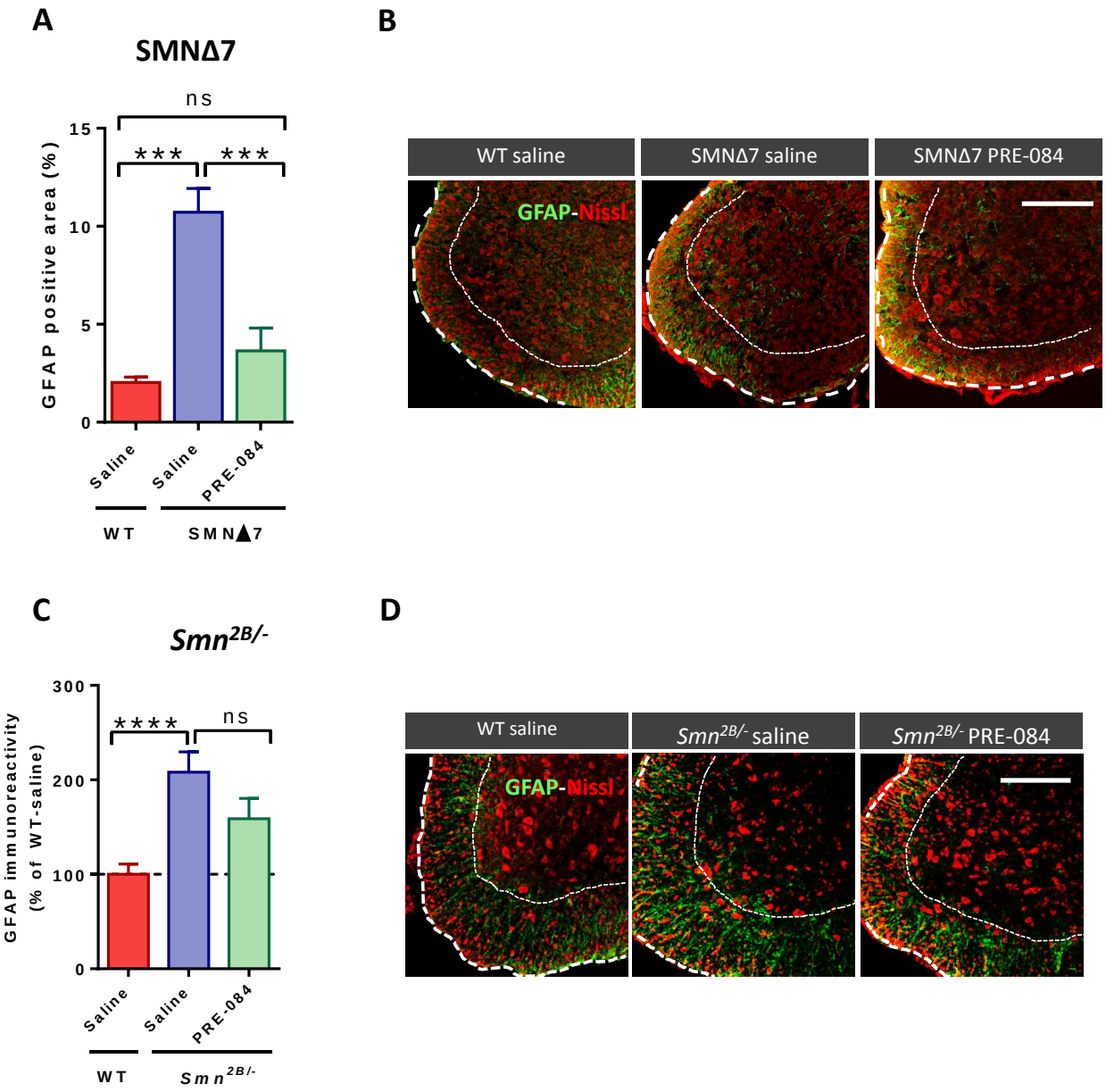


Figura 93. Efecte del tractament crònic amb PRE-084 sobre la reacció astroglial pròpia de l'AME. *(A) Quantificació de perfils astroglials positius per a GFAP al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal d'animals WT i SMNΔ7 tractats amb salí o amb PRE-084 i del model Smn$^{2B/-}$ (C). (B) Imatges representatives dels perfils astroglials, marcats amb l'anticòs contra GFAP (verd) al voltant de les MNs marcades mitjançant la tinció de Nissl (roig) en el model SMNΔ7 (B) i en els ratolins WT i Smn$^{2B/-}$ (D). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (*p<0,05, **p<0,01,***p<0,001), n= 21-30 seccions de medul·la espinal per condició experimental (3-4 animals per genotip i tractament). Barra de calibració=) 200 µm en (B) i (D).*

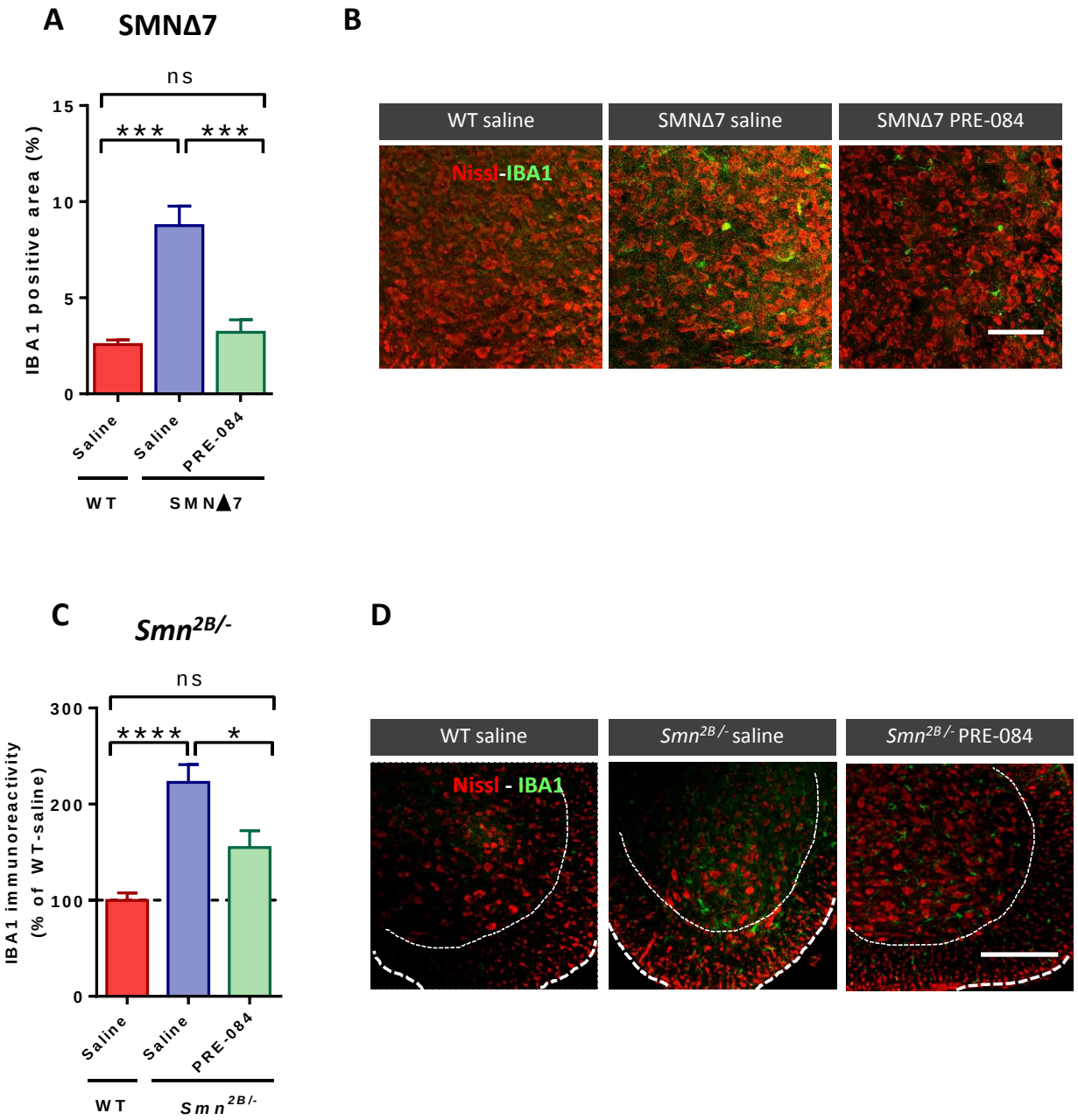


Figura 94. La reacció microglial pròpia de l'AME es veu mitigada pel tractament crònic amb PRE-084. *(A) Quantificació de perfils microglials positius per a IBA-1 al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal d'animals WT i SMNΔ7 tractats amb salí o amb PRE-084 i del model Smn$^{2B/-}$ (C). (B) Imatges representatives dels perfils microglials, marcats amb l'anticòs contra IBA-1 (verd) al voltant de les MNs marcades mitjançant la tinció de Nissl (roig) en el model SMNΔ7 (B) i en els ratolins WT i Smn$^{2B/-}$ (D). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (*p<0,05, **p<0,01,***p<0,001), n= 26-40 seccions de medul·la espinal per condició experimental (3-4 animals per genotip i tractament). Barra de calibració=50 µm en (B) i 200 µm en (D).*

Les cèl·lules microglials són macròfags residents en el sistema nerviós central (SNC). En condicions normals, la micròglia es responsable de la formació, manteniment i eliminació de les sinapsis, afectant en última instància la connectivitat i els senyals nerviosos [347]. Quan l'homeòstasi en el SNC es veu alterada, la micròglia s'activa d'una manera similar a com ho fan els macròfags en la perifèria. L'activació de la micròglia pot donar lloc a dos fenotips microglials distints [348]: el fenotip M1 el qual s'associa amb inflamació i degeneració, i el fenotip M2 relacionat amb regeneració i processos antiinflamatoris. En les malalties neurodegeneratives la micròglia pot jugar un paper nociu (fenotip M1 o pro-inflamatori) o beneficiós (fenotip M2 o antiinflamatori) en funció de les seues propietats intrínseques, la interacció amb l'entorn i/o la presència de factors patògens [349].

A continuació, es va portar a terme un estudi per tal d'esbrinar si la reducció de la micròglia activa (Iba-1 positiva) causada per l'administració de PRE-084 era conseqüència de la disminució d'un fenotip concret d'aquesta. Amb aquest objectiu, es va portar a terme una anàlisi immunohistoquímica en crioseccions de medul·la espinal del model *Smn*$^{2B/-}$ utilitzant dos marcadors diferencials d'ambdós fenotips: Mac-2 per a M1 i CD206 per a M2. La quantificació de l'àrea relativa ocupada pels perfils positius per al marcador Mac-2 va mostrar un resultat idèntic a l'observat amb el marcador Iba-1: els animals *Smn*$^{2B/-}$ presentaven un increment de la immunoreactivitat quan es comparaven amb els WT, i una reducció en els animals malalts tractats amb PRE-084 en comparació dels injectats amb salí (≈50%) (**Figura 95**). En canvi, el marcador del fenotip M2 va mostrar un patró oposat: els animals malalts presentaven una disminució del marcador CD206 d'aproximadament el 50% respecte als animals sans, i els animals *Smn*$^{2B/-}$ tractats amb PRE-084 presentaven un augment quan es comparaven amb els *Smn*$^{2B/-}$ injectats amb salí, assolint valors similars als animals WT (**Figura 96**).

Va cridar l'atenció la presència de perfils positius per a CD206, que no eren immunoreactius per a Iba-1 a la perifèria de la medul·la espinal (fletxes blanques a la **Figura 96B**). Aquests perfils, igual que la immunoreactivitat en la banya ventral, eren menys freqüents en els animals *Smn*$^{2B/-}$ salins que en els WT, però els animals malalts tractats amb l'agonista del receptor σ-1 presentaven un major nombre de perfils CD206 positius que els injectats amb salí.

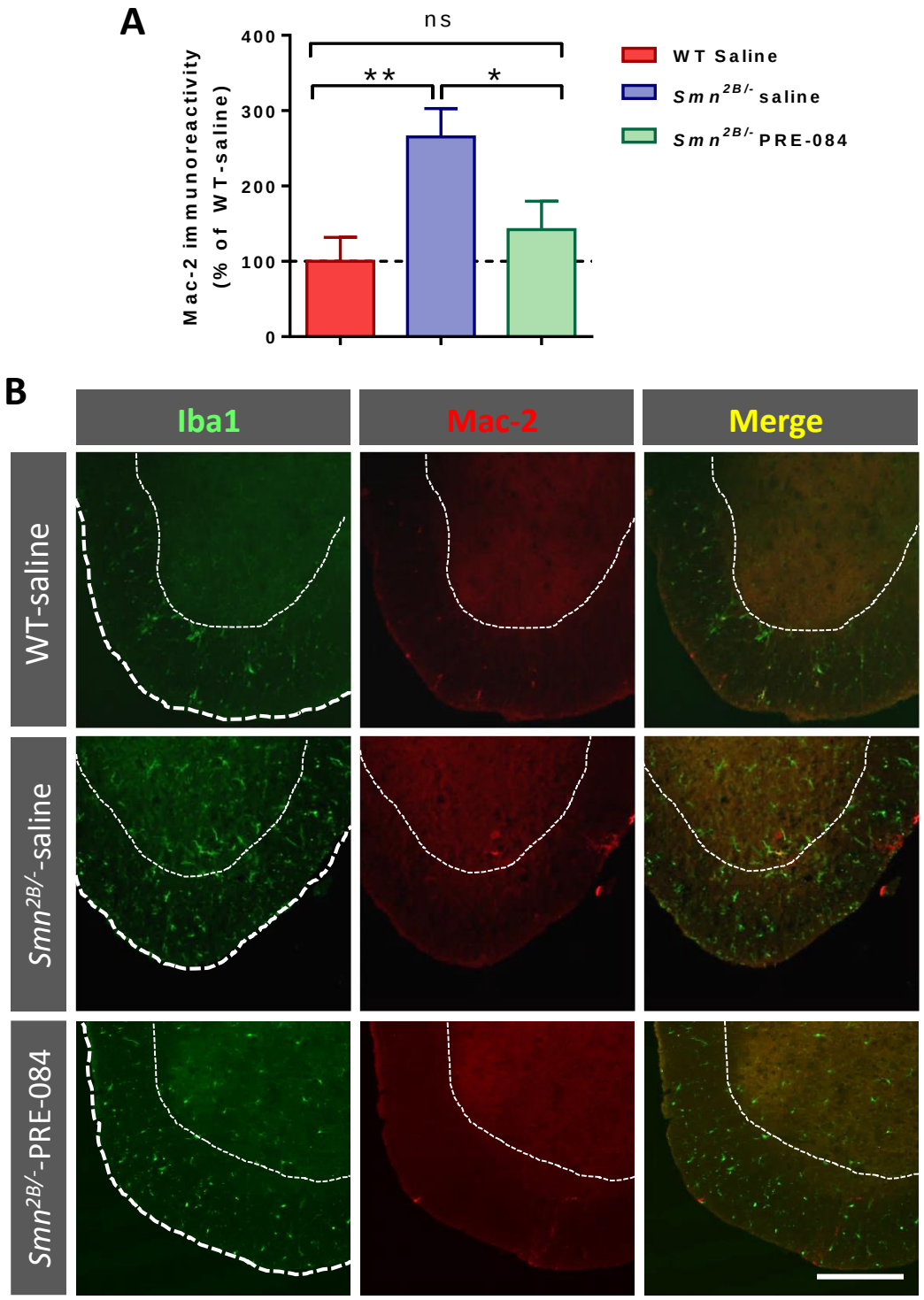


Figura 95. L'administració de PRE-084 mitiga l'expressió del marcador Mac-2 en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació de perfils microglials positius per a Mac-2 al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$ tractats amb salí o amb PRE-084. (B) Imatges representatives de perfils microglials marcats amb l'anticòs contra IBA-1 (verd) i amb Mac-2 (roig) a la banya ventral de la medul·la espinal. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01), n= 16-21 seccions de medul·la espinal per condició experimental. Barra de calibració=200 µm en (B).*

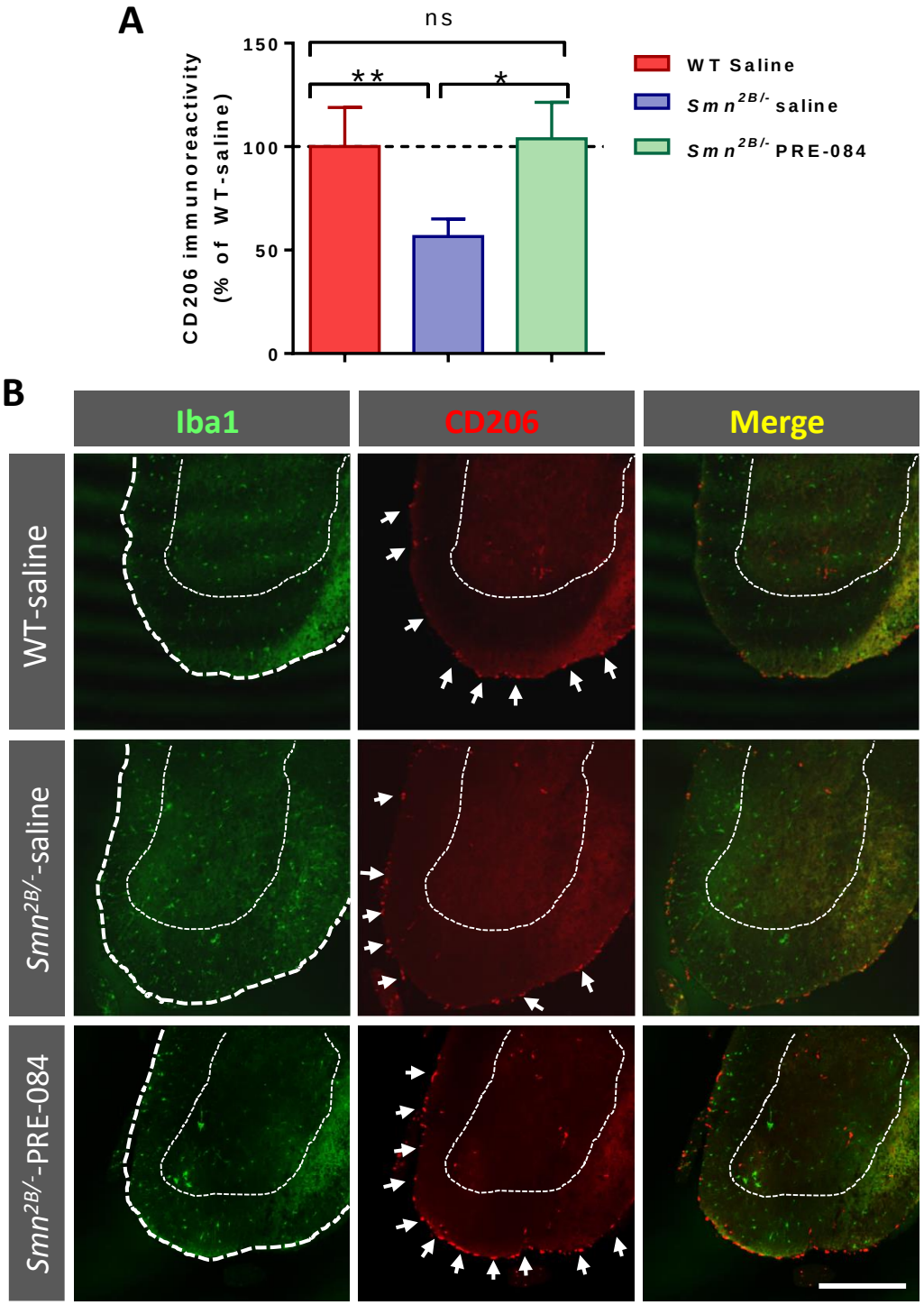


Figura 96. L'administració de PRE-084 restableix l'expressió del marcador CD206 en el model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Quantificació de perfils microglials positius per a CD206 al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal d'animals P20 WT i Smn$^{2B/-}$ tractats amb salí o amb PRE-084. (B) Imatges representatives de perfils microglials marcats amb l'anticòs contra IBA-1 (verd) i amb CD206 (roig) a la banya ventral de la medul·la espinal i a la perifèria (fletxes blanques). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01), n= 18-25 seccions de medul·la espinal per condició experimental. Barra de calibració=200 µm en (B).*

Efectes del tractament amb PRE-084 sobre les unions neuromusculars del múscul TA en el model murí *Smn$^{2B/-}$*.

S'ha reportat un efecte beneficiós del PRE-084 en un model murí d'ELA sobre la connectivitat entre les MNs i el múscul esquelètic, augmentant el nombre de MNs que innerven el múscul TA posteriorment a l'administració del fàrmac [344]. Per tant, es va proposar l'estudi de les unions neuromusculars del TA en el ratolins *Smn$^{2B/-}$*, per tal d'analitzar si el tractament crònic amb PRE-084 millorava alguns dels defectes histopatològics observats en aquest model d'AME.

En primer lloc es va fer una anàlisi general de l'estat de les plaques motores mitjançant tincions amb α-Bgtx. Tal i com s'havia observat anteriorment, les NMJs del TA d'animals *Smn$^{2B/-}$* van presentar una menor mida, així com un major grau d'immaduresa respecte a les plaques dels animals WT. A més, es van detectar defectes presinàptics tals com l'acumulació de NF i la dennervació d'algunes de les NMJs (**Figura 97**). L'anàlisi i comparació de les plaques motores dels ratolins malalts tractats amb PRE-084 amb les dels ratolins *Smn$^{2B/-}$* salins no va revelar canvis en la mida d'aquestes. Tampoc no va afavorir la maduració de les plaques cap a formes més complexes (*perforated* i *2º structure*), més presents en els animals WT. Per altra banda, l'administració de l'agonista no va tenir cap efecte sobre la dennervació muscular associada a l'AME (fletxes grogues a la **Figura 97E**), no observant-se un augment de les plaques motores que resultaven immunoreactives per al marcador vesicular SV2 (*synaptic vesicle protein 2*) en els animals malalts tractats amb PRE-084 respecte als injectats amb salí, de fet, es va observar una subtil però significativa disminució de les NMJs amb major percentatge cobert pel marcador SV2 en els animals tractats. En canvi, el tractament va provocar una disminució del nombre de plaques que presentaven acumulacions aberrants de NF en els animals malalts, defecte histopatològic presinàptic propi de l'AME [157] (fletxa blanca a la **Figura 97E**) que no va ser observat en cap de les unions neuromusculars dels animals WT.

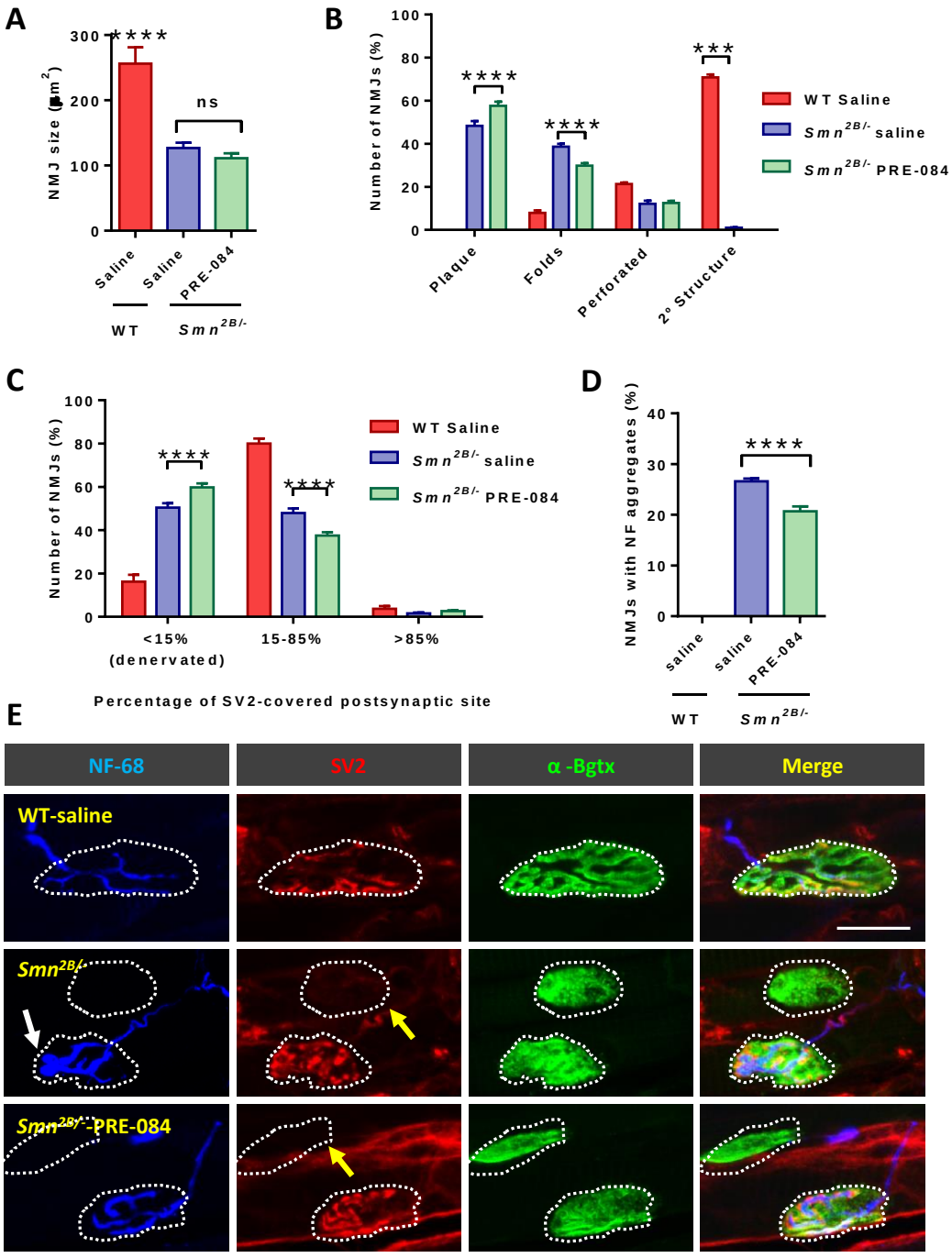


Figura 97. Efectes del tractament crònic amb PRE-084 sobre els defectes lligats a l'AME en les NMJs de músculs TA en el model murí Smn$^{2B/-}$. *(A) Àrea de les NMJs i (B) percentatge de NMJs mostrant diferents graus de maduració avaluats per la morfologia del terminal postsinàptic. (C) Percentatges de NMJs mostrant diferents graus d'innervació (avaluats per l'àrea ocupada pel SV2) i (D) Nombre de NMJs mostrant agregats de NF. (E) Imatges representatives de NMJs del múscul TA d'animals P20 WT salins i Smn$^{2B/-}$ injectats amb salí o tractats amb l'agonista del receptor σ-1. Les imatges es van obtenir a partir de crioseccions marcades amb α-Bgtx (verd) i immunotenyides amb l'anticòs contra SV2 (roig) i NF-68 (blau). La fletxa blanca en (E) mostra una NMJ amb acumulació aberrant de NF i les fletxes grogues assenyalen plaques dennervades sense immunoreactivitat per a SV2. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test),***p<0,001, ****p<0,0001; n=49-73 NMJs de músculs TA de 3-4 animals per condició experimental. Barra de calibració=20 µm.*

El tractament amb PRE-084 no modifica el grau de fosforilació del receptor NMDA ni els nivells de proteïna SMN en la medul·la espinal de ratolins amb AME.

Estudis previs *in vitro* defensen que els agonistes del receptor σ-1 suprimeixen les corrents del receptor NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) en cèl·lules ganglionars de la retina [350] i prevenen la mort induïda per excitotoxicitat de les MNs gràcies a la modulació del receptor NMDA a través de la PKC (*protein kinase C*) [342]. A més, s'ha descrit que l'administració de l'agonista del σ-1R en un model murí d'ELA té un efecte neuroprotector que és conseqüència de la fosforilació específica de serines, a través de la PKC, de la subunitat NR1 del receptor NMDA [344]. A diferència d'aquests resultats, l'anàlisi proteica mitjançant Western Blot d'extractes de medul·la espinal d'animals WT tractats amb salí i d'*Smn*$^{2B/-}$ tractats amb salí i amb PRE-084 no va revelar un increment del grau de fosforilació de la serina 896 (Ser896) de la subunitat NR1 del receptor NMDA en els animals tractats amb l'agonista del receptor σ-1 (**Figura 98**). L'estat de fosforilació es va calcular com la ràtio dels nivells de phospho-NR1 i de l'NR1 total, quantificat amb un anticòs contra aquesta subunitat del receptor NMDA.

Per altra banda, es va analitzar el nivell de proteïna SMN en la medul·la espinal després del tractament amb PRE-084. La quantificació es va realitzar mitjançant densitometria òptica posteriorment a la detecció per Western Blot. Tal i com cabia esperar, els animals *Smn*$^{2B/-}$ van presentar una reducció notable dels nivells de proteïna SMN comparats amb els WT, disminució que no es va veure modificada posteriorment al tractament amb l'agonista del receptor σ-1 (**Figura 99**). Per tant, els canvis induïts pel PRE-084 en la reacció microglial i astroglial són independents del nivell de proteïna SMN a la medul·la espinal.

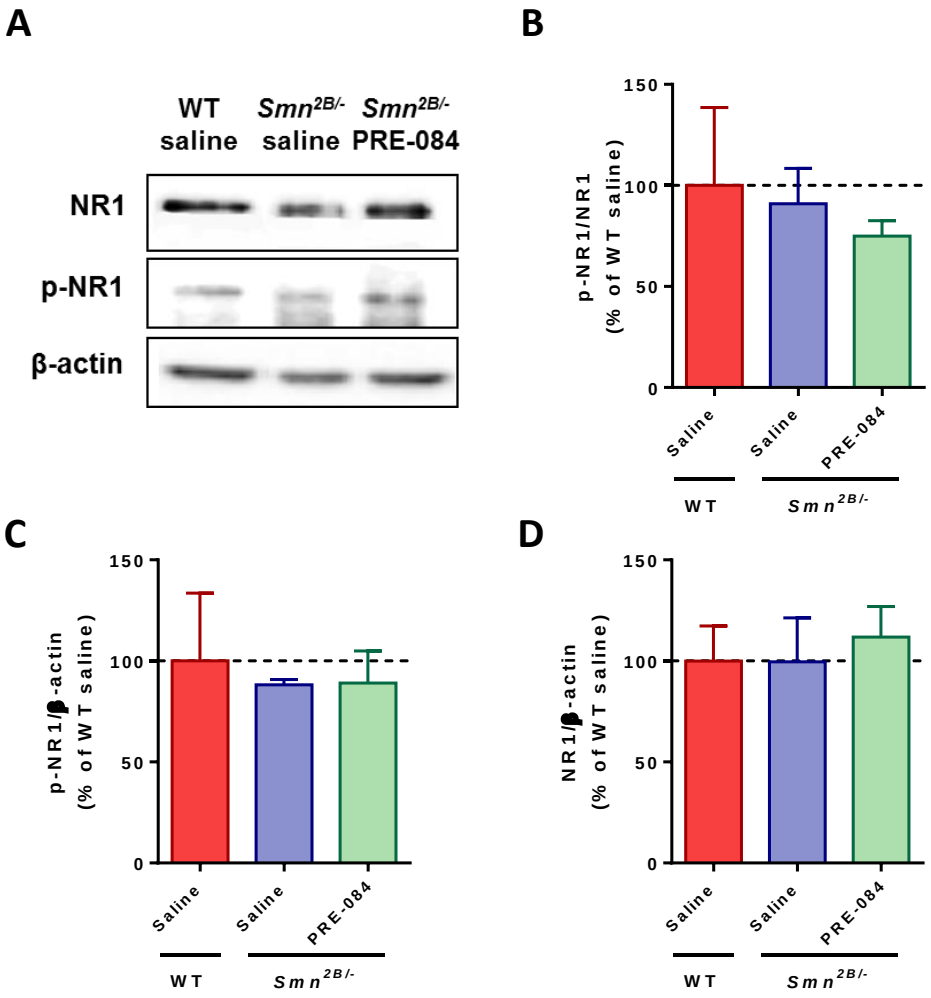


Figura 98. Efectes del tractament crònic amb PRE-084 sobre els nivells totals de la subunitat NR1 del receptor NMDA i de la subunitat NR1 fosforilada en la medul·la espinal de ratolins sans (WT) i animals Smn$^{2B/-}$ salins i injectats amb PRE-084. *(A) Western Blots representatius dels nivells de NR1 total, NR1 fosforilada (p-NR1) i β-actina com a control de càrrega. (B-D) Quantificació dels canvis en els nivells de NR1 total (B) i NR1 fosforilada (C), quantificats per densitometria, i de l'estat de fosforilació del receptor en condicions basals (animals injectats amb salí) i d'animals malalts injectats amb PRE-084 (D). Les dades es representen com el percentatge de canvi respecte als nivells trobats en el grup WT salí. (n= 3 animals per condició experimental). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test).*

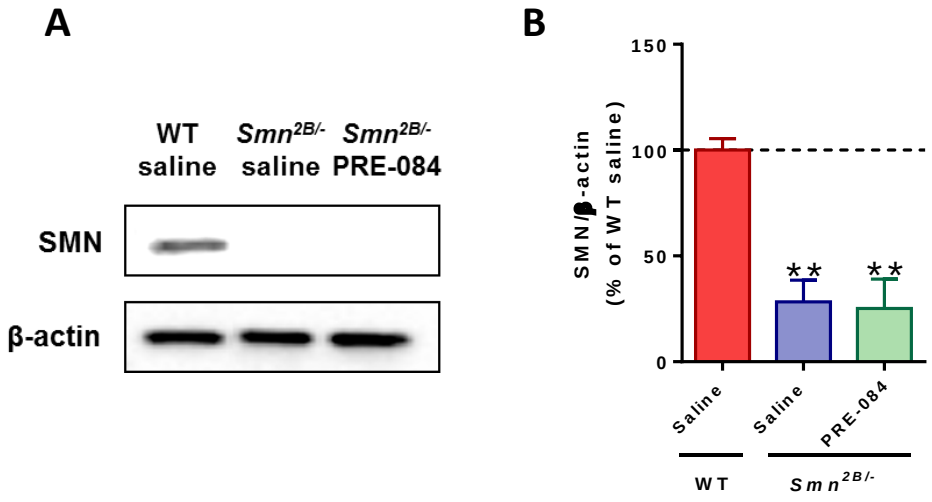


Figura 99. Efecte de l'administració crònica de PRE-084 sobre l'expressió de la proteïna SMN en la medul·la espinal del model murí d'AME Smn$^{2B/-}$. *(A) Western Blots representatius dels nivells de proteïna SMN i β-actina com a control de càrrega. (B) Quantificació dels nivells de la proteïna SMN a la medul·la espinal d'animals P20 WT salins i Smn$^{2B/-}$ salins i injectats amb PRE-084. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant una ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), **p<0,01; n=3 animals per condició.*

VI. RESULTATS

CAPÍTOL 3

EFECTES TERAPÈUTICS DE L'AICAR, AGENT FARMACOLÒGIC MIMÈTIC DE L'ACTIVITAT FÍSICA, EN EL MODEL SMNΔ7

1. INTRODUCCIÓ

Malgrat que les intervencions farmacològiques i la teràpia gènica o cel·lular estan demostrant resultats esperançadors, existeixen teràpies addicionals per millorar la qualitat de vida dels pacients afectats per l'AME. L'exercici moderat pot ajudar a disminuir la formació de contractures, promoure un bon desenvolupament de les caderes, augmentar la densitat òssia, promoure la motilitat dels intestins i generar una sensació de benestar general. És més, en humans s'ha descrit un efecte beneficiós de l'exercici en el manteniment de les NMJs, així com en la prevenció de les alteracions morfològiques i funcionals de les mateixes que tenen lloc com a conseqüència de l'envelliment (revisat a [351]). No obstant, la curta edat de la majoria dels pacients amb AME dificulta la possibilitat de realitzar exercici físic.

El possible paper de l'exercici físic com a teràpia adjuvant en desordres neuromusculars i malalties de motoneurones s'ha estudiat tant en humans [352-355] com en models murins d'ELA i d'AME [124, 356-360]. Així, s'ha reportat que l'exercici regular millora significativament la funció motora, prolonga la supervivència, prevé la mort de les motoneurones i atenua l'atròfia muscular en ratolins que mimetitzen l'AME de tipus II [359]. Aquests efectes beneficiosos semblen estar relacionats, no sols amb l'increment de transcripts que contenen l'exó 7, tal com s'ha observat a la medul·la espinal d'animals malalts entrenats [359], sinó també, amb l'increment de l'activació del receptor de glutamat N-methyl-D-aspartate (NMDA), el qual sembla estar disminuït en motoneurones d'animals afectats per la malaltia [124]. Per altra banda, l'activació del receptor NMDA promou l'expressió de l'SMN in vitro [361].

Se sap que la proteïna AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) s'activa en el múscul esquelètic durant l'exercici i que presenta un paper important en la regulació del metabolisme d'aquest, en la transcripció i en la plasticitat fenotípica [362-366]. Per altra banda, l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-Dribofuranoside) és un agonista sintètic de l'AMPK i, subministrat de manera crònica, ha demostrat ser un potent estimulador de l'activitat de l'AMPK en el múscul esquelètic, induint importants canvis plàstics en les cèl·lules musculars [367-370]. L'AICAR també s'ha demostrat capaç, en absència d'activitat física, d'incrementar l'adaptació a l'entrenament i millorar la resistència, actuant i considerant-se com un agent mimètic de l'exercici [371]. L'activació farmacològica de l'AMPK amb AICAR s'ha assajat amb ratolins *mdx*, un model murí de la distròfia muscular de Duchenne, demostrant-se que el tractament crònic amb AICAR millora el fenotip muscular de la malaltia, així com el comportament motor dels animals malalts [372, 373].

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Arrel d'aquestes troballes, i tenint en compte que l'afectació en etapes primerenques de l'AME impossibilita la pràctica d'exercici físic, es va plantejar investigar els possibles efectes beneficiosos del tractament crònic amb AICAR, com a mimètic de l'activitat física, en l'AME. Es va utilitzar el model murí *Smn*$^{-/-}$,*SMN2*$^{+/+}$, *SMNΔ7*$^{+/+}$ (SMNΔ7) amb l'objectiu de realitzar un estudi detallat de la supervivència, el fenotip de la malaltia, les habilitats motores i la histopatologia neuromuscular dels animals.

3. RESULTATS

Efectes de l'administració d'AICAR sobre l'estat de fosforilació de l'AMPK i el contingut de PGC-1α en el múscul esquelètic dels ratolins SMNΔ7.

En primer lloc es va examinar l'efecte de l'administració de l'AICAR *in vivo* sobre l'activitat de l'AMPK, avaluada per la fosforilació, en el múscul esquelètic de ratolins WT i SMNΔ7. Amb aquest fi, es va injectar diàriament de manera subcutània, bé AICAR (500 mg/kg) o bé el corresponent volum de solució salina (0,9% NaCl) des de P1 fins P8, recollint-se els músculs de les extremitats posteriors tres hores després de la última injecció. El programa de tractament seguit, així com la dosi i la via d'administració van ser idèntics als descrits en estudis previs realitzats amb ratolins *mdx*, animals afectats per la distròfia muscular de Duchenne [372, 373] que van mostrar tenir resultats favorables en quant al fenotip muscular i el comportament motor. L'estudi proteic d'extractes musculars mitjançant Western Blot no va mostrar diferències significatives en els nivells totals de proteïna AMPK després del tractament amb AICAR tant dels animals WT com dels SMNΔ7 (**Figura 100A**, **B**). En canvi, la fosforilació de l'AMPK examinada mitjançant un anticòs contra phospho-AMPK (Thr172) es va veure incrementada (≈60%) en els animals WT tractats en comparació dels WT salins (**Figura 100A**, **C**). Sorprenentment, els músculs d'animals SMNΔ7 injectats amb salí van manifestar un augment significatiu dels nivells de fosforilació de l'AMPK en comparació amb els animals sans (increment del 260%; $p<0,05$). Aquest increment en el nivell de fosforilació en els músculs d'animals malalts no es va veure addicionalment augmentat després del tractament amb AICAR; de fet, es va observar una modesta, però no significant, disminució en la fosforilació de l'AMPK en aquells ratolins SMNΔ7 tractats amb AICAR ($p>0'05$) (**Figura 100A**, **C**). L'estat de fosforilació de l'AMPK, representat com la ràtio dels nivells de phospho-AMPK i de l'AMPK, va mostrar un perfil similar (**Figura 100A**, **D**). Per corroborar aquest increment en la fosforilació de l'AMPK en animals afectats per l'AME, es va fer una anàlisi per Western Blot utilitzant músculs de ratolins *Smn*$^{-/-}$,*SMN2*$^{+/+}$, un model d'AME més severa, constatant un increment de

la fosforilació, quan es comparaven els animals malalts amb els WT, similar al trobat en el model SMNΔ7 (**Figura 101**). Tots junts, aquests resultats indiquen que l'activitat basal de l'AMPK es troba incrementada en els músculs esquelètics d'animals amb AME. A més, el tractament crònic amb AICAR activa lleugerament l'activitat de l'AMPK en el múscul esquelètic d'animals sans *in vivo* però no es capaç de modificar, de manera significativa, el nivell de fosforilació de l'AMPK trobat durant el curs de la malaltia.

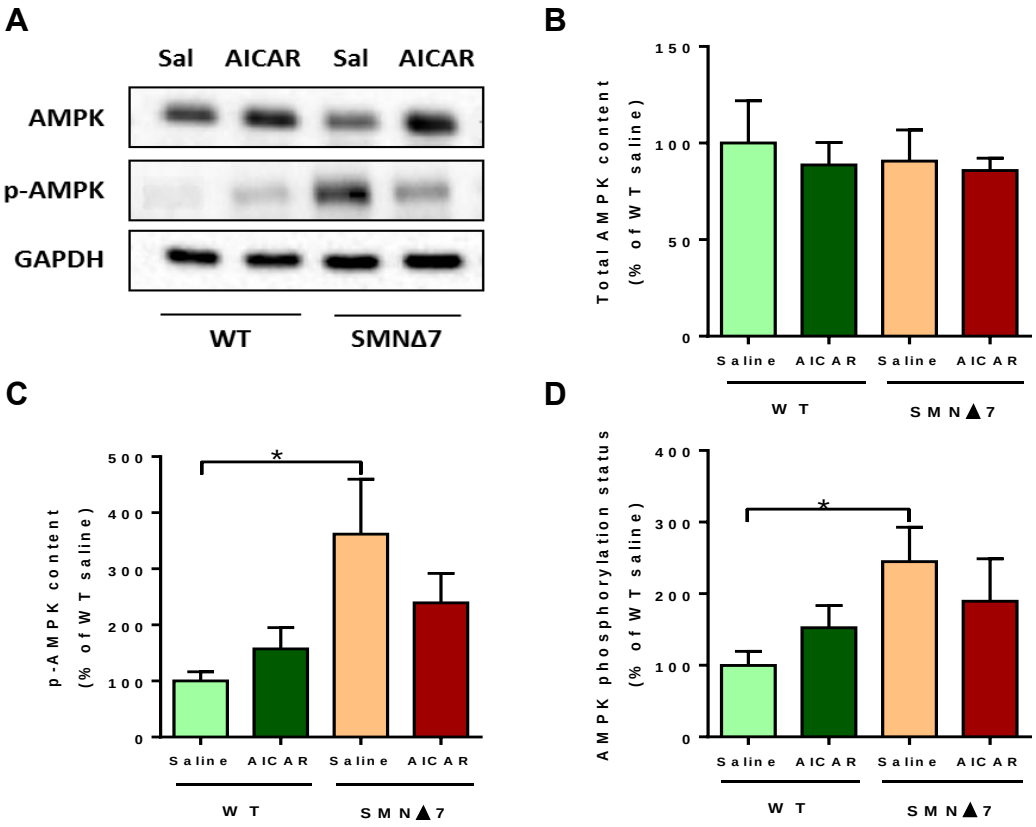


Figura 100. Efectes del tractament crònic amb AICAR sobre els nivells de proteïna AMPK total i AMPK fosforilada en el múscul esquelètic de ratolins sans (WT) i animals $Smn^{-/-}$,$SMN2^{+/+}$, $SMN\Delta7^{+/+}$ (SMNΔ7). *(A) Western Blots representatius dels nivells d'AMPK total, AMPK fosforilada (p-AMPK) i glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) com a control de càrrega. (B-D) Quantificació dels canvis en els nivells de l'AMPK total (B) i l'AMPK fosforilada (C), quantificats per densitometria, i de l'estat de fosforilació de la cinasa en condicions basals (animals injectats amb salí) i després del tractament amb AICAR (D). Les dades es representen com el percentatge de canvi respecte als nivells trobats en el grup WT salí. (n= 8 animals de cada condició experimental de 3 experiments independents). *p<0,05, ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test).*

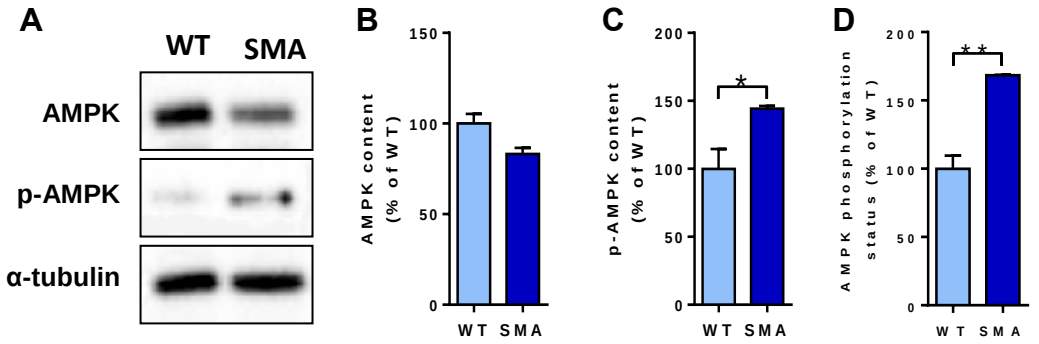


Figura 101. Quantificació dels nivells de proteïna AMPK en extractes musculars d'animals WT i Smn$^{-/-}$,SMN2$^{+/+}$, un model més sever d'AME*. (A) Western Blots representatius dels nivells d'AMPK total, AMPK fosforilada (p-AMPK) i α-tubulina com a control de càrrega. (B-D) Quantificació dels canvis en els nivells de l'AMPK total (B) i l'AMPK fosforilada (C), quantificats per densitometria, i de l'estat de fosforilació de la cinasa en animals sans i malalts (D). Les dades es representen com el percentatge de canvi respecte als nivells trobats en els ratolins WT. (n= 5 animals per condició experimental de 2 experiments independents). *p<0,05, **p<0,01 ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test).*

La PGC-1α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*) és un coactivador transcripcional que sembla jugar un paper important en el metabolisme oxidatiu del múscul esquelètic mitjançant l'estimulació de la biogènesi mitocondrial i dels enzims oxidatius [374, 375]. S'ha descrit, tant en rosegadors com en humans, que l'exercici activa l'expressió de la PGC-1α [376-378]. Per altra banda, l'AMPK es capaç de fosforilar directament la proteïna PGC-1α, resultant en la inducció del promotor de la PGC-1α [379]. Així, s'ha reportat que l'estimulació farmacològica de l'AMPK amb AICAR incrementa el contingut de PGC-1α en el múscul [371]. Per aquesta raó, a continuació es va explorar si el tractament amb AICAR produïa un augment dels nivells de PGC-1α en el múscul esquelètic d'animals SMNΔ7. L'estudi d'extractes musculars per Western Blot va mostrar un lleuger increment, tot i que no significant, dels nivells de PGC-1α en animals sans tractats amb AICAR quan es van comparar amb als WT injectats amb salí (increment del ≈20%). Els nivells de PGC-1α no es van modificar en els músculs d'animals SMNΔ7 tractats amb AICAR (**Figura 102**). Aquests resultats indiquen que en el model experimental SMNΔ7 el tractament amb AICAR exerceix poca influència sobre els nivells de proteïna PGC-1α en el múscul esquelètic.

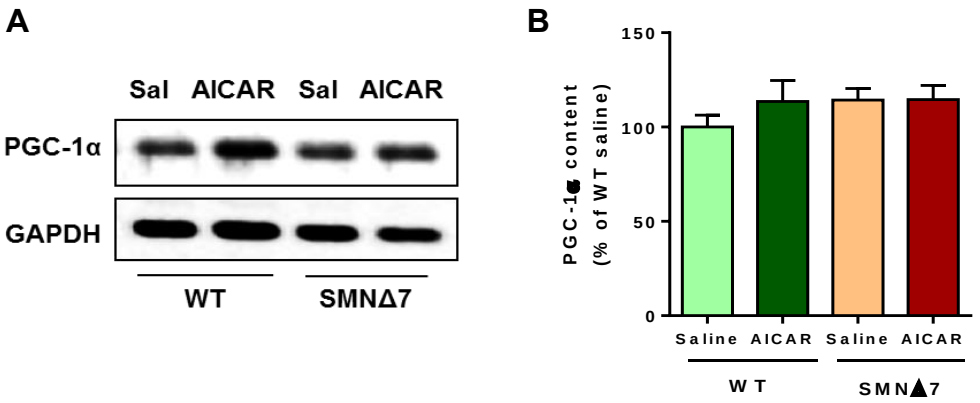


Figura 102. Efecte del tractament crònic amb AICAR sobre els nivells de PGC-1α en el múscul esquelètic d'animals WT i SMNΔ7. *(A) Western Blots representatius de la proteïna PGC-1α i GAPDH (com a control de càrrega). (B) Anàlisi densitomètric dels canvis en el contingut de PGC-1α en condicions basals (animals injectats amb salí) i després del tractament amb AICAR. Es representa el resultat de 5-6 animals per condició experimental provinents de 2 experiments independents.*

El tractament crònic amb AICAR no millora les habilitats motores ni la supervivència dels ratolins SMNΔ7.

La progressió de l'AME en models murins cursa amb una pèrdua gradual del pes corporal i del rendiment motor [157]. Tal i com s'esperava, els ratolins SMNΔ7 injectats amb salí van manifestar un menor increment del pes corporal comparats amb els animals WT. Cal remarcar que els animals malalts tractats amb AICAR van mostrar una millora en el pes corporal, observant-se a partir de P4, encara que aquest augment no va ser significatiu fins P7 i P8 ($p<0,05$). No es van observar diferències en el pes corporal en cap dels punts estudiats quan es comparaven els ratolins WT salins amb els WT tractats (**Figura 103A**).

La prova del *Righting Reflex* (RR) i el *Tube test* (TT) es van portar a terme per avaluar la força muscular i la coordinació motora. Els animals SMNΔ7 injectats amb salí i aquells tractats amb AICAR es van comportar de manera similar, necessitant temps més elevats per recol·locar-se sobre les quatre potes en comparació dels WT (**Figura 103B**). Malgrat que en la majoria dels punts estudiats els animals WT tractats amb AICAR van necessitar un temps inferior per girar-se, les diferències observades no van ser estadísticament significatives en cap dels punts analitzats. Per altra banda, quan es van analitzar els resultats del TT, tant els animals malalts injectats amb salí com els tractats amb AICA van mostrar temps menors i puntuacions inferiors comparats amb els WT (**Figura 103C**). Pel que fa als animals SMNΔ7 tractats amb AICAR, es va observar un empitjorament significatiu en l'execució d'aquest test a P3 en comparació dels animals malalts injectats amb salí; no obstant, aquesta disminució no es va mantenir al llarg de l'estudi.

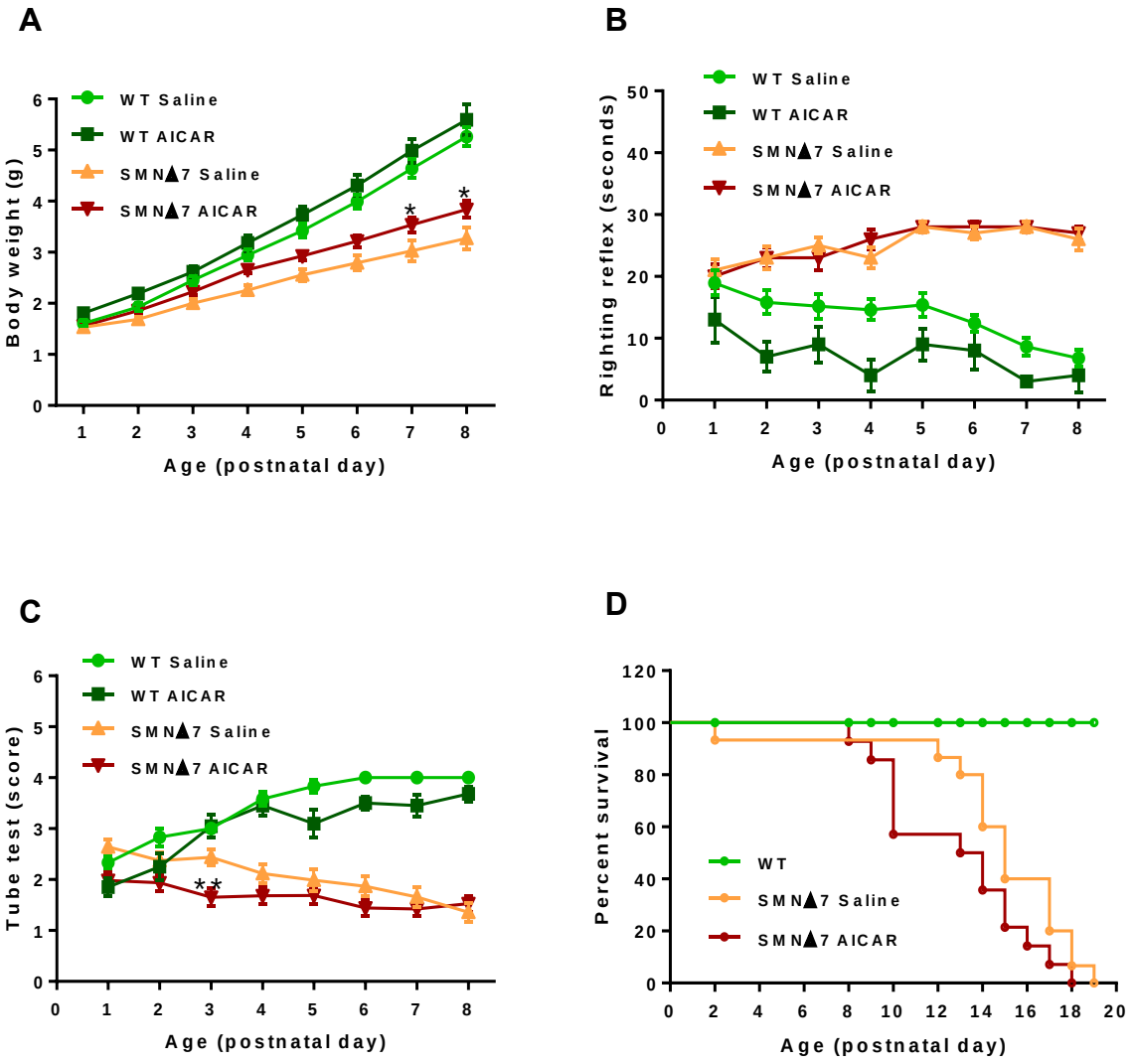


Figura 103. El tractament crònic amb AICAR atenua modestament l'arrest en l'augment del pes corporal dels animals SMNΔ7 però no millora el fenotip motor. *(A) Pes corporal d'animals WT i animals SMNΔ7 tractats amb salí i amb AICAR. (B-C) Valoració del comportament motor mitjançant el Righting Reflex (RR) (B) i el Tube Test (TT) (C). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA-one way (Bonferroni's post-hoc test) a partir dels valors de 15-28 animals per grup experimental; *p<0,05, **p<0,01. (D) Corba de supervivència Kaplan-Meier d'animals SMNΔ7 injectats amb salí i amb AICAR, i animals WT salins. n=14-15 animals es van utilitzar per condició experimentar (Student's test; p>0,05).*

Per a determinar si el tractament crònic amb AICAR era capaç de prolongar l'esperança de vida dels ratolins SMNΔ7, es va controlar la supervivència d'un grup d'animals malalts injectats diàriament, bé amb l'agonista de l'AMPK o bé amb salí, des de P1 fins a la mort. La corba de supervivència Kaplan-Meier es mostra a la **Figura 103D**. L'administració d'AICAR no va aconseguir cap efecte significatiu en l'esperança de vida dels animals malalts (SMNΔ7-salí: 14,6±1 dies, SMNΔ7-AICAR: 12,8±0,8 dies). A més, en aquest grup d'animals SMNΔ7 tractats

amb AICAR, no es van observar millores significatives en el rendiment motor, i l'increment del pes corporal es va mantenir únicament fins P10 (dades no mostrades).

El tractament amb AICAR atenua l'atròfia muscular associada a l'AME.

Per a determinar si el tractament de l'agonista de l'AMPK era capaç de millorar la patologia muscular lligada a l'AME, es va examinar el fenotip del múscul tibial anterior (TA). Tal i com era d'esperar, el pes del múscul TA dels animals SMNΔ7 tractats amb salí va ser significativament menor que aquells dels animals WT (reducció d'aproximadament el 40%; $p<0,01$) (**Figura 104A**). Es va observar un augment (≈15%) no significatiu del pes dels músculs dels animals WT tractats amb AICAR respecte als injectats amb salí. No obstant, en el cas dels animals SMNΔ7, el tractament crònic amb AICAR va causar un increment significatiu del pes del TA (≈27%; $p<0,05$), encara que aquest increment no va assolir el pes mitjà observat en els animals WT tractats amb salí.

En concordança amb altres resultats [129], l'anàlisi de les seccions transversals dels TA va revelar que els animals SMNΔ7 injectats amb salí presentaven un ≈19% menys de fibres musculars en comparació dels WT salins; tot i això, les diferències no van ser significatives, probablement a causa del baix nombre de mostres estudiades (n=4). Així mateix, el tractament amb AICAR va resultar en un subtil, no significatiu, augment (≈24%) del nombre de miofibres al TA d'animals SMNΔ7 (**Figura 104C**).

Tal i com cabia esperar, les fibres musculars del TA del ratolins malalts injectats amb salí van mostrar una disminució de l'àrea d'aproximadament el 32% quan es van comparar amb les fibres d'animals WT salins. En concordança amb els canvis en el pes dels músculs induïts pel tractament crònic amb AICAR, es va trobar un augment significatiu de la mida de les fibres musculars del TA tant en animals SMNΔ7 com en WT tractats amb l'agonista de l'AMPK (**Figura 104B**). La distribució de les freqüències relatives de les àrees de les miofibres va demostrar un desplaçament cap a fibres de major calibre en els músculs TA dels animals tractats amb AICAR, tant dels WT com dels SMNΔ7 (**Figura 104D, E**). Així, en absència d'entrenament físic, l'administració crònica d'AICAR incrementa la mida de les miofibres i, per tant, la massa del múscul esquelètic tant en animals sans com malalts. En els ratolins SMNΔ7, l'AICAR sembla tenir un efecte particularment beneficiós, ja que limita el grau d'atròfia muscular lligada a l'AME que resulta de l'alteració del desenvolupament postnatal de les miofibres [123, 129, 134].

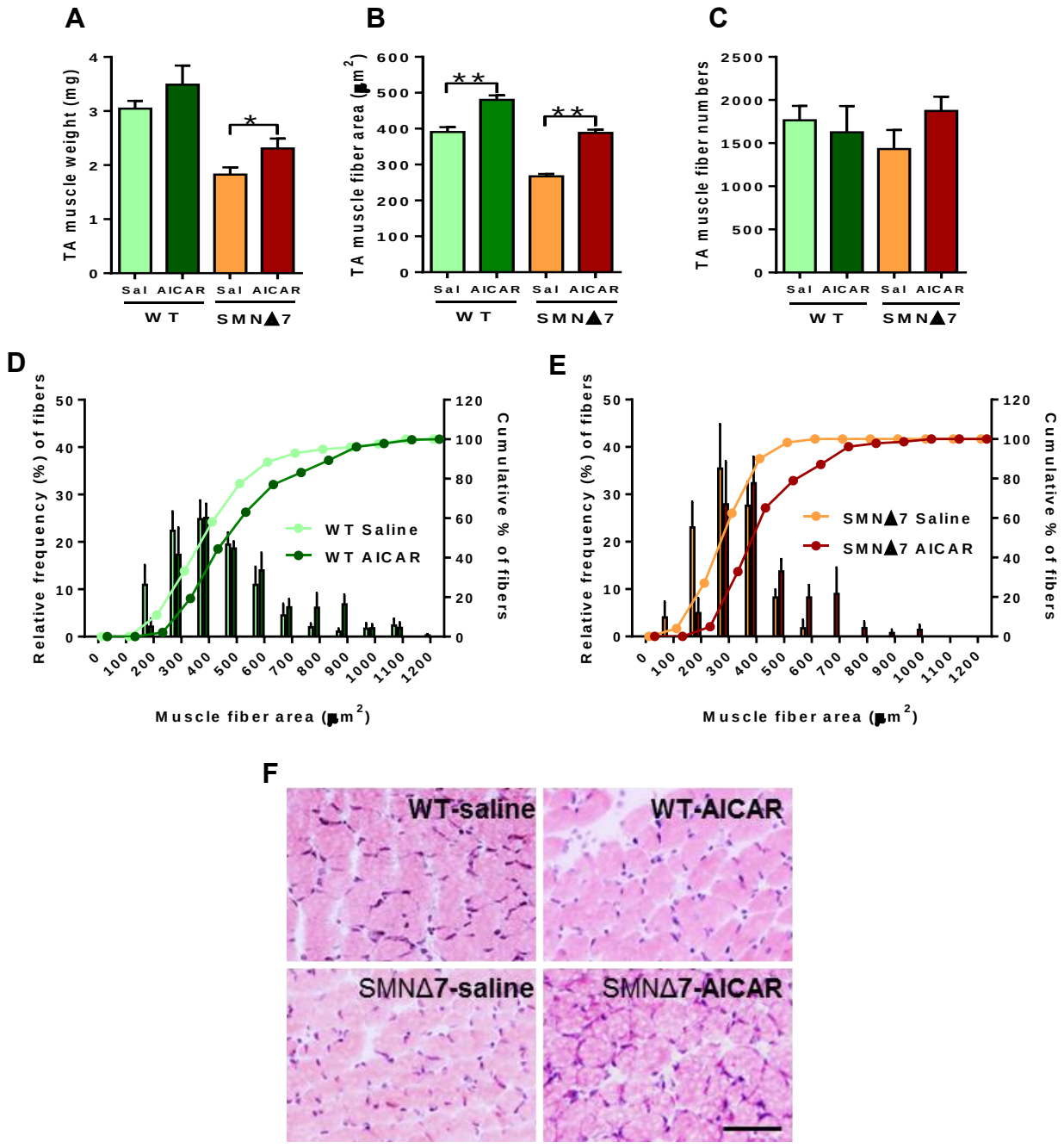


Figura 104. Efectes del tractament crònic amb AICAR en el múscul tibial anterior (TA) d'animals SMNΔ7. *(A) Pes dels músculs TA d'animals SMNΔ7 i WT tractats bé amb salí (sal) o bé amb AICAR (p<0,05; n= 8-11 músculs per condició experimental). (B) Nombre de fibres del TA (n=4 músculs per condició experimental). (C) Àrea de les fibres transversals del múscul TA d'animals sans i malalts després dels corresponents tractaments (n=200-300 fibres de TA obtinguts de 4-5 animals per condició). (D-E) Freqüències relatives de la mida de les miofibres del TA, expressades com el percentatge del total de fibres, d'animals WT (D) o SMNΔ7 (E) sotmesos a injeccions diàries de solució salina o d'AICAR (n=4-5 animals per condició); els percentatges acumulatius de cada grup també es mostren en el mateix gràfic. (D) Imatges representatives de crioseccions del múscul TA, tenyides amb hematoxilina-eosina, d'animals WT i SMNΔ7 injectats amb salí i amb AICAR. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test), *p<0,05, **p<0,01. Barra de calibració en (D)=50 µm.*

En el model SMNΔ7 s'ha descrit, a més de la reducció en la mida de les miofibres, una immaduresa de les mateixes per comparació a animals normals [123, 129], que es manifesta amb canvis en la composició de la tipologia de fibres dels músculs atròfics. D'acord amb aquests resultats, es va estudiar si l'AICAR era capaç de modular les alteracions en la tipologia de fibres observades en l'AME. Els diferents tipus de fibres musculars expressen isoformes específiques de les cadenes pesades de miosina (MyHC, de l'anglès *myosin heavy chain*) [380]. Per tant, es van utilitzar diversos anticossos específics contra diferents isoformes MyHC (I, IIa i IIB) per tal d'analitzar la tipologia de les fibres musculars (**Figura 105**). El patró dels tipus de fibres en els músculs TA dels ratolins WT injectats amb salí va ser similar als descrits prèviament [307], amb proporcions baixes de fibres de tipus I i IIA i un predomini de fibres de tipus IIB.

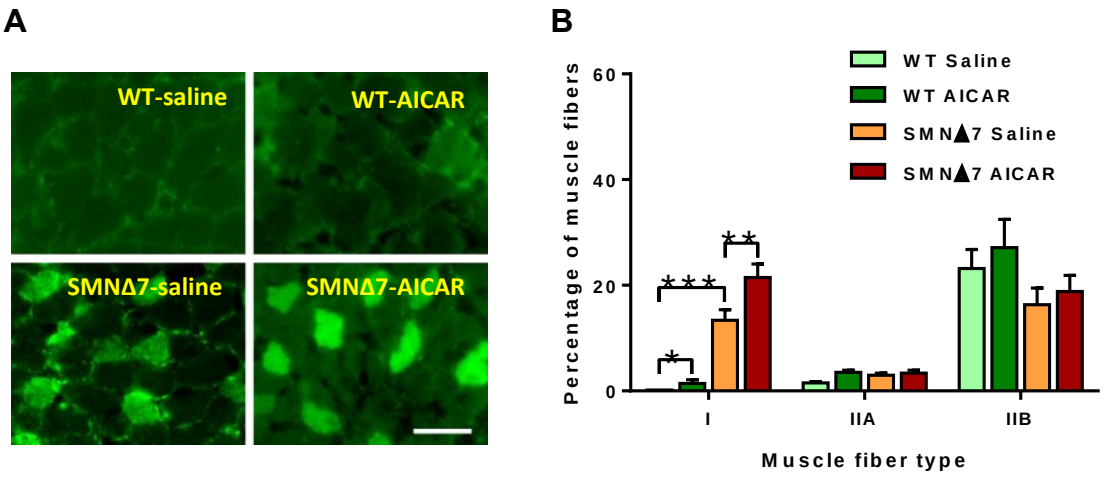


Figura 105. Efectes de l'administració crònica d'AICAR sobre la tipologia de fibres en el múscul TA d'animals WT i SMNΔ7. *(A) Imatges representatives de l'immunomarcatge de la cadena pesada de miosina I (MyHC I) en músculs d'animals WT i SMNΔ7 tractats amb salí o amb AICAR. (B) Resum gràfic del percentatge de fibres immunomarcades amb MyHC I, MyHC IIA i MyHC IIB (miofibres de tipus I, tipus IIA i tipus IIB, respectivament) en el TA d'animals WT i SMNΔ7 després del tractament amb AICAR. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; n=20 seccions de músculs TA de 4-5 animals per condició experimental. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test). Barra de calibració en (A)=25 µm.*

La proporció de fibres musculars dels ratolins SMNΔ7 injectats amb salí va mostrar, en relació amb els WT salins, un augment significatiu de fibres de tipus I i una reducció, encara que no significativa, de fibres de tipus IIB. L'administració d'AICAR va incrementar el percentatge de fibres de tipus I tant en els músculs d'animals sans com malalts, mentre que no es van observar canvis aparents en la població de fibres IIA i IIB. Per tant, el TA d'animals malalts (múscul majoritàriament compost en condicions normals per fibres de tipus ràpides,

glicolítiques) va exhibir un canvi en el perfil d'expressió de la miosina, amb un increment anormal de la proporció de miofibres de tipus I (lentes, oxidatives) que va ser accentuat pel tractament amb AICAR.

El tractament amb AICAR mitiga parcialment els defectes de les unions neuromusculars dels animals SMNΔ7.

A continuació es va plantejar si l'AICAR estaria modificant els defectes estructurals que es troben a les unions neuromusculars (NMJs) dels animals SMNΔ7. Amb la finalitat d'analitzar la citoarquitectura de les NMJs, es va realitzar un immunomarcatge de seccions dels músculs TA i IC provinents de talls de criòstat amb anticossos específics contra NF (neurofilament) i SV2 (*synaptic vesicle protein 2,* proteïna de les vesícules sinàptiques) per marcar els axons i els nervis terminals, respectivament, a més de marcar amb α-Bgtx per identificar els receptors postsinàptics d'acetilcolina. Es van obtenir seccions Z (1 μm de gruix) al confocal i es va reconstruir l'estructura 3D de les NMJs. La dennervació del múscul esquelètic s'ha descrit com una característica fisiopatològica de l'AME en humans que és recapitulada en diversos models murins de la malaltia [115, 134, 302]. En el model SMNΔ7 s'ha reportat una dennervació en músculs específics, com aquells que estan pròxims al tronc, i canvis discrets en altres (particularment els localitzats en les extremitats posteriors) que semblen estar completament innervats malgrat la progressió de la malaltia [174, 302]. De fet, a P8 (l'edat examinada en el present estudi) no es va trobar un augment significatiu de la dennervació de les unions neuromusculars en el múscul TA dels animals SMNΔ7 quan es comparava amb els WT (WT: 9,6% ± 1,2% NMJ dennervades, SMNΔ7: 12,3% ± 1,6% NMJ dennervades; p>0'05); n=78 i 94 NMJs de 3-4 animals per condició). Per aquest motiu, es va estudiar el múscul IC, el qual presenta un paper important en el manteniment de la funció respiratòria i és clínicament rellevant en l'AME. A més,se sap d'estudis anteriors que, en ratolins afectats per la malaltia, les unions neuromusculars de l'IC mostren importants defectes moleculars i estructurals [115, 122]. El grau d'innervacio es va classificar en funció de l'àrea postsinàptica (marcada amb α-Bgtx) que quedava ocupada per terminals presinàptics (marcats amb SV2), de manera que les NMJs es van considerar dennervades quan el percentatge d'àrea era menor del 15%. En relació amb els animals WT injectats amb salí, es va observar un increment (d'aproximadament el 50%) en el nombre d'unions neuromusculars dennervades en el músculs IC de ratolins SMNΔ7. El tractament crònic amb l'agonista de l'AMPK va prevenir de manera significativa la dennervació associada a l'AME en el múscul IC d'animals SMNΔ7 (reducció del 45% de les NMJs dennervades comparant amb els SMNΔ7 salins; p<0,05) (**Figura 106**).

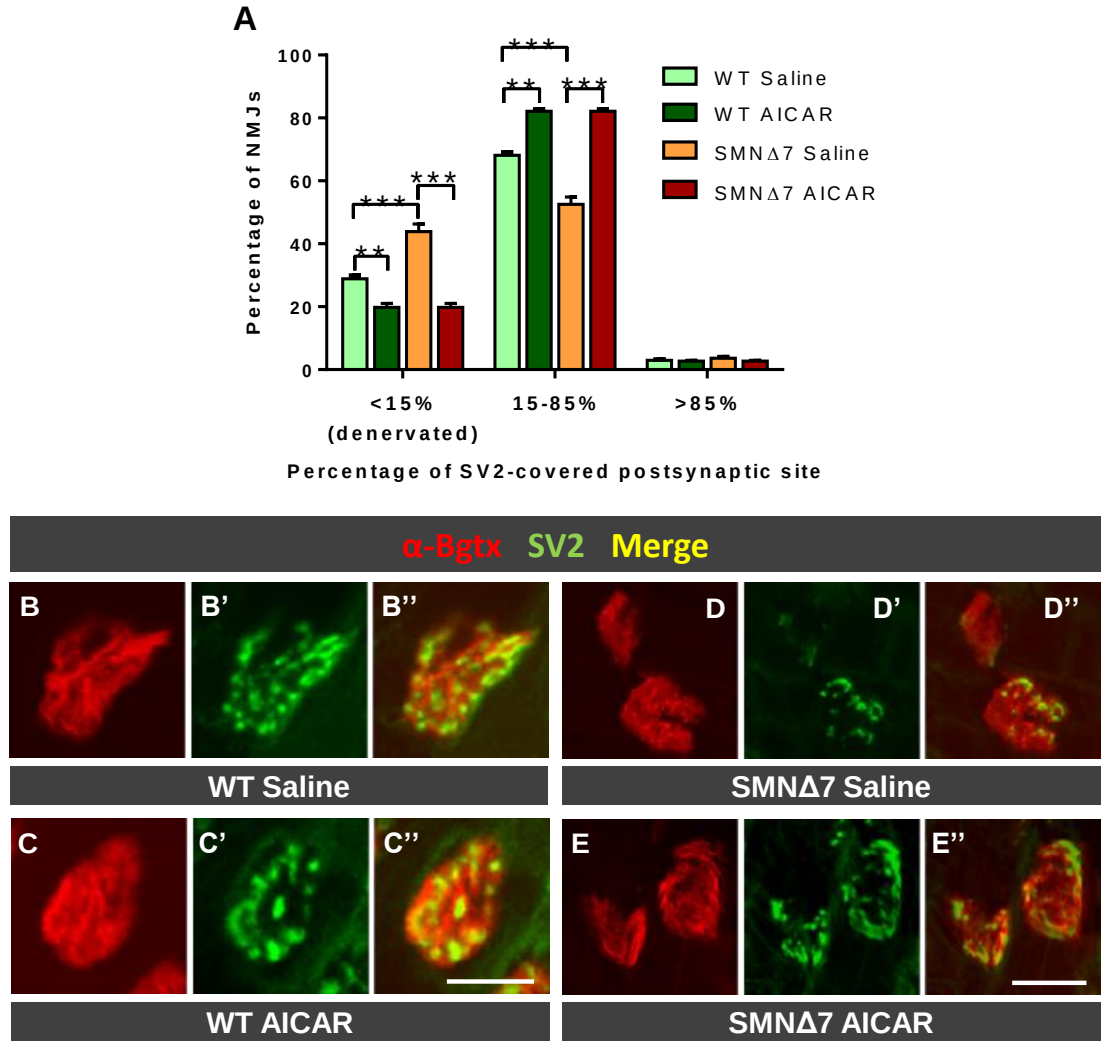


Figura 106. Efectes del tractament crònic amb AICAR sobre el grau d'innervació de les unions neuromusculars (NMJs) del múscul intercostal (IC) d'animals WT i SMNΔ7. *(A) Percentatges de NMJs mostrant diferents graus d'innervació. (B-E'') Imatges representatives il·lustrant els resultats mostrats en (A); les imatges es van obtenir a partir de seccions immunomarcades amb SV2 (verd) i marcades amb α-Bgtx (roig) per identificar el terminal postsinàptic. (**p<0,01, ***p<0,001; n=75-100 NMJs de músculs IC de 4-5 animals per condició experimental). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test). Barra de calibració =10 µm en (C'') s'aplica a (B-C'') i (E')'= s'aplica a (D-E'').*

Les NMJs d'animals diagnosticats d'AME manifesten canvis estructurals indicatius d'un retard de la maduració de les sinapsis [115, 120, 123]. La innervació simple o múltiple es va estimar contant el nombre d'axons preterminals (marcats amb NF) que entraven en contacte amb un únic terminal postsinàptic: una NMJ es considerava que estava poliinervada quan 2 o més axons convergien al mateix terminal postsinàptic (**Figura 107D'**). Als músculs IC d'animals SMNΔ7 injectats amb salí es va trobar un 40'5% de plaques motores innervades de manera polineuronal a diferència del 8% observat en els WT salins (p<0,001) (**Figura 107**).

L'administració d'AICAR va reduir significativament (50%; p<0,001) el nombre de plaques motores poliinervades observades als IC dels animals afectats per la malaltia (**Figura 107E'**).

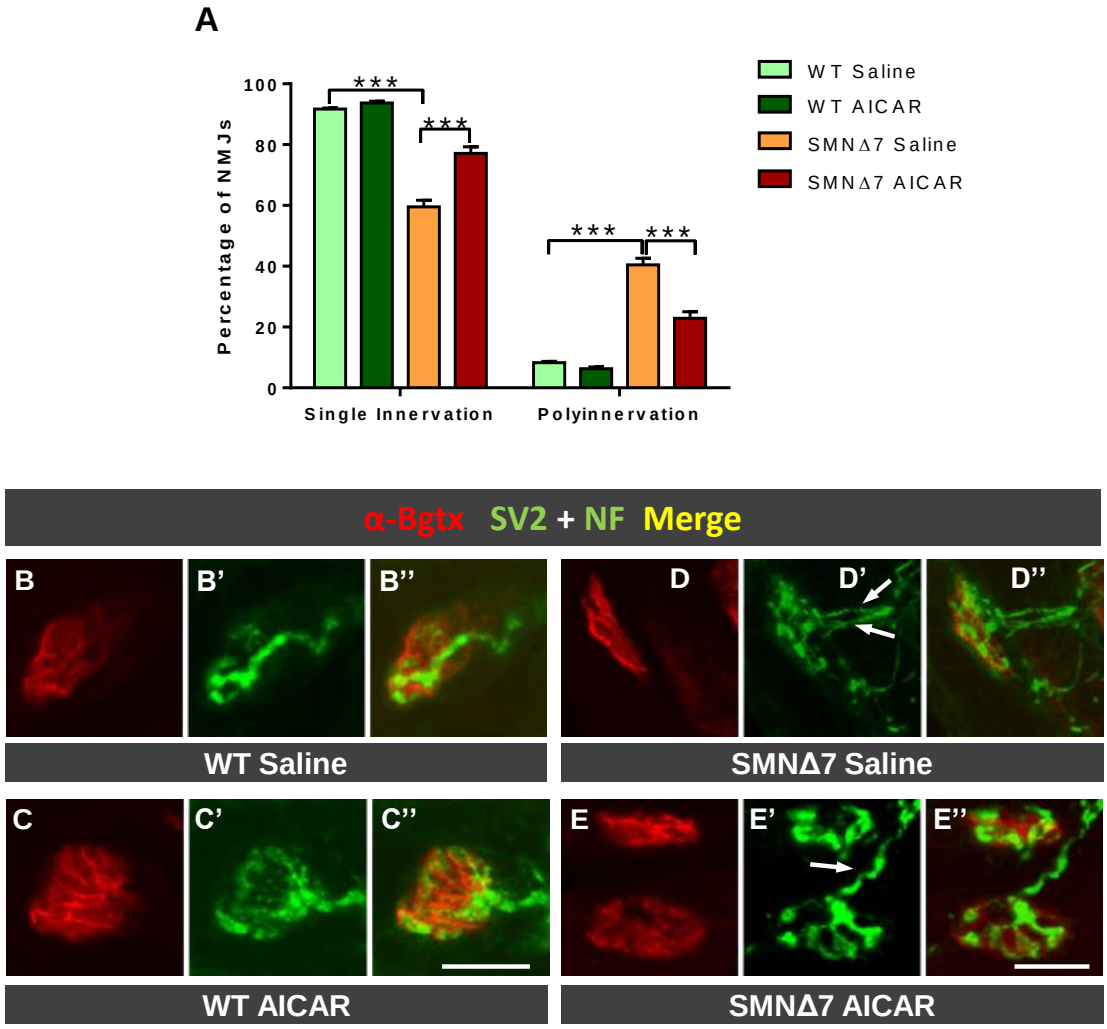


Figura 107. Efecte del tractament crònic amb AICAR sobre el grau de maduresa de les NMJs del múscul IC d'animals WT i SMNΔ7. *(A) Percentatge de NMJs que mostren innervació simple i múltiple. (B-E'') Imatges representatives il·lustrant els resultats en (A): les seccions musculars van ser immunomarcades amb SV2 i NF (verd) i amb α-Bgtx (roig). Les fletxes a (D') indiquen les NMJs amb innervació múltiple l'SMNΔ7 injectat amb salí i amb (E') innervació simple al SMNΔ7. (***p<0,001; n=75-100 NMJs de músculs IC de 4-5 animals per condició experimental). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test). Barra de calibració=10 µm en (E'') s'aplica a (B-E'').*

A més, basant-se en l'estructura de les estructures postsinàptiques (marcades amb α-Bgtx) i seguint els criteris descrit amb anterioritat [115], es van classificar les NMJs segons el grau de maduresa en: *plaque, folds, perforated, second structure* (d'immadures a madures). Es va trobar que, en relació als ratolins WT injectats amb salí, els músculs IC dels animals SMNΔ7 salins mostraven un augment notable del nombre de NMJs amb forma de placa (*plaque*) i una

reducció significativa del nombre d'aquelles que exhibien plegaments (*folds*) o una aparença perforada de tipus "*pretzel*" (**Figura 108A**, **B**). Aquestes alteracions estructurals, que reflecteixen una immaduresa de les NMJs dels animals malalts, van ser parcialment previngudes pel tractament crònic amb AICAR (SMNΔ7-AICAR *vs* SMNΔ7-salins = *plaque*: disminució de ≈30% (p<0,001); *folds*: increment del ≈50% (p<0,001); *perforated*: increment del ≈450% (p<0,001)).

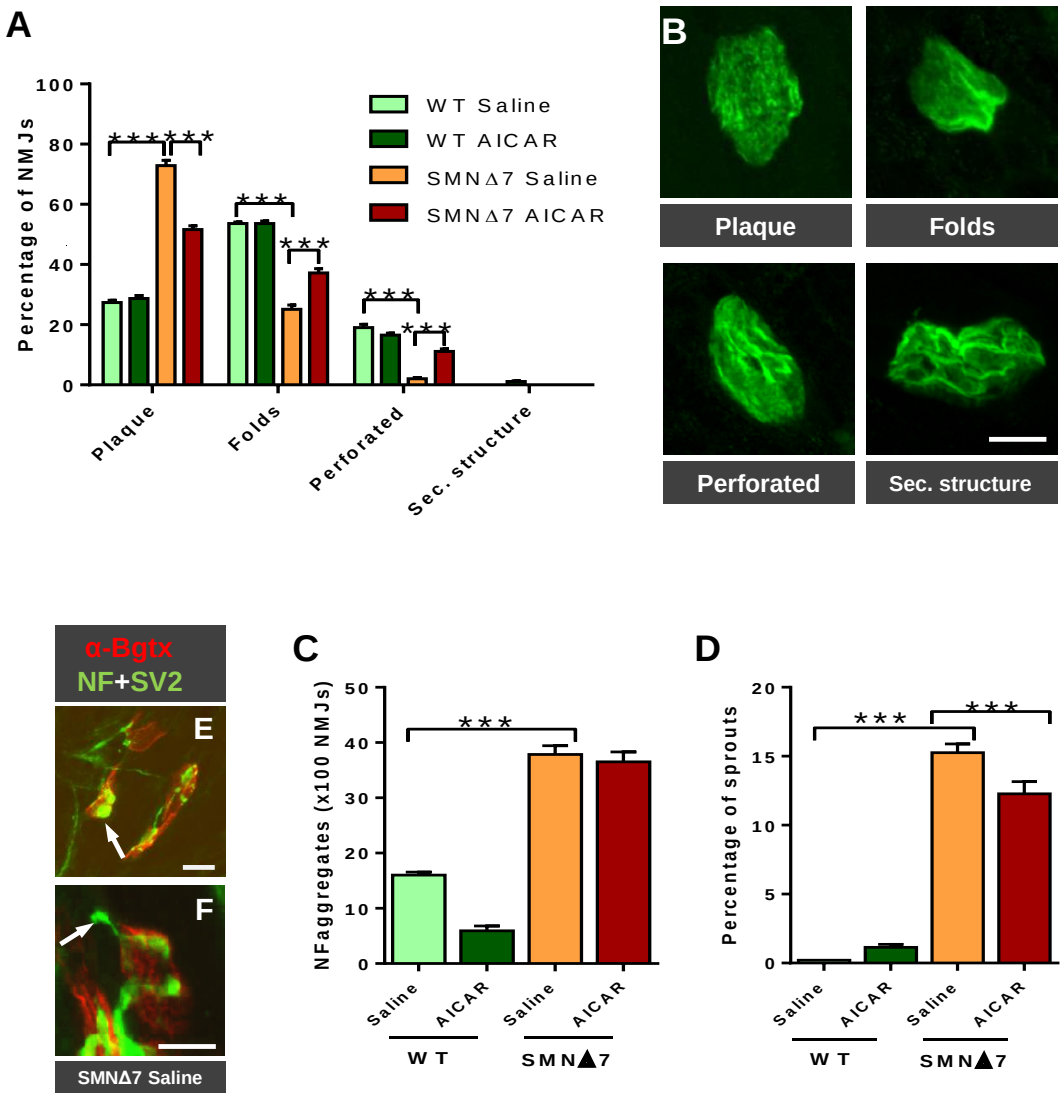


Figura 108. Efectes del tractament crònic amb AICAR sobre els defectes en les NMJs de músculs IC lligats a l'AME*. (A) Percentatge de NMJs mostrant diferents graus de maduració avaluats per la morfologia observada a les imatges de (B). (C, D) Nombre de NMJs mostrant agregats de NF (C) i sprouts terminals (D). (E, F) Imatges representatives que mostren agregats de NF (E, fletxa) i sprouts terminals (F, fletxa) en músculs IC d'animals SMNΔ7. (***p<0,001; n=75-100 NMJs de músculs IC de 4-5 animals per condició experimental L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test). Barra de calibració=10 µm en (B) s'aplica a (E,F).*

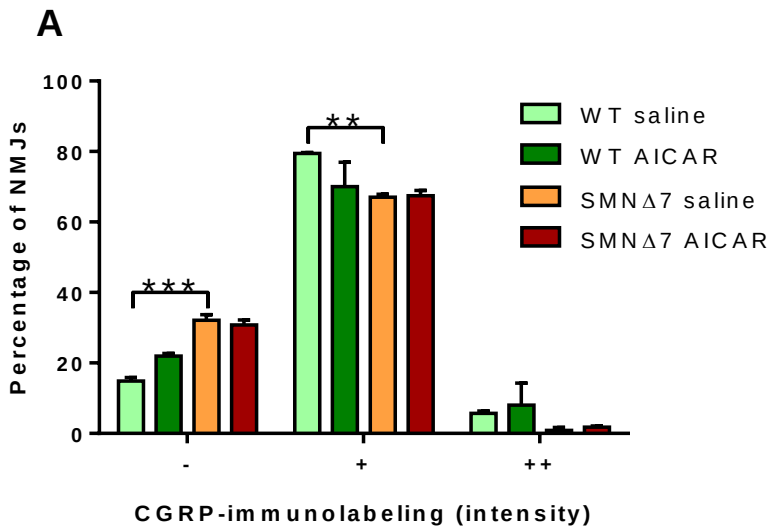
Addicionalment, es va explorar si l'AICAR era capaç de modificar alguns dels canvis histopatològics presinàptics que es troben a les unions neuromusculars d'animals malalts, tals com l'acumulació de NF en els terminals presinàptics i l'*sprouting* axonal [115, 122, 381]. Es va considerar una acumulació aberrant de NF quan l'axó terminal exhibia un engruiximent en la morfologia i era fortament marcat amb l'anticòs contra NF. L'*sprouting* es va representar com el percentatge del total de NMJs analitzades per múscul que presentaven *sprouts*. Tal i com cabia esperar en els animals malalts, es va observar un nombre elevat de NMJs (≈41,7%) que contenien agregats de NF a les sinapsis, defecte que no es va veure corregit per l'administració d'AICAR (**Figura 109C**, **E**). En canvi, el tractament amb l'agonista de l'AMPK va disminuir de manera significativa el nombre d'*sprouts* terminals observats en els IC d'animals malalts (**Figura 108D, F**) (SMNΔ7-salí: 15,26% ± 0,63% NMJs, SMNΔ7-AICAR: 12,28% ± 0,88% NMJs; p<0,001).

Per altra banda, es va estudiar l'expressió del CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), un neuropèptid que s'emmagatzema en grans vesícules de nucli dens al soma de les motoneurones de la medul·la espinal i en els terminals axonals, on sembla tenir un paper important en el desenvolupament i el manteniment de les NMJs [278, 303-305]. L'immunomarcatge del CGRP es va avaluar d'acord amb la intensitat de fluorescència que presentaven i es va classificar en: positiu, moderadament positiu (senyal més fluixa però distingible del fons), i negatiu. D'acord amb resultats previs d'aquest laboratori [122, 306], es va veure un reducció marcada de l'expressió del CGRP tant en les motoneurones de la medul·la espinal com en les unions neuromusculars dels músculs TA i IC dels ratolins SMNΔ7 injectats amb salí. Aquesta disminució del CGRP no es va veure modificada en cap dels teixits després del tractament amb AICAR, tal i com es mostra a la (**Figura 109**) per al cas del múscul IC.

L'AICAR no protegeix contra la mort de les motoneurones ni la gliosis reactiva però prevé la deaferentació en la medul·la espinal de ratolins SMNΔ7.

La pèrdua progressiva de MNs s'ha considerat una característica patològica de l'AME. D'acord amb observacions prèvies d'aquest laboratori [176], a P8, moment en que exhibien un dramàtic deteriorament de les habilitats motores, els animals SMNΔ7 injectats amb salí van mostrar una reducció moderada, però significativa, del nombre de MNs (pèrdua d'aproximadament el 30% respecte als WT salins) (**Figura 110A**, **C**, **E**), a més d'una disminució de l'àrea de les mateixes (≈15% respecte als WT injectats amb salí) (**Figura 110B**, **C**, **E**). Per tant, a continuació, es va explorar si els canvis induïts per l'administració crònica amb AICAR

sobre el fenotip del múscul esquelètic d'animals SMNΔ7 anaven acompanyats d'un increment de la supervivència de les MNs o de l'àrea d'aquestes. Les injeccions d'AICAR no van tenir cap efecte sobre el nombre o la mida de les MNs aparentment sanes de la medul·la espinal ni en els ratolins WT ni en els malalts (**Figura 110**).



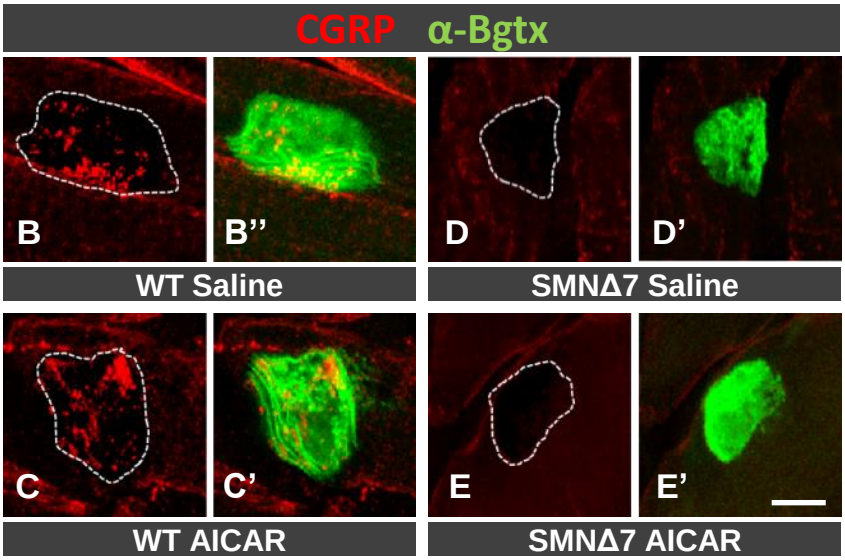


Figura 109. Efecte del tractament crònic amb AICAR sobre l'expressió del CGRP (calcitonin gene-related peptide) en les NMJs del múscul IC*. (A) Percentatge de NMJs que mostren diferents intensitats de l'immunomarcatge amb CGRP. (B-E') Imatges representatives mostrant la immunofluorescència del CGRP (roig) en NMJs d'animals de les diferents condicions experimentals. Les línies discontinues en (B, C, D i E) delimiten les plaques motores marcades amb α-Bgtx en (B', C', D' i E'). (**p<0,01, ***p<0,001; n=75-100 NMJs de músculs IC de 4-5 animals per condició experimental). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test). Barra de calibració=10 µm en (E') s'aplica a (B-E').*

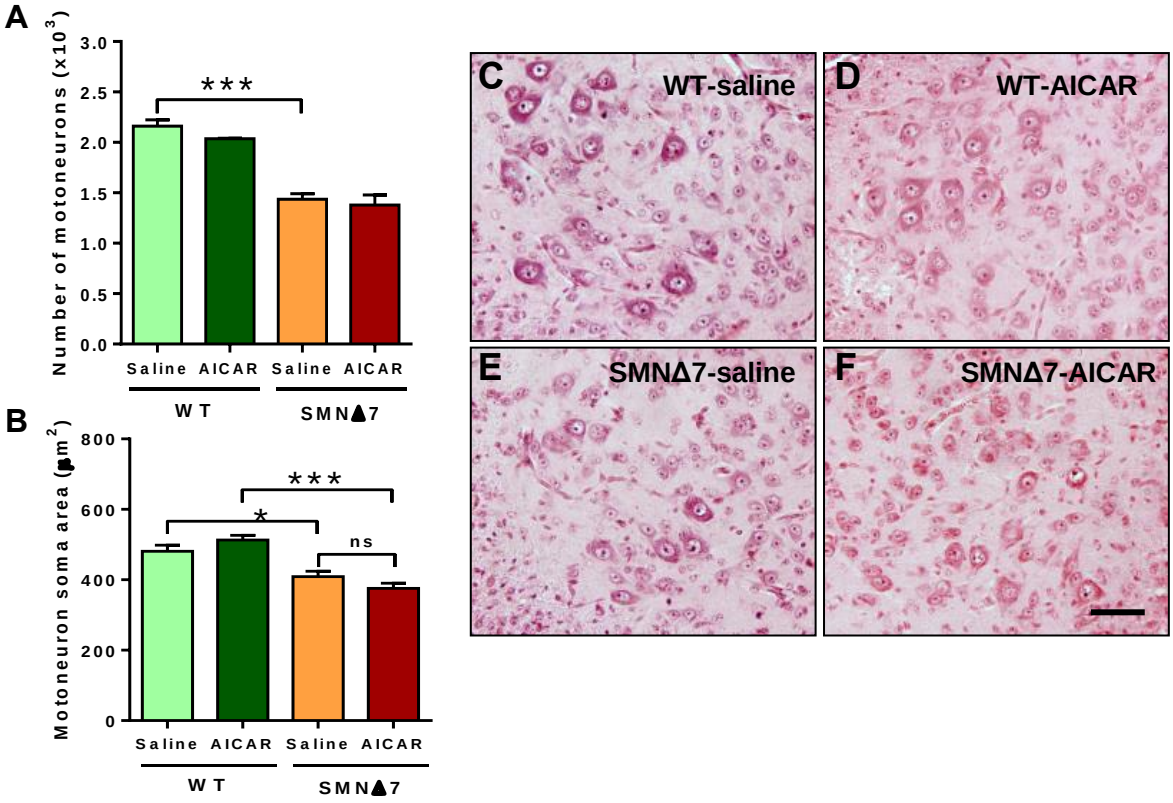


Figura 110. El tractament crònic amb AICAR no atenua la degeneració de les motoneurones (MNs) en animals SMNΔ7*. (A) Nombre de MNs aparentment sanes i (B) àrea del soma de les MNs. El comptatge neuronal es va realitzar en 5-6 animals per condició i l'àrea es va mesurar en 120-125 MNs per condició experimental. (C-F) Imatges representatives de les MNs de la banya ventral d'animals P8 WT (C, D) i SMNΔ7 (E, F) injectats amb salí (C, E) o amb AICAR (D,F). Les seccions de parafina de la medul·la espinal es van tenyir amb hematoxilina-eosina. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (*p<0,05, ***p<0,001) Barra de calibració=50 μm en (F) s'aplica a (C-F).*

Malgrat no protegir contra la degeneració de les MNs, es va voler explorar si l'AICAR exercia algun efecte beneficiós en altres canvis histopatològics descrits a medul·la espinal en l'AME, tals com la reacció microglial i astroglial en la banya ventral o la pèrdua d'ínputs excitatoris glutamatèrgics en el soma de les MNs [122, 163, 174-176]. L'anàlisi immunocitoquímica amb anticossos contra IBA1 (*Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) i GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), per marcar la micròglia i l'astroglia respectivament, va revelar que l'administració d'AICAR no atenuava ni la microgliosi ni la astrogliosi observada en els animals SMNΔ7 (**Figura 111**). No obstant, la pèrdua observada de les sinapsis positives per a VGluT1 (*Vesicular glutamate transporter 1*) que contacten amb els somes de les MNs en els animals SMNΔ7 injectats amb solució salina (reducció ≈55% respecte als WT salins) es va veure atenuada després del tractament amb AICAR (augment d'aproximadament el 50% en els animals SMNΔ7 tractats respecte als salins) (**Figura 112**).

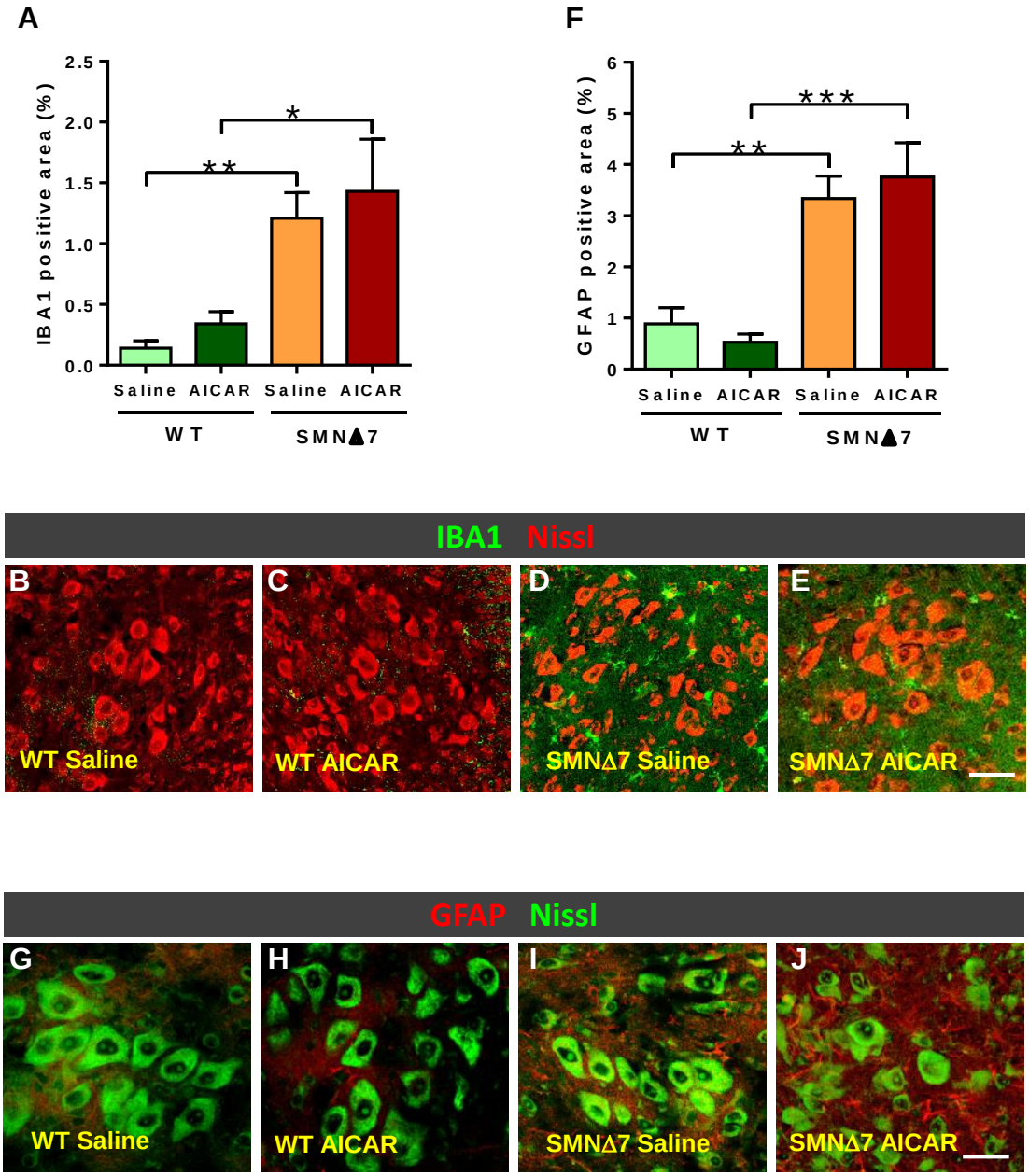


Figura 111. La reacció microglial i astroglial observada en la medul·la espinal d'animals SMNΔ7 no es veu mitigada pel tractament crònic amb AICAR. *Quantificació de perfils microglials positius per a IBA-1 (A) i perfils astroglials positius per a GFAP (F) al voltant de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal. L'anàlisi d'imatges es va dur a terme amb 30-35 seccions de medul·la espinal per condició experimental (4-6 animals de cada genotip i tractament). Es mostren imatges representatives utilitzades per a la quantificació de perfils positius d'IBA-1 (B-E, verd) i de GFAP (G-J, roig); es van realitzar tincions fluorescents amb Nissl [roig en (B-E) i verd en (G-J)] per visualitzar les MNs. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (*p<0,05, **p<0,01,***p<0,001). Barra de calibració=60 µm en (E) s'aplica a (B-E), 40 µm en (J) s'aplica a (G-J).*

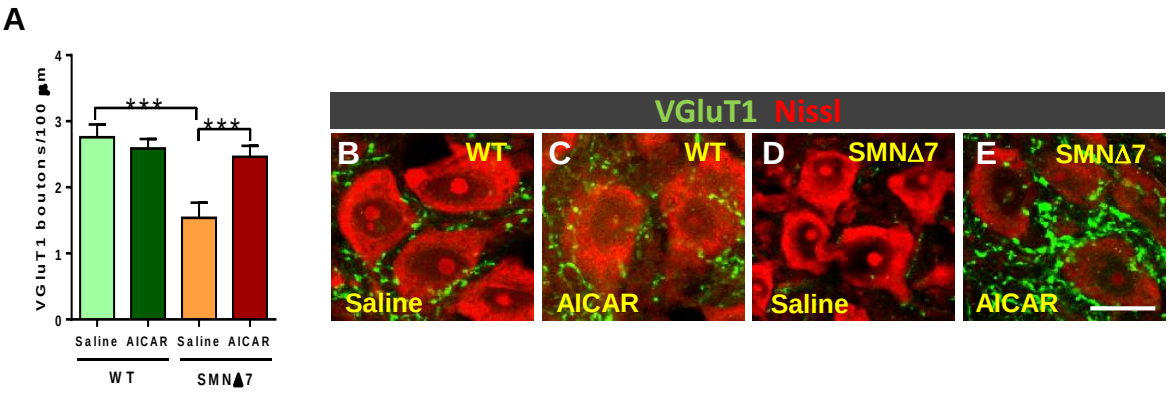


Figura 112. El tractament crònic amb AICAR evita le pèrdua d'ínputs sinàptics excitatoris glutamatèrgics lligats a l'SMA. (*A) Nombre de botons positius per a VGluT1 que es troben en contacte per cada 100 µm del perímetre del soma de les MNs de la medul·la espinal. (B-E) Imatges representatives de MNs d'animals P8 mostrant ínputs glutamatèrgics marcats amb l'anticòs VGluT1 (verd); les MNs es van visualitzar amb el marcatge de Nissl fluorescent (roig). Els comptatges es van realizar amb 35-45 MNs per animal (3-4 ratolins per condició experimental). L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (***p<0,001). Barra de calibració=20 µm en (E) s'aplica a (B-E).*

L'administració d'AICAR no modifica la subunitat NR2A del receptor d'NMDA en la medul·la espinal d'animals SMNΔ7.

S'ha reportat que l'exercici físic provoca un increment de l'expressió del gen codificant per a la subunitat NR2A del receptor de glutamat NMDA en les MNs d'animals amb AME de tipus II [124]. Amb l'objectiu de determinar si l'AICAR exercia el mateix efecte sobre la modulació de l'expressió de la proteïna NR2A en la medul·la espinal, i en particular en les MNs, es van realitzar anàlisis immunocitoquímiques i Western Blots. En contra del descrit anteriorment [124], no es va observar una reducció de l'expressió de la subunitat NR2A en les MNs lumbars dels animals SMNΔ7. La quantificació de la immunofluorescència per a l'NR2A a les seccions de la medul·la espinal d'animals WT i animals malalts va donar uns nivells d'intensitat comparables en ambdós condicions (**Figura 113A**, **M**). Resultats similars es van obtenir en la quantificació del contingut de la proteïna NR2A en la medul·la espinal mitjançant Western Blot (**Figura 113N**, **O**). Els nivells d'expressió de la proteïna NR2A no es van veure modificats de manera significativa després de l'administració de l'AICAR (**Figura 113**).

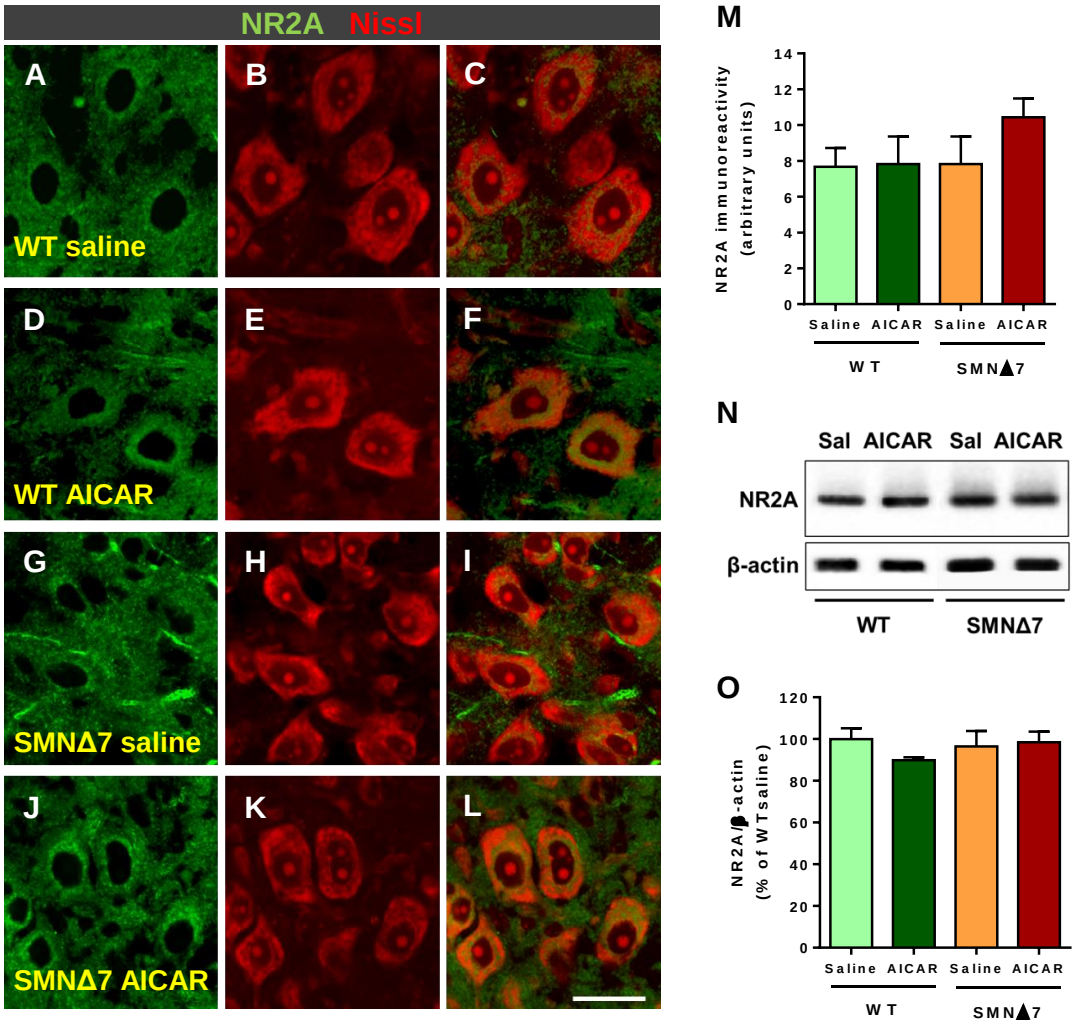


Figura 113. Expressió de la subunitat NR2A del receptor d'NMDA en la medul·la espinal de ratolins P8 WT i SMNΔ7 tractats crònicament amb salí o AICAR. *(A-L) Imatges representatives de seccions de criòstat d'animals injectats amb salí (A-C, G-I) i amb AICAR (D-F, J-L), WT (A-F) i SMNΔ7 (G-L), mostrant la immunoreactivitat d'NR2A (verd) en les MNs, que es visualitzen amb marcatge fluorescent de Nissl (roig). (M) Quantificació de la intensitat d'immunomarcatge amb NR2A dels somes de les MNs d'animals sotmesos a tractament; es van analitzar 75-85 MNs de 3-4 animals per condició experimental. (N) Western Blots representatius de la quantificació de l'expressió d'NR2A en extractes de medul·la espinal de 3-4 animals per genotip i tractament, com a control de càrrega es va utilitzar la β-actina. (O) Anàlisi desitomètrica dels nivells de proteïna NR2A als Western Blots; s'expressa el percentatge de canvi en relació a la ràtio NR2A/β-actina del WT salí. L'anàlisi estadística es va realitzar mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) Barra de calibració=30 µm en (L) s'aplica a (A-L).*

L'AICAR no incrementa l'expressió dels nivells d'SMN en la medul·la espinal ni en el múscul esquelètic de ratolins SMNΔ7.

L'efecte beneficiós que l'exercici físic ha demostrat tenir sobre animals afectats per l'AME s'ha associat amb un increment de la quantitat de transcritps SMN que contenen l'exó 7, i per tant, amb els nivells de proteïna SMN en la medul·la espinal [359]. Per aquesta raó es va voler estudiar si hi havia algun canvi en els nivells d'expressió de l'SMN en la medul·la espinal i el múscul esquelètic després del tractament crònic amb AICAR. L'anàlisi per Western Blot d'extractes de medul·les espinals i de músculs de ratolins SMNΔ7 tractats va manifestar nivells d'SMN similars als trobats als animals injectats amb salí (**Figura 114**). Per tant, l'AICAR no va provocar un increment de proteïna SMN en l'AME.

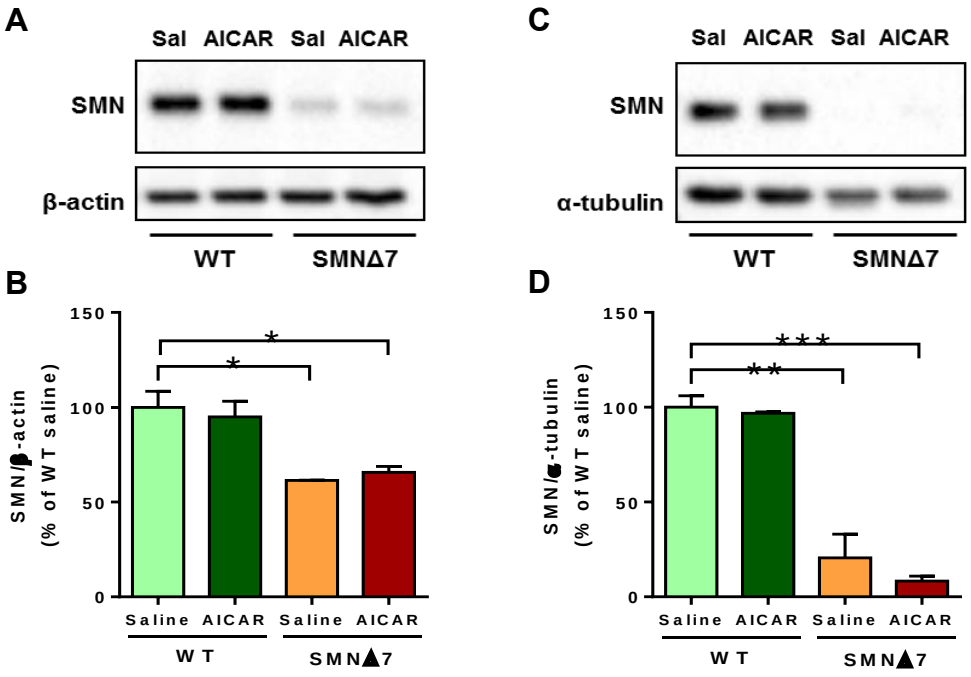


Figura 114. Western Blots realitzats amb l'anticòs contra l'SMN en extractes de (A) medul·la espinal i (C) múscul esquelètic de ratolins P8 WT i SMNΔ7 després del tractament amb salí o AICAR. *L'anàlisi densitomètrica no va indicar canvis significatius ni en la medul·la espinal (B) ni en el múscul esquelètic (D) dels nivells de la proteïna SMN induïts pel tractament amb l'agonista de l'AMPK; la β-actina i la α-tubulina es van utilitzar com controls de càrrega en les Western Blots de la medul·la espinal i el múscul esquelètic respectivament; s'expressa el percentatge de canvi en relació amb la ràtio SMN/β-actina o SMN/α-tubulina del WT salí. L'anàlisi estadística es va realitzar a partir dels valors de 3 animals per condició experimental, mitjançant un ANOVA one-way (Bonferroni's post-hoc test) (*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001).*

VII. DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1

L'atròfia muscular espinal és una malaltia tradicionalment considerada del sistema neuromuscular, caracteritzada per la mort de les MNs de la banya ventral de la medul·la espinal. No obstant, estudis amb models d'AME severa han indicat que la mort neuronal no té lloc fins etapes terminals de la malaltia [122, 153]. En canvi, els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren una mort evident de MNs en el model murí menys sever *Smn*$^{2B/-}$ descartant una relació entre una major mort neuronal i una menor supervivència dels animals afectats per l'AME. Tenint en compte que l'esperança de vida d'aquest model s'allarga fins 22 dies, la mort neuronal té lloc en etapes més inicials, tals com P10, detectant-se atròfia d'aquestes cèl·lules inclús a P5. És més, tot i que el comptatge del nombre absolut de MNs de la medul·la espinal no va denotar diferències significatives entre els animals sans i malalts a P1 (reducció del 2%), es van observar cèl·lules picnòtiques que suggerien l'existència de mort per apoptosi. En aquest aspecte, s'ha descrit un increment i una desregulació de proteïnes implicades en la regulació de la mort neuronal programada en pacients amb AME severa [73, 74, 382] i en el SNC de models murins de la malaltia [75, 76]. És més, recentment s'ha reportat un increment de transcripts provinents de gens relacionats amb l'apoptosi en un subgrup de MNs en el model *Smn*$^{2B/-}$ en etapes presimptomàtiques de la malaltia [383]. A més, aquests autors defensen que les vies de mort cel·lular s'activen amb antelació als esdeveniments neurodegeneratius característics de l'AME que tenen lloc en les NMJs i en els axons. D'acord amb aquestes observacions, la reducció significativa de MN immunoreactives per a la Metaloproteinasa-9 (marcador de MN "*Fast*"), observada a P5 en animals malalts, estaria demostrant una major vulnerabilitat d'un subgrup de MNs i una mort neuronal primerenca en el model *Smn*$^{2B/-}$.

Malgrat que la mort de les MNs en etapes inicials podria suggerir que la patologia s'origina a partir de la disfunció d'aquestes cèl·lules, el fet d'observar mort en etapes inicials no és suficient per afirmar que el dèficit d'SMN afecta únicament o primerament a les motoneurones, ni per descartar una implicació de la proteïna SMN més enllà d'aquestes cèl·lules, com per exemple el paper de l'SMN en l'establiment i manteniment de les NMJs i les sinapsis. De fet, durant la caracterització del model realitzada en aquesta tesi es va observar, també a una edat inicial com és P5, una disminució del nombre d'axons motors sans mielinitzats, a més de defectes en aquests. No obstant, aquesta informació no és suficient per deduir si la degeneració axonal té lloc com a conseqüència de la mort de les MNs (en aquest cas, i en aquestes edats inicials, de les MNs "*Fast*") o si, en canvi, són els defectes en els axons ocasionats pel dèficit d'SMN els que donen lloc a l'activació del programa de mort cel·lular al cos neuronal. Per altra banda, cal remarcar el patró oposat que es va detectar en la presència

de picnosis i de MNs *fosques*, amb un pic a P1 en els animals malalts en el primer cas, i augmentant a partir de P10 el nombre de MNs *fosques*. Si els esdeveniments picnòtics observats són sinònim de mort de MNs per apoptosi, els resultats obtinguts estarien suggerint que a partir de P10 (moment en què les picnosis a la medul·la espinal van ser pràcticament nul·les) estarien tenint lloc altres mecanismes de mort cel·lular, ja que el nombre de MNs continua decreixent a mesura que progressa la malaltia. Per altra banda, el fet que també s'observe, encara que en menor mesura, alguna picnosi en els animals WT, i tenint en compte que es tracta d'animals neonats, podria indicar que es tracta d'un procés de remodelació i maduració de les pròpies MNs en particular i del sistema neuromuscular en general [71, 113, 280].

La major susceptibilitat a la degeneració de les MNs "*Fast*" en el model $Smn^{2B/-}$ concorda amb el menor percentatge de fibres musculars de tipus IIB observat en el múscul TA d'animals malalts, així com amb la major atròfia d'aquesta subpoblació de miofibres. En aquest aspecte, cal remarcar que la classificació de les MN com a "*Fast*" o "*Slow*" es basa en les propietats contràctils de les fibres extrafusals del múscul diana que innerven. Així, les MNs "*Slow*" innerven fibres musculars de contracció lenta, les quals expressen l'isoforma específica de les cadenes pesades de miosina MyHC I; en canvi les miofibres de contracció ràpida són innervades per les MNs "*Fast*" (aquelles que són resistents a la fatiga expressen MyHC IIA, mentre que l'isoforma MyHC IIB és expressada per les miofibres fàcilment fatigables). D'aquesta manera, els resultats han demostrat que en el model murí d'AME $Smn^{2B/-}$, a l'igual que en l'ELA [289-291] i tal i com ocorre en l'envelliment [292, 293], hi ha una subpoblació de MNs, les MNs "*Fast*", que són més susceptibles a la degeneració, el que es tradueix en una major atròfia i vulnerabilitat de les miofibres de contracció ràpida fàcilment fatigables (MyHC IIB). En relació amb aquesta observació, en biòpsies de músculs provinents de pacients amb AME s'ha descrit una atròfia de les miofibres de contracció ràpida, mentre que, com a resultat de mecanismes compensatoris, les fibres musculars de tipus I presenten una hipertròfia [384]. A més, s'han descrit canvis similars en la tipologia de miofibres en el múscul esquelètic en el model murí SMNΔ7 [129].

Diversos estudis apunten la possibilitat que el trastorn primari causant de la mort de les MNs en l'AME podria localitzar-se en el terminal motor, en concret en les sinapsis neuromusculars, i no en el propi soma neuronal [120-122]. Segons aquesta teoria, la lesió seguiria un curs en el qual la degeneració i mort de les MNs seria l'últim pas del procés de la malaltia. Tot i que la causa de l'AME radica en el dèficit de proteïna SMN, actualment, es

desconeix la raó per la qual aquesta disminució condueix, principalment, a la disfunció de les MNs.

En l'estudi de les NMJs en el model *Smn*$^{2B/-}$ s'ha detectant un grau d'afectació que varia entre els músculs i també a mesura que progressa la malaltia. En els músculs tibial anterior i intercostal es va observar afectació tant a nivell presinàptic (acumulació aberrant de neurofilament, plaques dennervades no ocupades pel marcador vesicular SV2 i/o absència del neuropèptid CGRP) com a nivell postsinàptic (organització dels AChR més immadura, mort de miofibres per apoptosi i/o menor mida de les fibres musculars). L'afectació de l'IC es va posar de manifest en etapes considerades presimptòmatiques, P10, sent més evident a P20, però curiosament, no es van detectar signes d'afectació a P30. En canvi, les NMJs del TA d'animals afectats no van mostrar diferències significatives quan es comparaven amb les NMJs dels animals sans ni a P10, ni a P20 (a excepció de l'expressió de CGRP), però sí a P30. Aquesta variabilitat podria ser conseqüència de la diferent vulnerabilitat que presenten les MNs que innerven els dos músculs. De fet, en el model SMNΔ7 s'ha reportat una dennervació en diversos músculs, mentre que altres únicament mostren canvis discrets i es mantenen aparentment innervats malgrat la progressió de la malaltia (en concret els músculs localitzats en les extremitats posteriors) [174, 302]. És més, recentment s'ha descrit diferent vulnerabilitat als defectes en les NMJs en dos grups musculars del model *Smn*$^{2B/-}$ [383], incloent en el grup de músculs més vulnerables el *transversus abdominis* (TVA), *rectus abdominis* (RA) i *external oblique* (EO) (en els quals detecten dennervació i acumulació de NF) i en el de menys vulnerables els músculs l*evator auris longus* (LAL), el *auricularis superior* (AS) i l'*adductor auris longus* (AAL). El fet que a P20 s'observe una reducció en l'expressió de CGRP en el TA, però no es detecten defectes addicionals en les NMJs, concorda amb la marcada reducció observada en l'expressió del neuropèptid en el model *Smn*$^{-/-}$*,SMN2* en sinapsis aparentment normals [122]. A més, es va observar una reducció en l'expressió de CGRP a P10 en les NMJs del múscul IC, però els nivells del neuropèptid en el soma neruonal no van ser distingibles al dels animals WT en aquesta edat. El CGRP és regulat durant el desenvolupament, la plasticitat i la regeneració dels nervis i de les NMJs [278, 303-305, 311] i promou la resposta postsinàptica durant el desenvolupament de les NMJs [385]. A més, s'ha proposat que el CGRP és un activador de la transcripció dels receptors postsinàptics d'acetilcolina [386]. És important remarcar que la regulació a la baixa del CGRP sembla ser específica del sistema motor, ja que l'expressió del neuropèptid no es va veure alterada en el sistema sensorial (a les neurones del DRG). Si la reducció de les vesícules que contenen CGRP

en les NMJs contribueix o no als defectes en la transmissió neuromuscular continua sent objecte de debat.

Resultats previs obtinguts en aquest laboratori a partir de l'estudi del model murí SMNΔ7 [122] assenyalen que els defectes en les NMJs, tant funcionals com morfològics, a diferència del que suggereixen els resultats obtinguts en aquesta tesi amb el model *Smn*$^{2B/-}$, tenen lloc amb antelació a la mort neuronal. Una possible explicació per a les discrepàncies observades entre els diferents models animals podria ser el simple fet de la rapidesa i la progressió general de la malaltia, junt al fet que existeix un requeriment crític de nivells adequats de proteïna SMN durant el desenvolupament prenatal i postnatal per al correcte establiment de les sinapsis neuromusculars [117]. En condicions normals, l'expressió de l'SMN és elevada durant l'etapa embrionària i en els primers dies postnatals aquesta decreix ràpidament [59], al mateix temps que les unions neuromusculars sofreixen importants canvis tant estructurals com funcionals durant les primeres setmanes postnatals [112, 113]. D'aquesta manera, els ratolins SMNΔ7, els quals compten amb nivells menors de proteïna SMN en comparació amb els ratolins *Smn*$^{2B/-}$, podrien veure's més perjudicats pel dèficit d'SMN durant la formació i la maduració de les unions neuromusculars.

Per altra banda la variabilitat en el nivell d'afectació que presenten els diferents músculs en el model *Smn*$^{2B/-}$, així com la diferent afectació de les NMJs en els diferents models murins d'AME, podrien ser degudes, a més, a la presència o absència de mecanismes compensatoris de la dennervació muscular crònica associada a la malaltia. Un d'aquests mecanismes compensadors seria la promoció d'*sprouting* dels nervis intramusculars (ramificació i creixement d'axons intactes que s'escapen de l'àrea ocupada per la NMJ i que són projectats cap a una àrea dennervada [315]). D'aquesta manera, la "millora" observada en les NMJs del múscul IC en el punt final de la malaltia podria ser deguda a l'*sprouting* que estaria tenint lloc gràcies a les MNs romanents, que són capaces de crear nous axons per tal d'innervar les plaques motores que han quedat dennervades. Tot i que la hipòtesi anteriorment comentada que el TA corresponga al grup de músculs menys afectats podria ser vàlida, el fet que a P10 ja s'observe acumulació de NF en el TA junt al fet que en l'IC a P30 milloren (com a conseqüència de l'*sprouting*) tots els defectes de les NMJs excepte l'acumulació de NF, també podria indicar que el TA s'hauria vist afectat en etapes prèvies (no estudiades) i a P10 i P20 s'estiga evidenciant una millora produïda per l'*sprouting*. Aquesta segona hipòtesi suposaria que a P30, moment en que els defectes en les NMJs del TA són evidents, les MNs que han sigut capaces de generar *sprouts* (per compensar la dennervació en etapes inicials) han arribat a un punt en

que també s'han vist afectades. Aquest patró d'afectació seguiria el procés observat en l'ELA, on les MNs "*Fast*" s'afecten en etapes presimptomàtiques, però, degut a mecanismes compensatoris de les MNs més resistents, no s'observen símptomes de la malaltia fins que, finalment, aquestes també degeneren i és el moment en que la paràlisi es torna evident [326].

En el model $Smn^{2B/-}$ les MNs comencen a morir en etapes inicials, però no és fins P12 quan es veuen diferències en el pes i en el comportament motor entre els animals afectats i els WT. A diferència de la ràpida progressió de la malaltia en altres models d'AME, en el model $Smn^{2B/-}$ aquesta és més lenta. Existeix la possibilitat que la severitat del dèficit motor en models d'AME de progressió més ràpida, tals com el model $Smn^{-/-}$,*SMN2* o l'SMNΔ7, estiga relacionada amb l'absència d'aquests mecanismes compensatoris anteriorment comentats. En aquest sentit, s'ha hipotetitzat que l'*sprouting* dels nervis intramusculars podria explicar la progressió més lenta de la malaltia en els models murins d'AME menys severa en relació a aquells més afectats [259]. Per veure si l'expressió d'SMN condiciona la capacitat d'*sproutar* es va experimentar amb animals injectats amb toxina BotA. Com a resposta a la paràlisi produïda per la toxina, els animals sans van presentar processos d'*sprouting*. Tot i que la gènesi d'*sprout*s també va ser observada en els animals malalts, aquesta resposta no va ser tan acusada com en el cas dels WT, detectant-se una menor quantitat d'sprouts així com una menor longitud dels nous axons creats, suggerint una relació entre els nivells de proteïna SMN i la correcta funció dels cons de creixement neuronal. Al mateix temps, els terminals presinàptics van mostrar una menor complexitat, demostrant una menor capacitat de remodelació de les NMJs en els animals $Smn^{2B/-}$. Resultats similars s'han descrit en aquest model davant la paràlisi causada per l'axotomia del nervi del TA [381]. Aquests autors han descrit una reducció del potencial de remodelació del terminal presinàptic de les NMJs en els animals $Smn^{2B/-}$, però, a diferència de les observacions del present treball, no van detectar una disminució del grau de creixement axonal en el animals malalts.

La proteïna Gap-43 (*Growth Associated Protein 43*) juga un paper clau en la regulació dels cons de creixement neuronal i en el creixement i manteniment dels axons [387]. Els animals $Smn^{2B/-}$ van mostrar una elevada expressió de Gap-43 en les NMJs per comparació dels WT, incrementant-se aquesta amb la paràlisi induïda per la toxina botulínica. No obstant, tal i com va ocórrer amb el neuropèptid CGRP, no es va veure una relació directa entre les plaques que presentaven immunoreactivitat amb aquelles que posseïen *sprouts*. El fet d'observar un increment de Gap-43 en els animals malalts podria ser un indicador del procés d'*sprouting* que té lloc en condicions basals com a resposta a la dennervació pròpia de l'AME, i que es veu

incrementat quan s'injecta BotA com a conseqüència de la paràlisi ocasionada. D'acord amb aquests resultats, està descrit un augment en l'expressió de Gap-43 en motoneurones posteriorment a lesions perifèriques de nervis [388, 389]. Recentment s'ha descrit, en contra d'aquests resultats, una disminució dels nivells d'expressió de Gap-43 en cultius de MNs del model d'AME severa *Smn*$^{-/-}$*,SMN2* [390]. Aquestes discrepàncies, però, podrien ser degudes als menors nivells de proteïna SMN que presenten els animals del model *Smn*$^{-/-}$*,SMN2* quan es comparen amb els ratolins *Smn*$^{2B/-}$, ja que l'SMN controla de manera indirecta la localització, l'estabilitat i el transport dels mRNA del gen *GAP-43* [106, 391]. Així, també podria estar influenciant l'edat dels animals dels quals es va obtenir la medul·la espinal per a realitzar els cultius de MNs (edat embrionària), ja que el dèficit d'SMN és més crític durant l'etapa del desenvolupament neuromuscular [117]. Per tant, tot i no respondre a la dennervació de la mateixa manera que ho fan els animals WT, el model *Smn*$^{2B/-}$ manté la capacitat de regenerar i remodelar les NMJs en resposta a la paràlisi muscular, fet que podria explicar la progressió més lenta de la malaltia i la menor afectació a nivell motor en aquest model. De fet, MNs derivades de models d'AME més severa [107] han mostrat un creixement neuronal alterat [107, 146, 148, 149] i un *sprouting* ineficient [119, 120]. L'increment de la regeneració axonal, mitjançant la inducció d'*sprouting*, amb l'objectiu d'augmentar la innervació en plaques dennervades per la malaltia, seria un punt interessant per explorar i considerar com a possible complement en les teràpies regeneratives per a l'AME.

Els experiments d'axotomia del nervi ciàtic en els animals *Smn*$^{2B/-}$ han demostrat que el múscul esquelètic d'animals malalts presenta alteracions intrínseques que són independents a la dennervació causada per l'AME. Posteriorment a la lesió, els animals WT van mostrar una notable atròfia del múscul TA del costat ipsilateral, així com presència d'esdeveniments apoptòtics causats per la dennervació. Tot i que no va resultar estadísticament significativa, es va observar una subtil resposta a la lesió en el costat no operat. Els efectes contralaterals davant una lesió perifèrica nerviosa han sigut prèviament documentats (revisat a [392]). En canvi, en el cas dels animals malalts la desconnexió produïda per l'axotomia va provocar una atròfia de menor grau que la detectada en els ratolins sans i no va incrementar la mort per apoptosi que de per sí té lloc en el múscul TA, suggerint que aquests defectes no són conseqüència de la dennervació pròpia de l'AME, sinó, que són alteracions intrínseques del múscul. Resultats similars s'han descrit posteriorment a l'axotomia del nervi ciàtic realitzada en models més severs de la malaltia [122]. A més, Boyer *et al*. [133] van obtenir resultats similars estudiant el patró de transcripts en el múscul esquelètic d'animals WT i *Smn*$^{2B/-}$ axotomitzats i van concloure que els defectes en l'expressió de certes proteïnes no eren

conseqüència de la dennervació. Entre aquestes proteïnes desregulades es troben els canals de calci i el receptor de rianodina, implicades en la contracció muscular, la regulació del calci i la propagació del potencial d'acció; de manera que suggeria una funció específica de l'SMN en el múscul o, almenys, una afectació pel dèficit de proteïna SMN en el múscul que és independent de la dennervació produïda per l'AME.

En aquest aspecte s'han descrit alteracions en el múscul en diversos models d'AME, tals com la sobreexpressió de proteïnes implicades en la mort cel·lular [132], així com dany a nivell genètic en etapes prèvies a l'afectació neuronal [134]. A més, tal i com s'ha corroborat en aquesta tesi, diversos estudis han reportat defectes en l'expressió de les isoformes de MyHC, tant per una disminució de les isoformes ràpides com per un increment d'isoformes immadures [123, 129]. L'atròfia de les miofibres del múscul esquelètic observada en el present estudi també ha sigut àmpliament descrita en diversos models d'AME [122, 129], així com en pacients [130, 131]. També s'han reportat defectes en la miogènesi tant en models animals amb dèficit d'SMN [136-138] com en pacients amb AME [125, 139], detectant-se anomalies en la fusió, en la maduració i en la proliferació dels mioblasts [140, 141]. Per tant, tal i com altres autors han suggerit (revisat a [142]), el dèficit d'SMN estaria afectant al múscul esquelètic d'una manera independent a la patologia pròpia del terminal presinàptic i a la mort neuronal, demostrant-se una funció i requeriment específic d'aquesta proteïna en el múscul. Per altra banda, el fet que les NMJs en el model $Smn^{2B/-}$ presenten un retard en la maduració (menor mida de les plaques, així com morfologia més immadura) reafirma l'afectació independent del múscul, ja que alguns aspectes del desenvolupament de les NMJs són independents de l'activitat neuromuscular. En aquest sentit, es troba la maduració de les unions neuromuscular, la qual succeeix en absència de producció i alliberament d'ACh per part del terminal presinàptic [393], així com en cultius de fibres musculars sense presència de MNs [394].

L'èmfasi i la importància que se li ha donat al sistema neuromuscular i a la motoneurona com a cèl·lula clau en la malaltia és conseqüència de la marcada debilitat muscular que presenten els pacients amb AME així com de l'evident pèrdua de MNs observada en l'avaluació postmortem tant de teixits humans [161] com de models murins d'AME [152, 154, 173]. S'han portat a terme diversos estudis seguint diferents estratègies amb l'objectiu d'alterar l'expressió d'SMN específicament en determinats teixits, i, tot i que han suggerit una implicació de les MNs [163, 166, 167, 183, 198, 243], han fracassat en demostrar que l'AME esdevinga com a resultat de la reducció d'SMN únicament en aquestes cèl·lules i en corroborar que la causa de l'inici de la patologia siga la mort de les MNs. De fet, diversos autors defensen

que la causa per la qual la MN degenera en l'AME podria ser per alteracions en l'activitat de les mateixes, és a dir, per una alteració de les aferències que reben al soma neuronal [129, 163, 174, 175], i que seria el que dona lloc, en última instància, als defectes en la transmissió colinèrgica en les NMJs [395]. Altres autors han proposat que la causa de la disfunció de les MNs podria ser la pèrdua d'aferències propioceptives provinents dels fusos musculars [175, 396] i de defectes en els circuits sensoriomotors [177]. En relació a aquesta hipòtesi, en aquest treball s'ha detectat una disminució de la població de neurones propioceptives en el DRG del model *Smn*$^{2B/-}$, així com una disminució de les sinapsis glutamatèrgiques en el soma de les MNs. Aquesta reducció de sinapsis propioceptives també s'ha descrit en el model SMNΔ7 [176]. És més, Ling *et al*. [174] proposen que aquesta alteració de les sinapsis en el model SMNΔ7 no es deu a problemes en l'establiment de les mateixes sinó en el seu manteniment. Es requereixen més estudis per comprovar si aquesta alteració de les neurones propioceptives i dels inputs VGluT1 en el model *Smn*$^{2B/-}$ és una conseqüència dels defectes observats en el múscul esquelètic, o bé és la causa d'aquests.

Per altra banda, l'atròfia observada en els diversos òrgans estudiats a nivell macroscòpic, junt al el fet que un ampli rang de proteïnes es vegen afectades en l'AME, recolza la hipòtesi que l'SMN presenta un requeriment més generalitzat en la resta de teixits que no queda restringit a les MNs. De manera que continua sent un repte esbrinar les relacions de causalitat, majoritàriament degut a les dificultats inherents en discernir entre els esdeveniments que tenen lloc en un teixit específic bé pel dèficit d'SMN en aquell teixit, o bé com a conseqüència del progrés de la malaltia in vivo. A més, els defectes relacionats amb la malaltia poden ser neutralitzats per mecanismes i processos compensatoris, tal i com s'ha comentat anteriorment, de manera que encara dificulta més aquesta tasca. No obstant, els defectes observats en els òrgans limfoides, a més dels defectes reportats fins al moment en altres cèl·lules i teixits afectats per la malaltia (revisat a [203, 322, 323]) indiquen que l'AME és un desordre complex i que no pot ser explicat pel simple deteriorament del sistema neuromuscular.

En el cas del model *Smn*$^{2B/-}$ s'ha detectat una forta aplàsia de la melsa i una distribució aberrant de les poblacions de limfòcits tant a la melsa i al timus, com al moll de l'os, on té lloc l'hematopoesi. Els precursors dels limfòcits T originats al moll de l'os migren al timus, on assoleixen la seua maduresa. En el timus té lloc el procés de selecció dels limfòcits immadurs, abans de ser alliberats al torrent circulatori [397]. Les cèl·lules epitelials de l'escorça tímica (cTEC) són les responsables de la selecció positiva, és a dir, de reconèixer aquells limfòcits T

que són capaços d'interaccionar amb la molècula d'MHC que s'expressa a les cèl·lules corticals tímiques (MHC de classe I en el cas dels futurs limfòcits CD8+, i MHC de classe II en els limfòcits CD4+) [398]. El següent pas de maduració limfocitària té lloc a la medul·la del timus. En aquest procés juga un paper important el factor de transcripció AIRE [399, 400], el qual regula l'expressió en les cèl·lules epitelials medul·lars (mTEC) d'autoantígens per tal d'induir la tolerància a aquests per part dels limfòcits. Aquells limfòcits que reconeixen els autoantígens són eliminats, procés conegut com selecció negativa.

Els limfòcits CD4+ s'han vist reduïts en el timus del model *Smn*$^{2B/-}$, però no els CD8+ ni tampoc l'expressió de la molècula AIRE per part de les mTECs, de manera que suggereix que el problema estaria en el procés inicial de selecció positiva i no en la posterior selecció negativa. En aquest aspecte es interessant citar el fet que, mitjançant estudis histològics realitzats en seccions de timus del model d'AME *Smn*$^{-/-}$*,SMN2*, es va detectar una mort massiva dels limfòcits en l'escorça tímica [122]. Aquests autors, a més, han descrit una disminució dels macròfags al múscul d'animals *Smn*$^{-/-}$*,*SMN2. La resposta immunitària dels limfòcits T_{h1} (subpoblació de limfòcits CD4+) està implicada en l'alliberació de citoquines, les quals són responsables de l'activació de macròfags i cèl·lules citotòxiques [324]. Aquests fets reforcen la hipòtesi d'una alteració en l'AME en l'escorça tímica durant el procés de selecció positiva dels limfòcits CD4+.

Per altra banda, es van detectar formes immadures de limfòcits B a la melsa d'animals *Smn*$^{2B/-}$, així com mort per apoptosi de la població limfocitària més madura (CD19+). El fet que s'observen formes immadures a la melsa podria indicar una afectació del procés de control de la maduració dels limfòcits B al moll de l'os. Transplantaments de moll de l'os han demostrat tenir un efecte beneficiós sobre el fenotip miopàtic en un model d'AME [401], suggerint una afectació del moll de l'os en aquesta malaltia. No obstant, l'alteració en el procés de maduració dels limfòcits en el moll de l'os no seria suficient per explicar la mort per apoptosi que té lloc a la melsa. El fet que tant els limfòcits T (CD4+), així com els limfòcit B (CD19+) es vegen alterats en el model *Smn*$^{2B/-}$, juntament amb la reducció en l'expressió de MHC de classe II (tots ells components clau en la presentació d'antigen) podria indicar una alteració del procés de presentació d'antigen, tot i que amb l'actual informació no es pot concloure si són els defectes en una població específica de limfòcits la causa per la qual es veuen afectats la resta de limfòcits.

VIII. DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 2

Diversos estudis han descrit un efecte neuroprotector del PRE-084 tant *in vitro* davant situacions d'estrès excitotòxic [342] com posteriorment a la lesió nerviosa *in vivo* [343]. En el context de les malalties de la MN, Mancuso *et al.* [344] van reportar una millora en la funció motora i en la supervivència d'animals afectats per l'ELA posteriorment a l'administració crònica de l'agonista del receptor σ-1. En el present estudi es va testar l'efectivitat del PRE-084 com a possible tractament de l'AME utilitzant dos models murins: l'SMNΔ7 i l'*Smn*$^{2B/-}$. S'ha demostrat que l'administració crònica a partir del primer dia postnatal inhibeix la reacció tant microglial com astroglial en ambdós models i afavoreix el fenotip beneficiós i antiinflamatori que les cèl·lules microglials poden presentar en el context de les malalties neurodegeneratives. No obstant, el PRE-084 no va conferir neuroprotecció ni va influir en el comportament motor dels animals afectats per l'AME.

Durant les primeres setmanes postnatals tenen lloc processos de remodelació i maduració en el sistema nerviós [113, 280]. El receptor σ-1 sofreix un canvi de distribució intracel·lular en les MNs, passant d'expressar-se únicament al citoplasma a localitzar-se, a partir de la segona setmana postnatal, en la superfície cel·lular en la proximitat a les sinapsis colinèrgiques, o botons C [346]. Els resultats del present treball, tal i com altres autors han observat en diferents models murins amb afectació de la MN [402], van evidenciar una distribució del σ-1R alterada i un retard en l'aparició d'aquesta molècula en els botons C. Aquests inputs colinèrgics regulen l'excitabilitat de les MNs, i guarden relació amb el grau de vulnerabilitat que presenten les MNs front a la degeneració [326-328]. S'ha descrit un vincle entre el gen σ-1R i la neurodegeneració, així, mutacions en aquest gent s'han associat amb malalties de la MN [338, 339]; a més, s'ha descrit una reducció dels nivells de proteïna σ-1R en la medul·la espinal de pacients amb ELA i de models murins d'aquesta malaltia [341]. En aquest estudi, però, no es va detectar una disminució dels nivells de proteïna σ-1R en la medul·la espinal dels animals l'*Smn*$^{2B/-}$, fet que podria explicar les discrepàncies trobades en quant a l'efectivitat de l'agonista del receptor σ-1 com a agent neuroprotector en aquest model murí d'AME. No obstant, s'ha descrit un efecte neuroprotector després de l'administració de PRE-084 en el model murí d'ELA SOD1- G93A malgrat no observar-se diferències en els nivells de proteïna σ-1R en la banya ventral de la medul·la espinal d'animals afectats per l'ELA i animals WT [344].

Els botons C s'han relacionat amb l'excitabilitat de les MNs i la vulnerabilitat d'aquestes front a la neurodegeneració [326-328]. La localització del σ-1R en la cisterna subsinàptica dels botons C podria indicar una implicació d'aquest en el control de les sinapsis colinèrgiques, i en última instància, de l'excitabilitat i vulnerabilitat de les MNs a la neurodegeneració. No

obstant, en els models d'AME no s'ha observat una neuroprotecció posteriorment a l'administració crònica de PRE-084, fet que planteja que els efectes del tractament amb PRE-084 podrien ser conseqüència d'un paper del σ-1R independent als botons C. De fet, en el punt analitzat en aquest estudi, P20, el nombre de botons C no es veu alterat en els animals malalts, però si es veu disminuït el nombre de sinapsis colinèrgiques que presenten σ-1R, fet que recolza la hipòtesi que el paper que aquesta molècula juga en la patogènia de l'AME va més enllà de la descrita als botons C.

El paper del σ-1 no es restringeix únicament als botons C, sinó que compta amb funció de xaperona i, degut a la seua localització en la MAM (membrana del reticle endoplasmàtic associat a mitocòndries) propera a la membrana plasmàtica, està involucrada en processos variats tals com la regulació dels senyals de calci, la biosíntesi de lípids o el control de la qualitat proteica (revisat a [403]). En el SNC, el σ-1R és expressat en la micròglia [404], i la seua activació s'ha associat a una reducció de la gliosis reactiva posteriorment a la lesió cerebral en rates [405]. A més, l'activació del σ-1R pot suprimir múltiples aspectes de l'activació microglial tals com la resposta morfològica, migratòria i inflamatòria [406], a més de suprimir la resposta inflamatòria en el sistema immune perifèric davant diversos estímuls [407].

En el context de l'AME, s'ha observat un marcada disminució de la astrogliosi i la microgliosi reactiva en la medul·la espinal dels animals malalts tractats amb el PRE-084. Hi ha evidències que els astròcits juguen un paper important en la patogènesi de l'AME [182-184, 408]. El restabliment dels nivells d'SMN exclusivament en els astròcits en el model SMNΔ7 i l'*Smn*$^{2B/-}$ provoca una reducció de la astrogliosi reactiva, un increment de la supervivència i una disminució parcial dels defectes de les NMJs [184]. Per altra banda, el restabliment de l'SMN conjuntament en la glia i en les MNs sembla tenir una major repercussió en la supervivència dels animals malalts en comparació al restabliment exclusiu en MNs [183]. No obstant, en els models murins SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$ el tractament amb PRE-084 va reduir la reacció glial però la supervivència dels animals no es va veure alterada. A més, aquesta resposta de la gliosi reactiva va ser independent dels nivells de proteïna SMN en la medul·la espinal.

L'activació de la micròglia s'ha relacionat amb la progressió de les malalties neurodegeneratives, de fet, la presencia de micròglia està lligada a un major dany neuronal [409]. Per altra banda, també s'ha descrit que l'ablació de la micròglia provoca un increment del dany neuronal [410]. En condicions patològiques, la mort cel·lular s'ha relacionat amb un desequilibri entre els marcadors específics de dos subpoblacions de micròglia: marcadors relacionats amb una fagocitosi activa (fenotip microglial M1) i marcadors que han sigut

associats específicament a la reparació de teixits (fenotip microglial M2). En el model *Smn*$^{2B/-}$ s'ha detectat un patró oposat d'aquests dos fenotips de la micròglia en els ratolins malalts administrats amb salí i els tractats amb l'agonista del receptor σ-1. D'aquesta manera, part de la resposta induïda pel tractament amb l'agonista del σ-1R en el model *Smn*$^{2B/-}$ podria ser deguda al manteniment òptim de l'equilibri entre el fenotip glial proinflamatori i el regenerador, evidenciat per l'atenuació de l'increment del fenotip M1 observat en els animals afectats i per l'augment de la micròglia M2 posteriorment a l'administració de PRE-084.

En relació amb aquests resultats, Peviani *et al.* van descriure un increment de les cèl·lules immunoreactives per al marcador CD206, associat amb la reparació neuronal, en un model murí de malaltia de la MN tractat amb PRE-084 [402]. A més, en la malaltia de Parkinson i en l'ELA, s'ha descrit una modulació de l'activitat microglial per part de diversos lligands del receptor σ-1, possiblement per les respostes ocasionades per la transició dels fenotips M1 i M2 [344, 402, 411].

Els resultats d'aquest estudi recolzen la hipòtesi, plantejada amb anterioritat [406, 407, 412], que el σ-1R presenta propietats immunorreguladores i que els efectes beneficiosos de la seua activació en el context de les malalties neurodegeneratives són conseqüència d'un balanç adequat de la resposta microglial inflamatòria i reparativa. La micròglia juga un paper important en l'etiologia de les malalties neurodegeneratives (mirar per exemple [349]), no obstant els mecanismes pels quals el σ-1R regula l'activació i la modulació de la micròglia continuen sent desconeguts.

El receptor σ-1 es presenta com una excel·lent diana farmacològica en les malalties de la MN per modular la reacció glial activada com a resposta d'un estat neuropatològic, i així evadir la consegüent neurodegeneració. No obstant, el tractament crònic amb PRE-084 ha demostrat que la prevenció de la reacció glial no és suficient en els models murins SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$ per evitar la progressió de la malaltia i la mort neuronal en l'AME. A més, cal remarcar que els nivells d'SMN no s'han vist modificats pel tractament. El restabliment dels nivells òptims d'SMN està considerada una de les estratègies terapèutiques més prometedores en el tractament d'aquesta malaltia (revisat a [205, 257]), no obstant, el dèficit de nivells adequats de proteïna SMN sembla ser més crític durant l'etapa embrionària i els primers dies postnatals [117, 121, 195, 198, 256]. Per tant, en estadis posteriors, i com a estratègia complementària al restabliment de nivells adequats de proteïna SMN, podrien resultar beneficioses les teràpies independents de l'SMN dirigides a fomentar la neuroprotecció i prevenir l'afectació d'elements cel·lulars i moleculars que es veuen compromesos pel dèficit d'aquesta proteïna. Així, seria

interesant testar l'efectivitat de l'administració del receptor σ-1 com a teràpia adjuvant o complementària conjuntament amb teràpies més específiques dirigides a la neuroprotecció en l'AME.

IX. DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 3

Diversos estudis realitzats en humans i models murins suggereixen que l'exercici físic té un potent efecte beneficiós en l'AME millorant o estabilitzant la força muscular, i per tant, la funció motora [353-355, 359]. En el present estudi, es va examinar l'efectivitat de l'AICAR, agonista sintètic de l'AMPK i compost farmacològic que mimetitza l'exercici físic [371], com a possible agent terapèutic en l'AME utilitzant el model murí SMNΔ7. S'ha demostrat que l'administració crònica d'AICAR, començant el primer dia postnatal, és capaç d'atenuar l'atròfia del múscul esquelètic i alguns dels defectes estructurals observats a les unions neuromusculars en l'AME. És més, l'AICAR evita la pèrdua de sinapsis aferents excitatòries glutamatèrgiques en el soma de les MNs, però no la mort d'aquestes cèl·lules ni la reacció microglial i astroglial. A més, l'AICAR no millora el comportament motor ni influeix en la supervivència dels ratolins SMNΔ7.

En condicions normals, l'exercici provoca importants canvis adaptatius en el metabolisme i en el programa d'expressió gènica del múscul esquelètic, donant lloc a modificacions en la composició de la tipologia de fibres (com per exemple la transició de fibres de tipus II cap a fibres de tipus I) [380, 413]. L'activació de l'AMPK sembla jugar un paper important en aquests canvis musculars induïts per l'exercici [366]. L'AICAR, descrit com un potent estimulador de l'activitat de l'AMPK en el múscul esquelètic [367], millora el rendiment físic, i la seua administració provoca importants canvis fenotípics en les miofibres, com per exemple la transició del programa metabòlic ràpid (o glicolític) al lent (oxidatiu), tal i com s'ha demostrat en diversos models animals (revisat a [365, 414]). En aquest sentit, s'ha descrit que l'AICAR repercuteix en la resistència a la fatiga, incrementant-la inclús en condicions d'absència d'exercici físic [371]. En aquest estudi, s'ha evidenciat únicament una modesta capacitat de l'AICAR d'estimular l'activació de l'AMPK *in vivo* al múscul esquelètic de ratolins WT (avaluada per la fosforilació de la cinasa). Aquest resultat va en contra del potent efecte de l'AICAR sobre l'activació de l'AMPK descrit en un estudi previ realitzat *in vitro* amb cèl·lules musculars C_2C_{12} [372]. Malgrat que aquests autors no van examinar l'activació de l'AMPK *in vivo*, van identificar un efecte beneficiós de l'AICAR en el múscul esquelètic de ratolins *mdx* (un model de la distròfia muscular de Duchenne) quan era administrat crònicament seguint el mateix programa de tractament, la mateixa dosi i la mateixa via d'administració que els realitzats en el present treball. En realitat, el tractament dels ratolins SMNΔ7 amb AICAR ha provocat canvis fenotípics en el múscul esquelètic i en les unions neuromusculars, suggerint un efecte farmacològic d'aquest agent en el model murí utilitzat en aquest estudi, malgrat la moderada activació de l'AMPK. De fet, se sap que l'AICAR no és un activador selectiu de l'AMPK i que és capaç d'estimular altres enzims sensitius als nivells d'AMP, que poden jugar un paper clau en la

regulació del metabolisme muscular [415]. És interessant remarcar que l'increment observat en l'activitat de l'AMPK en els músculs d'animals SMNΔ7 en condicions basals no s'ha vist modificat després del tractament amb AICAR, tal i com succeeix amb músculs distròfics provinents de ratolins *mdx* [373]. La disfunció muscular lligada a l'AME podria estar justificant l'activitat elevada de l'AMPK trobada al model SMNΔ7. D'acord amb aquesta possibilitat, s'ha descrit un increment en l'expressió i l'activitat de diverses cinases en diferents patologies musculars [373, 416-418].

S'ha trobat que l'AICAR mitiga l'atròfia muscular en el model SMNΔ7 com a conseqüència de l'increment en la mida de les miofibres, el que sembla ser la causa del modest augment del pes corporal dels animals malalts tractats amb aquest compost. Aquests resultats contrasten amb l'absència de canvis en l'àrea observada en seccions transversals de les miofibres de músculs distròfics d'animals *mdx* després del tractament amb AICAR [372]. Les diferències entre els canvis fisiopatològics i histològics que tenen lloc en els músculs distròfics (mirar per exemple [419]) i en els músculs afectats per l'AME podrien ser les responsables de les discrepàncies existents pel que fa a l'efecte de l'AICAR sobre la mida de les miofibres en aquests músculs. No obstant això, tal i com s'ha reportat en estudis amb animals *mdx* [372], s'ha observat un augment de la proporció de miofibres de contracció lenta (tipus I) en animals SMNΔ7 després del tractament amb AICAR. És important remarcar que en condicions basals (SMNΔ7 injectats amb salí) s'ha observat un increment marcat de la proporció de fibres d'aquest tipus en un múscul predominantment ràpid, el TA. Aquest canvi podria ser conseqüència de l'activació compensatòria d'un programa miogènic metabòlic oxidatiu que estaria destinat a limitar la disfunció muscular associada a la malaltia. En el model SMNΔ7 s'han descrit canvis similars en la tipologia de les miofibres en altres músculs esquelètics, a més del TA [129]. Les miofibres de tipus I (lentes, oxidatives) les quals presenten isoformes de proteïnes contràctils lentes, són més resistents a la fatiga del que ho són les miofibres de tipus II (ràpides, glicolítiques); així, els músculs esquelètics amb un major contingut de fibres musculars de tipus I són més resistents al desgast que aquells on predominen les fibres de tipus II [129, 420]. Com que l'AICAR promou una resposta oxidativa en el múscul esquelètic [365], l'increment de la proporció de fibres de tipus I que s'ha trobat en l'AME podria ser beneficiós ja que estaria afavorint un fenotip oxidatiu de les miofibres per tal d'intentar mitigar les conseqüències de la dennervació muscular.

S'ha documentat que l'exercici físic regular té un efecte beneficiós en un model murí d'AME de tipus II (ratolins *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*[*2Hung*]$^{+/+}$), incrementant l'esperança de vida, reduint la

degeneració de les MNs i limitant l'atròfia muscular característica de la malaltia. Aquesta acció terapèutica s'ha atribuït a l'increment dels nivells d'SMN (el que sembla ser degut a l'augment dels transcripts que contenen l'exó 7) observat en la medul·la espinal d'animals malalts sotmesos a la pràctica d'exercici físic regular [359]. En el present estudi, no s'ha observat cap efecte beneficiós de l'AICAR sobre la degeneració de les MNs, ni tampoc sobre la reacció glial que té lloc en la medul·la espinal de ratolins SMNΔ7 [176], indicant, per tant, que l'AICAR no és tan efectiu com l'exercici físic a l'hora de promoure la supervivència de les MNs en ratolins afectats per l'AME. Aquestes diferències podrien ser degudes a que no s'ha observat cap modificació dels nivells de proteïna SMN ni en la medul·la espinal ni en el múscul esquelètic de ratolins SMNΔ7 després del tractament amb AICAR. No obstant, recentment s'ha reportat que els efectes beneficiosos de l'exercici físic en un model murí d'AME de tipus III són independents dels nivells de proteïna SMN [360]. L'expressió d'SMN en etapes prenatals i en etapes primerenques postnatals és crucial per a la supervivència de les MNs i per al desenvolupament normal de les unitats motores així com per al refinament i la maduració de les unions neuromusculars [121, 195, 256].

Tot i que el tractament amb AICAR no ha mitigat la mort neuronal dels animals malalts, sí que ha atenuat algunes de les alteracions en les unions neuromusculars lligades a l'AME. Així, l'AICAR ha mitigat la dennervació i ha afavorit la maduració de les plaques motores, tal i com s'ha posat de manifest per la reducció de les innervacions polineuronals i l'assoliment d'arquitectures més madures per part del terminal postsinàptic (p.ex. major nombre de plaques motores presentat una morfologia de tipus "*pretzel*"). A més, l'administració d'AICAR ha reduït l'*sprouting* axonal observat en les unions neuromusculars de ratolins SMNΔ7. Com que no s'ha trobat un augment dels nivells de proteïna SMN als músculs dels animals SMNΔ7 tractats, aquests efectes beneficiosos semblen ser conseqüència d'una acció directa del l'AICAR sobre el múscul esquelètic (els quals estarien succeint d'una manera independent de l'SMN). De fet, s'ha demostrat que l'AICAR altera el contingut de diferents modificadors del fenotip muscular (incloent el coactivador transcripcional PGC-1α, el PPARδ [*nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor δ*], el SIRT-1 [*nicotinamide adenine dinucleotide-dependent protein deacetylase sirtuin-1*], i el RIP-140 [*receptor-interacting protein 140*]) el que sembla ser, en part, la causa de l'efecte de millora de l'AICAR sobre la funció en els músculs distròfics [365, 372]. La PGC-1α, bé directament o bé a través de l'activació de la via depenent de neuregulina-1 (proteïna alliberada per les MNs i que presenta un paper responsable en la formació i la plasticitat de les NMJs [421]), indueix la transcripció de gens sinàptics que juguen un paper crucial en la formació dels clústers de receptors d'acetilcolina i en el manteniment de

les NMJs [422]. L'expressió de la PGC-1α s'ha vist incrementada en el múscul després de l'exercici físic [377, 423] (revisat a [351]), i en músculs tant sans com distròfics d'animals tractats amb AICAR [371, 372]. Aquesta última observació contrasta amb l'absència de canvis rellevants descrits posteriorment al tractament amb AICAR en aquest estudi. Aquesta disparitat en els resultats podria ser explicada per la diferència en l'edat dels animals i el marc temporal en el qual s'ha administrat l'AICAR. En els experiments anteriorment mencionats [371, 372], es van utilitzar animals adults i períodes de tractament més extensos (≈30 dies). En realitat, s'han observat canvis moderats en la densitat de la banda de la PGC-1α individualment en alguns dels animals tractats amb AICAR (tant WT com SMNΔ7), no obstant, degut a la variabilitat de la mostra, no s'han observat variacions significatives una vegada analitzat el conjunt dels valors. D'acord amb aquests resultats, tampoc s'han reportat canvis en els nivells d'expressió de l'mRNA de la PGC-1α en animals *mdx* sotmesos a tractament crònic amb AICAR. Seria necessària una investigació més profunda per esbrinar si l'activació d'altres modificadors del fenotip muscular diferents de la PGC-1α, o altres mecanismes addicionals (tals com l'expressió de factors neurotròfics) són els responsables dels efectes de l'AICAR descrits en aquest estudi. D'acord amb aquest plantejament, és ben conegut que l'exercici indueix l'expressió de diversos factors neurotròfics, incloent l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), la NT-4 (*neurotrophin-4*), el BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) i el GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), tots ells importants per al manteniment de la integritat de les NMJs [351].

La pèrdua de MNs s'ha considerat una característica histopatològica de l'AME en humans, que també s'ha descrit en models murins de la malaltia. No obstant, a diferència de l'àmplia pèrdua neuronal descrita en humans [161], la majoria d'estudis realitzats en animals afectats per l'AME, incloent el model murí SMNΔ7, han demostrat que inclús en etapes terminals de la malaltia la mort de motoneurones es manifesta de manera moderada i no justifica el grau de debilitat motora i la paràlisi que exhibeixen els animals malalts [115, 122, 154, 176, 306]. Tot i això, les MNs que persisteixen en l'AME mostren alteracions indicatives de disfunció cel·lular, com per exemple la pèrdua de sinapsis aferents glutamatèrgiques (immunoreactives a VGluT1) [163, 174-176, 306]. Estudis previs d'aquest laboratori, entre altres, han demostrat que aquesta deaferentació glutamatèrgica precedeix a la mort neuronal i que comença en etapes prenatals en el model murí SMNΔ7 [175, 176]. No obstant, el fet que la deaferentació de les MNs influïsca o no directament en la seua mort cel·lular en l'AME no està del tot clar i, de fet, altres autors sostenen que es tractaria d'una conseqüència de la patologia primària de les MNs [115, 164, 396]. En aquest aspecte, s'ha reportat recentment que el dèficit d'SMN

determina canvis intrínsecs en les propietats electrofisiològiques de les MNs [424], i que el restabliment d'SMN únicament en aquest tipus cel·lular és necessari i suficient per restablir els dèficits funcionals de les unitats motores [183]. Aquestes troballes suggereixen que nivells adequats d'SMN en les MNs són crucials per evitar la disfunció i la conseqüent degeneració d'aquestes cèl·lules. En el present treball s'ha demostrat que la pèrdua de sinapsis VGluT1 en les MNs d'animals SMNΔ7 pot ser eludida amb l'administració crònica d'AICAR. No obstant, aquesta millora de la connectivitat de les sinapsis centrals no és suficient per evitar la mort neuronal progressiva que té lloc durant el curs de la malaltia. Com que el VGluT1 s'expressa en els botons sinàptics de les MNs que provenen majoritàriament dels axons sensorials propioceptius [425], és possible que, al menys en part, l'efecte que l'AICAR exerceix sobre la prevenció de la deaferentació glutamatèrgica siga degut a l'acció d'aquest compost en el múscul esquelètic, particularment en els fusos musculars. De fet, s'ha descrit una pèrdua dels ínputs propioceptius de les MNs provinents dels fusos musculars en etapes inicials en l'AME i que sembla ser la causa de la disfunció de les MNs [175, 396]. Són necessaris més estudis detallats per tal d'esbrinar si l'AICAR és capaç de modificar els fusos neuromusculars en el model SMNΔ7.

És important remarcar que, malgrat mostrar un fenotip majoritàriament neuromuscular, l'AME és un desordre multisistèmic complex [115, 122, 187, 203]. Sembla ser que el múscul i el nervi es veuen afectats pel dèficit d'SMN d'una manera independent [142, 203], i que el múscul podria tenir un impacte mínim en la patogènesi de l'AME. De fet, diversos estudis han reportat que les millores en el múscul esquelètic i en la morfologia i fisiologia de les unions neuromusculars, produïdes pel reemplaçament de l'SMN en les MNs, no produeixen un increment de la supervivència [115, 163, 164, 183, 426, 427]. A més, s'ha descrit recentment que nivells baixos d'SMN ocasionats per la deleció en el múscul del gen murí *Smn* són suficients per a un funcionament muscular normal en el model SMNΔ7, i que el restabliment de l'SMN en el múscul no modifica la supervivència en l'AME [166]. Cal tenir en compte que en l'esmentat experiment els ratolins comptaven amb l'expressió dels gens exògens SMN2 i SMNΔ7, i per tant els resultats han de ser interpretats amb cura ja que, altres autors defenen que la deleció de l'exó 7 de l'*Smn* murí en el múscul esquelètic va donar lloc a una miopatia evident i mort prematura [165]. En qualsevol cas, tant en condicions normals com patològiques, té lloc una intricada comunicació creuada entre les MNs i el múscul. Tal i com suggereixen els resultats obtinguts en el present experiment, l'AICAR actua majoritàriament sobre la part muscular del sistema, per tant, seria interessant examinar si l'ús d'aquest compost com a agent terapèutic conjuntament amb teràpies dirigides a les MNs podia tenir

efectes beneficiosos més remarcables en la clínica de l'AME. Tal vegada, l'assaig en un model menys sever d'AME, com podrien ser els ratolins *Smn*$^{2B/-}$ [158, 381], podria aclarir els efectes de l'AICAR com a teràpia dirigida al múscul en el context de l'AME.

X. CONCLUSIONS

Primera. A diferència del que succeeix en models murins d'AME severa més extensament utilitzats, l'atròfia i la mort de motoneurones en la medul·la espinal de ratolins *Smn*$^{2B/-}$, un model intermedi d'aquesta malaltia d'evolució més lenta, té lloc en etapes inicials, sent les motoneurones de fenotip *"Fast"* les que majoritàriament degeneren.

Segona. La mort neuronal en el model *Smn*$^{2B/-}$ va acompanyada de defectes en l'arrel nerviosa ventral, amb presència d'axons que mostren una morfologia similar a la de la degeneració Walleriana, tal com s'ha evidenciat a nivell ultraestructural en etapes inicials de la malaltia.

Tercera. La reacció microglial i astroglial al voltant de les motoneurones espinals, un tret histopatològic característic de l'AME, té lloc en etapes finals de la malaltia en el model *Smn*$^{2B/-}$.

Quarta. El model *Smn*$^{2B/-}$ presenta una disminució significativa de les sinapsis centrals GABAèrgiques i, principalment, glutamatèrgiques que va acompanyada d'atròfia neuronal i pèrdua de neurones propioceptives en el gangli de l'arrel dorsal i atròfia dels axons de l'arrel nerviosa dorsal.

Cinquena. En el model *Smn*$^{2B/-}$, els músculs intercostal (com a exemple de múscul proximal) i tibial anterior (com a model de múscul distal) presenten diferent grau de vulnerabilitat a la degeneració neuromuscular. No obstant, al llarg de l'evolució de la malaltia ambdós acaben mostrant alteracions en les unions neuromusculars, amb dennervació i acumulació aberrant de neurofilament a nivell presinàptic, i retard maduratiu dels receptors d'acetilcolina a nivell postsinàptic.

Sisena. Les diferents miofibres del múscul esquelètic en el model *Smn*$^{2B/-}$ presenten diferent grau de vulnerabilitat a la degeneració en funció de la seua tipologia, amb una major afectació de les fibres de contracció ràpida, concordant amb la major pèrdua de motoneurones "*Fast*".

Setena. En el ratolí *Smn*$^{2B/-}$, el múscul esquelètic presenta una afectació intrínseca independent de la dennervació, que es manifesta amb atròfia i mort de les miofibres, tal com s'ha evidenciat en altres models murins d'AME. L'afectació primària del múscul en la malaltia queda corroborada al no veure´s incrementada després de la desconnexió nerviosa mitjançant l'axotomia del nervi ciàtic.

Vuitena. En el model *Smn*$^{2B/-}$, les motoneurones deficients en SMN no presenten una major vulnerabilitat a la desconnexió neuromuscular, ja que la secció del nervi ciàtic en edats en què

la motoneurona és independent del suport tròfic de la seua diana d'innervació no incrementa la mort neuronal observada en la malaltia.

Novena. El model *Smn*$^{2B/-}$ manté la capacitat de regenerar i remodelar les unions neuromusculars en resposta a la paràlisi induïda per la injecció de toxina botulínica, però aquesta resposta es veu atenuada pel dèficit de proteïna SMN.

Desena. El model *Smn*$^{2B/-}$ mostra una afectació multisistèmica a part de l'observada en el sistema neuromuscular, amb una marcada disfunció del sistema immunitari.

Onzena. La melsa dels ratolins *Smn*$^{2B/-}$ presenta importants defectes estructurals com a conseqüència d'un desenvolupament deficient dels limfòcits al moll de l'os i d'un increment de la mort per apoptosis d'aquests en la melsa.

Dotzena. L'evolució de la malaltia s'acompanya d'una pèrdua del receptor σ-1 en els botons colinèrgics de tipus C de les motoneurones espinals. Aquesta pèrdua té lloc amb anterioritat a la disminució de les sinapsis centrals colinèrgiques, que es produeix en les etapes finals de l'AME. El tractament crònic amb PRE-084, agonista del receptor σ-1, no evita els defectes observats en els botons C.

Tretzena. L'administració de PRE-084 disminueix la gliosi característica dels models murins d'AME SMNΔ7 i *Smn*$^{2B/-}$ i modifica la resposta microglial mitjançant el restabliment del balanç del fenotip pro-inflamatori (M1) i anti-inflamatori (M2) de la micròglia, alterat per la malaltia. No obstant això, el tractament amb PRE-084 no evita la mort de les motoneurones.

Catorzena. El tractament crònic amb AICAR (un agent farmacològic mimètic de l'activitat física) en el model murí SMNΔ7 mitiga l'atròfia muscular i evita alguns dels canvis histopatològics observats en les unions neuromusculars, tals com són la dennervació i la immaduresa de les plaques motores.

Quinzena. L'AICAR evita la pèrdua d'aferències glutamatèrgiques en les motoneurones espinals dels animals SMNΔ7, però això no és suficient per conferir neuroprotecció ni inhibir la reacció glial pròpia de la malaltia.

XI. APÈNDIX

1. APÈNDIX 1: ANTICOSSOS PER TINCIONS IMMUNOCITOQUÍMIQUES.

Anticossos primaris i secundaris utilitzats en les tincions immunocitoquímiques, en concret per immunofluorescència en seccions de criòstat i per a la tècnica del whole mount.

PRIMARIS			
ANTICÒS	**ESPÈCIE/FLUOROCROM**	**DILUCIÓ**	**CASA COMERCIAL**
AIRE	Goat	1:200	Sigma
CD206	Goat	1:100	RD System
CGRP	Rabbit	1:1000	Sigma- Aldrich
Gap-43	Rabbit	1:100	Strenberg
GFAP	Chicken	1:1000	Abcam
Iba1	Rabbit	1:500	Wako
IB4	FITC	1 mg/ml	Sigma-Aldrich
Laminin	Rabbit	1:1000	Abcam
Mac-2	Rat	1:800	Cedarlane
MHC II	FITC	1:150	eBioscience
MMP-9	Goat	1:10	Sigma-Aldrich
MyHC I (A4-840)	Mouse	1:5	DSHB
MyHC IIA (SC-71)	Mouse	1:20	DSHB
MyHC IIB (BF-F3)	Mouse	1:20	DSHB
Neurofilament 68kDa	Chicken	1:1000	Abcam
NMDA R2A	Rabbit	1:1000	Chemicon
NRG	Rabbit	1:100	Santa Cruz
Parvalbumin	Mouse	1:5000	Sigma-Aldrich
Sigma-1R	Mouse	1:50	Santa Cruz
SMI312	Mouse	1:1000	DSHB
SV2	Mouse	1:1000	DSHB
VAChT	Guinea pig	1:300	Synaptic Systems
VGAT	Rabbit	1:500	Millipore
VGluT1	Rabbit	1:1000	Synaptic Systems
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)		1:100 50 ng/mL	Molecular Probes
Nissl (Neuro Trace)	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:150	Molecular Probes
α-Bgtx	Alexa 488	1:500	Molecular Probes

SECUNDARIS			
ANTICÒS	**FLUOROCROM**	**DILUCIÓ**	**CASA COMERCIAL**
Anti-Rabbit	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Mouse	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Guinea Pig	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Goat	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Rat	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-Chicken	Cy3, Cy5 o Alexa488	1:500	Jackson ImmunoResearch
Streptavidine	Alexa 546	1:500	Molecular Probes

2. APÈNDIX 2: ANTICOSSOS PER WESTERN BLOT.

A continuació es detallen els anticossos primaris i secundaris utilitzats per a realitzar la detecció immunoquímica en la tècnica del Western Blot.

PRIMARIS			
ANTICÒS	**ESPÈCIE D'ORIGEN**	**DILUCIÓ**	**CASA COMERCIAL**
NMDA-NR1	Rabbit	1:250	Abcam
pNMDA-NR1	Rabbit	1:500	Millipore
NMDA-NR2A	Rabbit	1:1000	Chemicon
SMN	Mouse	1:1000	BD
SIGMA-1R	Mouse	1:100	Santa Cruz
AMPK	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
pAMPK (Thr172)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling
PGC1-α	Rabbit	1:200	Santa Cruz
β-actin	Mouse	1:5000	Sigma
β-actin	Rabbit	1:5000	Sigma
α-tubulin	Mouse	1:1000	Sigma
GAPDH	Mouse	1:10000	Abcam
SECUNDARIS			
ANTICÒS	**CONJUGAT**	**DILUCIÓ**	**CASA COMERCIAL**
Anti-Rabbit	Peroxidasa	1:5000	Amersham Biosciences
Anti-Mouse	Peroxidasa	1:5000	Amersham Biosciences

3. APÈNDIX 3: ANTICOSSOS PER CITOMETRIA DE FLUX.

A continuació es detallen els anticossos primaris i secundaris utilitzats per a realitzar el marcatge d'antígens de superfície en la tècnica de citometria de flux.

PRIMARIS		
ANTICÒS	**ESPÈCIE D'ORIGEN/CONJUGAT**	**DILUCIÓ**
Annexin-V	APC	5µl/10^6 cel.
B220/CD45R	BV510	0,125 µg/10^6 cel.
CD117/c-kit	PE	0,06 µg/10^6 cel.
CD127/Il-7R	V450	0,125 µg/10^6 cel.
CD19	FITC	0,25 µg/10^6 cel.
CD3	FITC	1:100
CD4	Biotina	1:100
CD8	Mouse	1:100
MHC II	Mouse	1:100
SCF	Rabbit	1 µg/10^6 cel.
SECUNDARIS		
ANTICÒS	**CONJUGAT**	**DILUCIÓ**
Anti-Rabbit	APC	1 µg/10^6 cel.
Anti-Mouse	405	1:300
Streptavidine	PE	1:400

XII. ANNEX

Neurotherapeutics
DOI 10.1007/s13311-015-0399-x

ORIGINAL ARTICLE

Chronic Treatment with the AMPK Agonist AICAR Prevents Skeletal Muscle Pathology but Fails to Improve Clinical Outcome in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy

Clàudia Cerveró[1] · Neus Montull[1] · Olga Tarabal[1] · Lídia Piedrafita[1] · Josep E. Esquerda[1] · Jordi Calderó[1]

© The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 2015

Abstract Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic neuromuscular disorder characterized by spinal and brainstem motor neuron (MN) loss and skeletal muscle paralysis. Currently, there is no effective treatment other than supportive care to ameliorate the quality of life of patients with SMA. Some studies have reported that physical exercise, by improving muscle strength and motor function, is potentially beneficial in SMA. The adenosine monophosphate-activated protein kinase agonist 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) has been reported to be an exercise mimetic agent that is able to regulate muscle metabolism and increase endurance both at rest and during exercise. Chronic AICAR administration has been shown to ameliorate the dystrophic muscle phenotype and motor behavior in the *mdx* mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy. Here, we investigated whether chronic AICAR treatment was able to elicit beneficial effects on motor abilities and neuromuscular histopathology in a mouse model of severe SMA (the SMNΔ7 mouse). We report that AICAR improved skeletal muscle atrophy and structural changes found in neuromuscular junctions of SMNΔ7 animals. However, although AICAR prevented the loss of glutamatergic excitatory synapses on MNs, this compound was not able to mitigate MN loss or the microglial and astroglial reaction occurring in the spinal cord of diseased mice. Moreover, no improvement in survival or motor performance was seen in SMNΔ7 animals treated with AICAR. The beneficial effects of AICAR in SMA found in our study are SMN-independent, as no changes in the expression of this protein were seen in the spinal cord and skeletal muscle of diseased animals treated with this compound.

Keywords AICAR · Spinal muscular atrophy · SMNΔ7 mouse · Skeletal muscle · Neuromuscular junction · Spinal cord

Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal-recessive neuromuscular disorder representing the leading genetic cause of pediatric mortality in children younger than 2 years of age, with an incidence of 1 in 6000–10,000 live births and a carrier frequency of 1 in 35–50 [1, 2]. The histopathological hallmark of SMA is the progressive loss of α-motor neurons (MNs) in the spinal cord and lower brainstem, leading to weakness, paralysis, and subsequent atrophy of skeletal muscles. Clinically, the phenotypes of this disorder are heterogeneous, ranging from severe (type I) to mild (types III and IV), and patients are classified according to the age of disease onset and the severity of motor function.

In about 95 % of cases, SMA is caused by homozygous deletion or inactivating mutations of the telomeric copy of *SMN1*, located on the long arm of chromosome 5 [3]. This gene encodes the survival of motor neuron (SMN) protein, which is ubiquitously expressed and plays an essential role in mRNA splicing by regulating the assembly of small nuclear

✉ Jordi Calderó
jordi.caldero@mex.udl.cat

[1] Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida and Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLLEIDA), Av. Rovira Roure 80, 25198 Lleida, Catalonia, Spain

Published online: 18 November 2015

ribonucleic proteins and pre-mRNAs maturation [4, 5]. Levels of full-length SMN (FL-SMN) protein are dramatically reduced in SMA. Humans have a *SMN1* paralog, called *SMN2*, also located on chromosome 5 but in a centromeric position. *SMN2* differs from *SMN1* in a C-to-T transition in exon 7. This leads to the alteration of the normal splicing and the inefficient production of full-length transcripts. Thus, about 85–90 % of *SMN2* transcripts lack exon 7 and produce a truncated and unstable protein (SMNΔ7), which is rapidly degraded and therefore not functional [6]. The remaining (~10–15 %) transcripts derived from the *SMN2* produce a FL-SMN protein, which is only able to compensate partially for the absence of *SMN1*. *SMN2* copy number is inversely correlated with the severity of the disease [7, 8], and usually the most affected patients are those with fewer copies of *SMN2*.

The reason why reduced levels of the ubiquitous SMN protein lead to predominant alterations in the neuromuscular system is still unclear. It has been suggested that alterations in small nuclear ribonucleic protein assembly due to low SMN levels disturb the splicing of groups of genes that are crucial for MN function. Moreover, it is known that SMN plays important roles in motor axons and growth cones (reviewed in [9]), and a recent study [10] provided evidence of a presynaptic localization and interaction of this protein with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R in motor axon terminals, suggesting that SMN could contribute to differentiation and maintenance of the neuromuscular junction (NMJ). In addition, SMN deficiency induces intrinsic defects in skeletal muscle that appear to contribute to motor disturbances observed in SMA ([11–16]; see also [17] for a review). Currently, there is no effective therapy for SMA except for palliative care, such as nutritional supplementation, and orthopedic and respiratory support, to improve quality of life. However, tremendous efforts have been made in the last decade to find useful strategies to halt the progression of neurodegeneration linked to this disease. Owing to the fact that all patients with SMA have at least 1 copy of *SMN2*, most of the therapeutic strategies developed thus far are focused on increasing the synthesis of endogenous FL-SMN protein derived from *SMN2* through different mechanisms. Some of these approaches have been used in mouse models of SMA and clinical trials, and include several histone deacetylase inhibitors, aminoglycosides, C5-quinazoline derivatives, β-adrenergic agonists, and chemical inhibitors of glycogen synthase kinase 3, among of other compounds [18–26]. Other treatments are based on the use of antisense oligonucleotides, which act on *SMN2* splicing by restoring the inclusion of exon 7 in the final mRNA transcript with the subsequent enhancement of SMN expression, and on gene therapy through the insertion of the entire *SMN1* cDNA sequence by using viral vectors [21, 24, 27–32]. However, because MNs and skeletal muscles may require particular conditions to respond adequately to treatments designed to enhance SMN levels, SMN-independent strategies could also be very useful as adjunct treatments for SMA. These approaches are based on the use of neurotrophic factors and other neuroprotective and myotrophic compounds, and on stem cell therapies aimed at replacing MNs that are lost, and/or to confer MN protection through the delivery of neurotrophic molecules by transplanted cells (see [19, 20, 26, 27, 33, 34] for a review).

The potential role of physical exercise as an adjunct therapy in MN disorders has been studied in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and SMA [35–39]. Thus, regular exercise has been reported to improve motor function significantly, prolong lifespan, protect MNs from death, and attenuate muscular atrophy in mice mimicking SMA type II [38]. These beneficial effects of physical exercise appear to be related not only to the increase in exon 7-containing SMN transcripts, seen in the spinal cord of trained SMA animals [38], but also to the increased activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) subtype glutamate receptors, which is decreased in MNs of affected SMA mice [39]. On the other hand, NMDA receptor activation has been shown to enhance SMN levels *in vitro* [40].

Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is known to be activated in skeletal muscle during exercise and has an important role in the regulation of muscle metabolism, transcription, and phenotypic plasticity [41–45]. The synthetic AMPK agonist 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) is a potent stimulator of AMPK activity in skeletal muscle and, when administered chronically, has been reported to induce important plastic changes in muscle cells [46–49]. AICAR has also been demonstrated to increase training adaptation and enhance endurance in the absence of physical activity by acting as an exercise mimetic agent [50]. Pharmacological AMPK activation with AICAR has been assayed in the dystrophin-deficient *mdx* mouse as a model of Duchenne muscular dystrophy. In this paradigm, chronic treatment with AICAR has been shown to ameliorate disease muscle phenotype and motor behavior [51–54].

In the present study, we investigated whether chronic treatment with AICAR is able to exert beneficial effects on lifespan, phenotype, motor abilities, and neuromuscular histopathology in a mouse model of severe SMA (the SMNΔ7 mouse), in a similar way as reported for physical exercise. We show here that AICAR induce relevant changes in SMNΔ7 mice by improving skeletal muscle atrophy, promoting the maturity of muscle fibers, and ameliorating some structural alterations found in NMJs. Although AICAR was also able to prevent the loss of glutamatergic excitatory synapses on MNs linked to the disease, this agent did not have any positive effects in mitigating MN loss or the microglial and astroglial reaction occurring in the spinal cord of SMNΔ7 mice. Moreover, AICAR did not elicit any significant improvement in survival and motor performance of diseased animals.

Materials and Methods

Mice and Pharmacological Experiments with AICAR

The *Smn*$^{+/-}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMNΔ7*$^{+/+}$ [heterozygote knockouts for *Smn*, FVB.Cg-Tg(SMN2*delta7)4299Ahmb Tg(SMN2)89Ahmb Smn1tm1Msd/J, stock number 005025] mice were purchased from The Jackson Laboratory (Sacramento, CA, USA). Heterozygous female and male animals were crossed to obtain *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMNΔ7*$^{+/+}$ (homozygote knockouts for *Smn*, hereafter referred to as SMNΔ7) and *Smn*$^{+/+}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMNΔ7*$^{+/+}$ (wild-type for *Smn*, hereafter referred to as WT) mice. SMNΔ7 mice exhibit a severe postnatal SMA phenotype, with overt symptomatology and histopathological changes in the spinal cord and skeletal muscles at 7–8 days after birth, and have a mean lifespan of about 2 weeks [55–57].

At postnatal day (P) 0, the feet of mice were marked with tattoo paste (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Germany) for identification purposes, and a small piece of tail was cut for subsequent genotyping. The REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used for genomic DNA extraction and polymerase chain reaction setup. The primers used were as follows: WT forward 5' ctccgggatattgggattg 3', SMA reverse 5' ggtaacgccagggttttcc 3'; WT reverse 5' tttcttctggctgtgccttt 3'. Electrophoresis in 1 % agarose gel and SYBR safe DNA stain (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was run at 100 V. Age-matched WT littermates of mutant animals were used as controls.

Animals were divided into 4 experimental groups: WT and SMNΔ7 mice treated with AICAR (500 mg/kg/day; Tocris Bioscience, Bristol, UK), and WT and SMNΔ7 mice treated with the corresponding volume of physiological saline solution (vehicle). AICAR or vehicle was administered, through subcutaneous interscapular injections, once a day in the morning from P1 until the end of the experimental time frame. At selected times, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (2 %, 1 ml/10 g body weight) and sacrificed by quick decapitation. Tissue samples were rapidly dissected, removed, and subsequently processed as described below. All the experimental procedures were carried out in agreement with the guidelines of the committee for animal care and use of the University of Lleida, approved by the Generalitat de Catalunya.

Behavioral Phenotype Testing

To evaluate disease progression, mice were weighed daily in the morning and, subsequently, carefully examined in order to determine the presence of specific signs and/or symptoms of disease. Thereafter, the righting reflex and the hindlimb suspension test ("tube test") were conducted by the same investigator (blind to the experimental condition) to assess the motor abilities of mice. These tests were scored following the guidelines described elsewhere [58]. In brief, for the righting reflex, mice were placed on their backs on a flat surface, and the time necessary to reposition themselves dorsal side up was assessed over a period of 30 s. For the tube test, each mouse was suspended head down from its hindlimbs in a 50-ml plastic centrifuge tube containing a piece of cotton at the bottom to protect the animal when they fell. For this test, 2 parameters were evaluated: the latency (in seconds) to fall from the edge of the tube, and the positioning of the legs and tail. For the latter parameter, posture was scored from 4 to 0 as follows: 4, hindlimbs were normally separated and tail raised; 3, weakness was apparent and hindlimbs were closer together but only occasionally touched each other; 2, hindlimbs were close to each other and frequently touching; 1, hindlimbs were almost always in a clasp position with the tail raised; 0, hindlimbs were in constant clasping and the tail lowered; a score of 1 was given when a mouse failed to hold on to the tube. For each test, every mouse was examined twice, with a 15-min recovery period between trials; the average of values obtained in the 2 independent tests was then determined for the final score.

Muscle and Spinal Cord Histology and MN Counts

Tibialis anterior (TA) and intercostalis (IC) muscles, and spinal cords were rapidly dissected and processed for histological analysis and MN counting.

TA muscles were weighed, fixed in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4 for 2 h, cryoprotected with 30 % sucrose in 0.1 M in PB, embedded in Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA), and frozen. Multiple cryostat transverse sections (16-μm thick) were obtained from the midbelly of the muscle. Sections were subsequently stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For MN counts, spinal cords were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin. Serial transverse sections (12-μm thick), obtained through the entire lumbar segment, were stained with H&E. The apparently healthy MNs present in the ventral horn were identified by their size and shape, and counted blindly on one side of every 10th section according to previous described procedures [59, 60]. Briefly, only MNs with a large nucleus, a visible clump of nuclear material, and a substantial cytoplasm were counted. The total number of MNs per ventral horn was obtained by multiplying the number of counted cells by 10.

Immunocytochemistry and Imaging

Unless otherwise indicated, for immunocytochemical studies, TA and IC muscles and lumbar spinal cords were fixed by immersion in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4, either for 2 h (in the case of TA and IC muscles) or overnight (in the case of spinal cords), and cryoprotected. Tissue samples were embedded in Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences) and frozen. Longitudinal (for TA and IC muscles) or transverse

(for spinal cord) serial cryostat sections (16-μm thick) were obtained and stored at –80 °C. Immunocytochemical analysis of muscle fiber type composition was performed on unfixed TA muscles. For this, muscles were embedded in tragacanth gum, snap-frozen in liquid N_2-cooled isopentane, and sectioned transversely (10-μm thick) on a cryostat.

Sections were sequentially rinsed in phosphate-buffered saline containing 0.1 % Triton X-100 for 30 min, blocked in normal goat serum, and incubated with the selected primary antibody overnight. The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal antivesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) (diluted 1:1000; catalog no. 135 302, Synaptic Systems, Gottingen, Germany); rabbit polyclonal anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA1) (diluted 1:500; catalog no. 019-19741, Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan); chicken polyclonal antiglial fibrillary acidic protein (GFAP) (diluted 1:1000; catalog no. Ab4674, Abcam, Cambridge, UK); rabbit polyclonal anti-NMDA receptor 2A subunit (NR2A) (diluted 1:1000; catalog no. AB1555P, Chemicon International Inc., Billerica, MA, USA); rabbit polyclonal anticalcitonin gene-related peptide (CGRP) (diluted 1:1000; catalog no. C8198, Sigma); chicken polyclonal antineurofilament 68 KDa (NF) (diluted 1:1000; catalog no. ab72997, Abcam); mouse monoclonal antisynaptic vesicle protein 2 (SV2) [diluted 1:1000; catalog no. SV2, Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa City, IA, USA]; mouse monoclonal antimyosin heavy chain (MyHC) I (diluted 1:5; catalog no. A4-840, DSHB); mouse monoclonal anti-MyHC IIA (diluted 1:20; catalog no. SC-71, DSHB); and mouse monoclonal anti-MyHC IIB (diluted 1:20; catalog no. BF-F3, DSHB). After incubation with the primary antibody, sections where washed and incubated at room temperature (RT) for 1 h with the appropriate secondary fluorescent antibodies: Dylight 488 donkey antirabbit IgG (diluted 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA); Cy3 donkey antichicken or antirabbit (diluted 1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories); Alexa Fluor 488 goat antichicken IgG (diluted 1:500; Molecular Probes). Sections were also labeled with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (50 ng/ml; Molecular Probes) for DNA staining. Muscle sections were incubated with Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 647-labeled α-bungarotoxin (α-Bgtx) (diluted 1:500; Molecular Probes) to identify postsynaptic acetylcholine receptors. Spinal cord sections were counterstained with Neuro Trace 500/525 or 530/615 (green or red, respectively) fluorescent Nissl stain (Molecular Probes) to identify ventral horn MNs. After washing, slides were coverslipped by using Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Slides were examined with an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a DP30BW camera or FluoView 500 or FluoView 1000 Olympus laser scanning confocal microscopes. For comparisons, slides from different animals and experimental conditions were processed in parallel for immunocytochemistry and subsequent imaging. The same scanning parameters were used for the acquisition of images corresponding to different experimental groups. For spinal cord immunocytochemical studies, digital images of the entire lumbar region were obtained from every 30th section.

Image and Morphometric Analysis

Myofiber number counts and size measurements were performed in bright field digital images taken from TA muscle cross-sections stained with H&E. Images were subsequently processed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

The cytoarchitecture of NMJs was analyzed in longitudinal immunostained sections of TA and IC muscles. Z-stack optical sections (1-μm thick) were obtained and projected to reconstruct NMJs using the microscope software. Five to nine sections per muscle were analyzed for each animal, and 75–100 NMJs from randomly selected visual fields were evaluated per experimental condition. NMJ size was assessed by determining the area of the α-Bgtx-labeled postsynaptic site, manually outlined, using ImageJ. A NMJ was considered to be denervated when the percentage of α-Bgtx-labeled postsynaptic surface covered by SV2-stained presynaptic terminal was<15 %. Single or poly-innervation was estimated by counting the number of preterminal axons (revealed by NF immunostaining) entering a single postsynaptic site: a NMJ was considered to be polyinnervated when≥2 axons were seen converging on the postsynaptic site. Based on the structural appearance of each postsynaptic site, the degree of maturity of NMJs was classified as follows: plaque, folds, perforations, or secondary structure (ranging from immature to mature) according to previously described criteria [61]. NF was considered to accumulate in the presynaptic sites when the terminal portion of axons exhibited a swollen morphology and was strongly stained with the anti-NF antibody. Terminal sprouting was quantified by counting the number of NF-stained axonal processes coming from a nerve terminal that escaped from an α-Bgtx-stained postsynaptic site. The number of sprouts counted per NMJ was referred to as a percentage of the total number of NMJs examined per muscle. CGRP immunostaining in NMJs was scored, by a blinded observer, according to the fluorescence intensity and classified as follows: positive, mild (low signal but distinguishable from the background), or negative. Any NMJ that was difficult to analyze owing to its location and/or orientation was excluded from the analysis.

Levels of GFAP and IBA1 immunoreactivity in the spinal cord were quantified by digital image analysis using the Visilog 6.3 software (Noesis, Orsay, France). The number of VGluT1 immumunoreactive synaptic boutons on MN somata was counted manually on the screen; only boutons in close contact

with MNs showing a large nucleus, a visible nucleolus, and a healthy appearance were included in the counts, which were then normalized to the perimeter of MN soma.

Western Blotting

Frozen spinal cords and hindlimb muscles were fragmented and homogenized with blending buffer 1×SR (2 % sodium dodecyl sulfate and 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) supplemented with protease inhibitor (Ref. P8340; Sigma) and PhosSTOP (Roche, Laval, Canada). Homogenized samples were heated to 100 °C for 5 min and centrifuged at 13,000 g for 5 min. The protein concentrations of supernatants were determined by BIO-RAD Micro DC protein assay (BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Loading buffer 4×SS (20 % sucrose and 0.05 % bromophenol blue, 0.1 % sodium azide) containing 5–10 % β-mercaptoethanol (Sigma) and 15–50 μg protein were loaded in a 10 % or 15 % polyacrylamide electrophoresis gel. Proteins were electrotransferred to polyvinyldifluoride membranes (ImmobilonTM-P, Millipore, Bradford, MA, USA) in Tris-glycine-methanol-buffered solution. Membranes were blocked with 5 % dried skimmed milk in 0.1 % Tween 20 and Tris-buffered saline pH 8 (TBST) for 1 h at RT, and then extensively washed in TBST. Immunodetection was performed by incubating the membranes overnight at 4 °C with the following antibodies: rabbit polyclonal antiNR2A (diluted 1:1000; catalog no. AB1555P, Chemicon International Inc.); rabbit polyclonal anti-AMPKα (diluted 1:1000; catalog no. 2532, Cell Signaling, Beverley, MA, USA); rabbit polyclonal antiphospho-AMPKα (Thr172) (diluted 1:1000; catalog no. 2531, Cell Signaling); rabbit polyclonal antiperoxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1 (H300) (PGC-1α) (diluted 1:200; catalog no. SC-13067, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal anti-SMN (diluted 1:1000; catalog no. 610647, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); mouse monoclonal anti-β-actin (diluted 1:5000; catalog no. A54441, Sigma); mouse monoclonal anti-α-tubulin (diluted 1:5000; catalog no. T5168, Sigma); and mouse monoclonal antiglyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase (6C5); (diluted 1:10,000; catalog no. ab8245, Abcam). The antibodies against β-actin and α-tubulin or glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase were used for loading controls in blots of spinal cord and muscle extracts, respectively. The membranes were washed in TBST, incubated with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) for 60 min at RT, washed in TBST, and visualized using the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent detection kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), as described by the manufacturer. The quantification of band densities was performed by using Chemi-Doc MP Imaging System (BIO-RAD Laboratories Inc.).

Statistical Analysis

All data are expressed as means±SEM. The statistical analysis was assessed by either one-way analysis of variance, followed by post-hoc Bonferroni's test, or Student's *t* test. Differences were considered to be statistically significant if $p \leq 0.05$.

Results

Effects of AICAR Treatment on AMPK Phosphorylation and PGC-1α Content in the Skeletal Muscle of SMNΔ7 Mice

We first examined the effect of AICAR administration on AMPK activity, evaluated by phosphorylation, in the skeletal muscle of WT and SMNΔ7 mice *in vivo*. For this, either AICAR (500 mg/kg) or saline was injected subcutaneously, once daily, to animals from P1 to P8, and hindlimb muscles were collected on P8, 3 h after the last injection. The AICAR dosage, and regimen and route of administration used here were the same as reported by others in previous studies [51, 62]. Western blot analysis of muscle extracts showed no significant changes in total AMPK protein levels after AICAR treatment in both WT and SMNΔ7 animals (Fig. 1A, B). However, AMPK phosphorylation, examined with an anti-phospho-AMPK (Thr172) antibody, displayed a moderate (~0.6-fold) increase in muscles of AICAR-treated WT mice compared with those of WT animals injected with saline (Fig. 1A, C). Strikingly, we noticed that muscles of saline-treated SMNΔ7 animals showed significantly greater levels (~1.6-fold increase; $p<0.05$) of phosphorylated AMPK compared with the saline-WT condition. It is important to note that we also found a similar increase in phosphorylated AMPK expression in muscles of $Smn^{-/-};SMN2^{+/+}$ mice, a more severe model of the disease mimicking type I SMA (see supplementary Fig. S1). This elevated AMPK phosphorylation in muscles of diseased animals was not increased further after AICAR treatment; indeed, we observed a modest, but not significant, decrease in phosphorylated AMPK in SMNΔ7 muscles of animals treated with AICAR in relation to those injected with saline ($p>0.05$) (Fig. 1A, C). The phosphorylation status of AMPK, based on the ratio of phosphorylated AMPK relative to total AMPK levels, showed a similar profile to that of phosphorylated AMPK (Fig. 1D). Overall, these results indicate that basal AMPK activity in skeletal muscles is significantly elevated in SMA animals. Moreover, chronic treatment with AICAR modestly activates AMPK in skeletal muscles of healthy mice *in vivo* but is not able to modify significantly AMPK phosphorylation levels found in the course of the disease.

PGC-1α is a transcriptional coactivator that appears to play an important role in the oxidative metabolism of skeletal

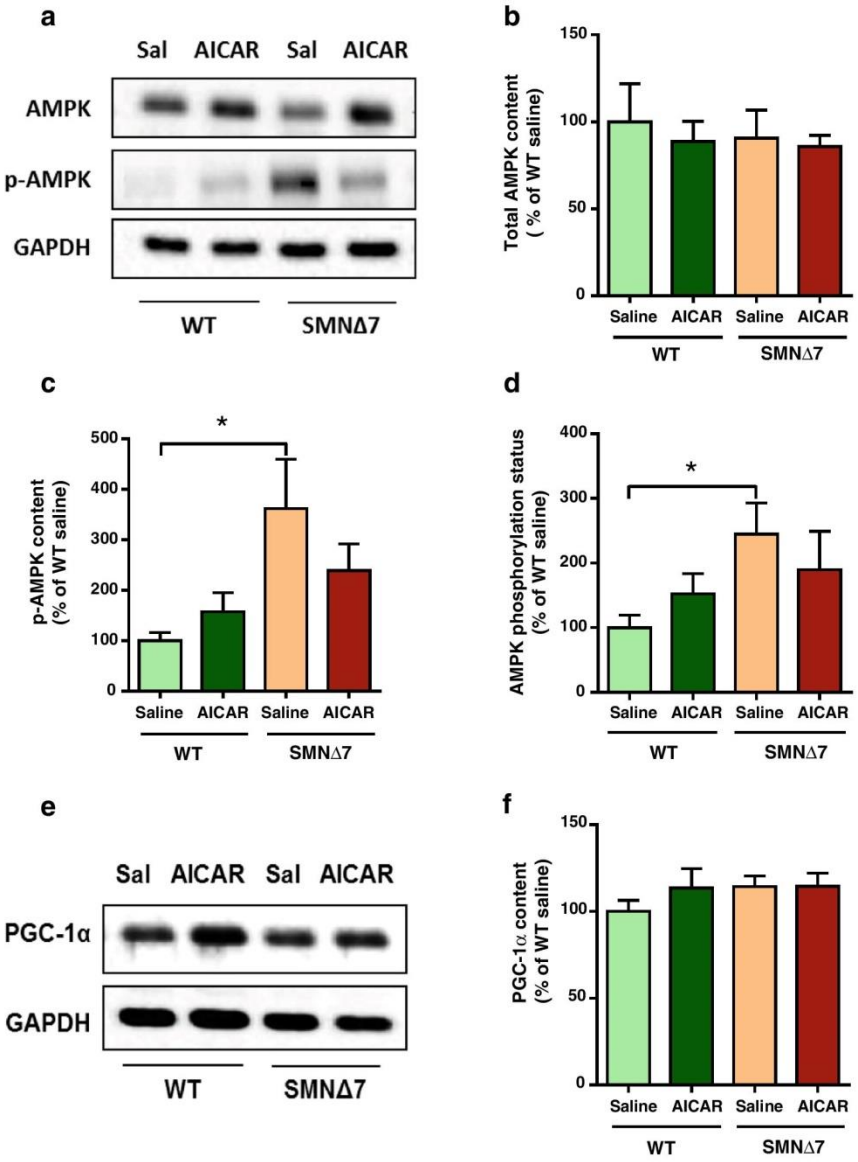


Fig. 1 Effects of chronic 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) treatment on total and phosphorylated adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) protein levels, and peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1 (PGC-1α) content in the skeletal muscle of wild-type (WT) and $Smn^{-/-}$;$SMN2^{+/+}$;$SMN\Delta7^{+/+}$ (SMNΔ7) mice. Muscles from hindlimbs were collected on postnatal day 8 after daily treatment with either 500 mg/kg AICAR or vehicle [saline solution (Sal)]. (A) Representative Western blots for total AMPK, phosphorylated AMPK (p-AMPK) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; as loading control). (B–D) Quantification of changes in total (B) AMPK and (C) p-AMPK content, determined by densitometry, and (D) the phosphorylation status of the kinase in basal conditions (animals injected with saline) and after AICAR treatment. The phosphorylation status of AMPK is represented as the ratio of the phosphorylated form relative to total AMPK. Data in all graphs are expressed as the percentage of change in relation to the levels found in the saline-WT group. Bars represent the values (mean±SEM) of 8 mice per experimental condition from 3 independent experiments. (E) Representative Western blots of PGC-1α protein and GAPDH (as loading control). (F) Densitometric analysis of changes in PGC-1α content in basal conditions (animals injected with saline) and after AICAR treatment. Bars represent the values (mean±SEM) of 5–6 mice per experimental condition from 2 independent experiments. *$p<0.05$, one-way analysis of variance (Bonferroni's post-hoc test)

muscle by stimulating mitochondrial biogenesis and oxidative enzymes [63, 64]. Exercise has been reported to induce PGC-1α expression in both rodents and humans [65–67]. It is known that AMPK is able to phosphorylate directly PGC-1α protein resulting in the induction of the PGC-1α promoter [68]. PGC-1α content in muscle increases after chronic pharmacological AMPK stimulation by AICAR [50]. For this reason, we next explored whether AICAR treatment enhanced PGC-1α levels in skeletal muscles of SMNΔ7 mice. Western blot examination of muscle extracts of AICAR-treated WT mice showed a slight, but not significant, increase (~1.2-fold) in PGC-1α in relation to levels found in saline-injected WT animals. A similar modest increase in PGC-1α content was observed in muscles of saline- and AICAR-injected SMNΔ7 mice. These results indicate that, in our experimental model, AICAR treatment has a minor influence on the levels PGC-1α protein in skeletal muscle.

Chronic Treatment with AICAR did not Improve Motor Abilities and Lifespan of SMNΔ7 Mice

The progression of SMA in mouse models results in a gradual weight loss and impaired motor performance [56]. As expected, SMNΔ7 mice treated with saline showed a lower growth-related gain of body weight in relation to saline-injected WT animals. SMNΔ7 mice chronically treated with AICAR displayed a modest improvement in body weight gain. Although this change was already observed at P4, it was statistically significant at P7 and P8 ($p<0.05$). No significant differences in body weight were found at any experimental time point when WT mice treated with either AICAR or saline were compared (Fig. 2A).

Righting reflex and the tube test were used as assessments of the muscle strength and motor coordination. Both saline- and AICAR-treated SMNΔ7 mice showed similar times to right themselves on all 4 paws, with significant difficulties in righting

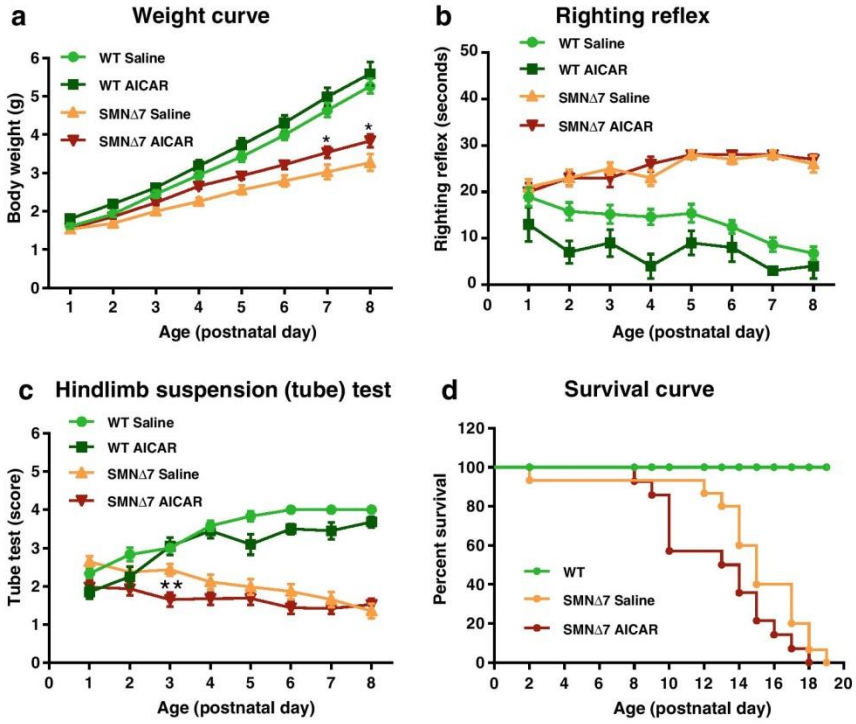


Fig 2 Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) modestly ameliorates the deficiency in body weight gain of *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMN*Δ*7*$^{+/+}$ (SMNΔ7) mice but does not improve their motor phenotype. (A) Body weight of wild-type (WT) and SMNΔ7 mice treated with either saline or AICAR. Note that compared with saline-injected SMNΔ7 mice, mutant animals treated with AICAR exhibit higher weights as early as postnatal day (P) 4; however, these differences are only significant at P7 and P8 (*$p<0.05$ *vs* SMNΔ7 saline). (B, C) Motor behavior assessment by using (B) righting reflex and (C) hindlimb suspension test; except for the tube test at P3, in which SMNΔ7 mice treated with AICAR have significantly lower scores than those injected with saline, no significant differences in righting reflex or tube test performance were observed between these 2 groups at any of the ages examined (***$p<0.001$ *vs* SMNΔ7 saline). In all graphs, values are shown as mean±SEM, and one-way analysis of variance (Bonferroni's post-hoc test) was used for statistical analysis ($n=15$–28 mice per experimental group). (D) Kaplan–Meier survival curve for saline-injected and AICAR-treated SMNΔ7 mice, and WT littermates. Saline- and AICAR-treated SMNΔ7 mice did not show significant differences in the mean survival (14.6±1 and 12.8±0.8 days, respectively; $p>0.05$, Student's t test, $n=14$–15 per experimental condition

in comparison with saline- and AICAR-treated WT mice (Fig. 2B). Although on most of the days tested AICAR-injected WT animals showed shorter times to right than saline-injected WT mice, the differences were not statistically significant. In relation to WT animals, both saline and AICAR-treated SMNΔ7 mice had short latencies to fall and worse scores when assessed in the tube test (Fig. 2C). At P3, significantly lower tube test scores were observed in AICAR-treated SMNΔ7 mice *versus* diseased animals injected with saline; however, this decline was not maintained during the remaining days studied.

To determine whether AICAR treatment is able to prolong the lifespan of SMNΔ7 mice, survival was monitored in a group of animals injected daily with either the AMPK agonist or saline from P1 until death. The Kaplan–Meier survival curve is shown in Fig. 2D. AICAR administration did not elicit any significant effect on the lifespan of diseased animals (mean survival: SMNΔ7-saline 14.6±1 days, n =15; SMNΔ7-AICAR 12.8±0.8 days, n=14; p>0.05). Moreover, in this group of SMNΔ7 mice that received AICAR until the end stages of disease, no significant improvements in motor performance were found, and the enhancement in body weight was only maintained until P10 (data not shown).

Chronic Treatment with AICAR Reduced Muscular Atrophy Associated with SMA

To determine whether AICAR treatment is able to improve muscle pathology linked to SMA, the phenotype of the TA muscle was examined. As expected, TA muscle weights in saline-treated SMNΔ7 mice were significantly lower (~40 % reduction; p<0.01) than those in WT animals (Fig. 3A). An increase (~15 %) in muscle weight was observed in AICAR-treated WT mice in relation to saline-injected WT littermates; however, this change was not statistically significant. Interestingly, chronic AICAR treatment significantly increased (~27 %) the weight of TA muscle in SMNΔ7 mice, even though this increase did not reach the average weight values observed in WT animals treated with saline (Fig. 3A).

In concordance with previous reports [69], analysis of cross-sections revealed that TA muscles of saline-treated SMNΔ7 animals had ~19 % fewer fibers than those of saline-injected WT littermates; however, probably because of the small sample size, these differences were not statistically significant. AICAR treatment resulted in a small, nonsignificant, increase (~1.3-fold) in the number of TA myofibers in SMNΔ7 mice (Fig. 3B).

As expected, TA muscle fibers of saline-treated SMNΔ7 mice showed a smaller cross-sectional area (~32 % reduction) compared with saline-treated WT littermates. In concordance with the changes in muscle weight induced by chronic AICAR treatment, we found a significant increase in the size of TA muscle fibers in both SMNΔ7 and WT mice injected with the AMPK agonist (Fig. 3C–G). The relative frequency distribution of myofiber areas demonstrated a shift to larger caliber fibers in TA muscle of both WT and SMNΔ7 animals treated with AICAR (Fig. 3H, I). Thus, in the absence of exercise training, chronic AICAR administration increases the size of myofibers and hence the mass of skeletal muscles of both normal and SMNΔ7 mice. In the latter, AICAR appears to be particularly beneficial, as it is able to limit the degree of muscular atrophy that results from the impaired postnatal myofiber growth linked to SMA [13, 69, 70].

It has been reported that muscle fibers of SMNΔ7 mice, in addition to their reduced size, are less mature than those of normal animals [69, 70]; this results in changes in the fiber type composition of atrophied muscles. Accordingly, we next examined whether AICAR can modulate the alterations in the myofiber type profile observed in SMA. Specific MyHC isoforms are expressed in different types of muscular fibers [71]. Hence, different isoform-specific anti-MyHC (I, IIA, and IIB) antibodies were used to analyze the fiber type composition of WT and SMNΔ7 TA muscles (Fig. 3J–N). The pattern of fiber type composition in the TA muscle of saline-treated WT mice was similar to that previously described [72], with a very low proportion of type IA and IIA fibers and a predominance of type IIB fibers. Interestingly, in relation to saline-treated WT animals, TA muscles from saline-injected SMNΔ7 mice showed significantly higher numbers of type I and a lower (although not significant) proportion of type IIB fibers. AICAR administration significantly increased the percentage of type I fibers in both WT and SMNΔ7 TA muscles with no apparent changes in type IIA and type IIB fibers. Thus, the TA muscle (a predominantly fast muscle type) of diseased animals exhibited a change in myosin expression profile with an abnormal increase in the abundance of type I (slow, oxidative) myofibers that was accentuated by AICAR treatment.

AICAR Partially Restores NMJ Defects in SMNΔ7 Mice

We next asked whether AICAR was able to modify structural abnormalities found in NMJs of SMNΔ7 mice. For this, muscle cryostat sections were double immunostained with antibodies against NF and SV2 to label axons and nerve terminals, respectively, and co-stained with α-Bgtx to identify postsynaptic acetylcholine receptors. Denervation of the skeletal muscle has been described as a histopathological feature of SMA in humans that is recapitulated in distinct mouse models of the disease [13, 61, 73]. Denervation in the SMNΔ7 mouse model has been reported to occur in some specific muscles (i.e., in those from head and trunk), with only discrete changes in others (particularly in those located in hindlimbs) that appear to be fully innervated despite disease progression [73, 74]. In fact, we found a nonsignificant increase in the number of denervated NMJs in TA muscle of SMNΔ7 mice at P8, the age examined in the present study [WT 9.6 %±1.2 %, SMNΔ7 12.3 %±1.6 % (p>0.05), 78 and 94 NMJs analyzed from 3–4 animals per condition]. For this reason we used the

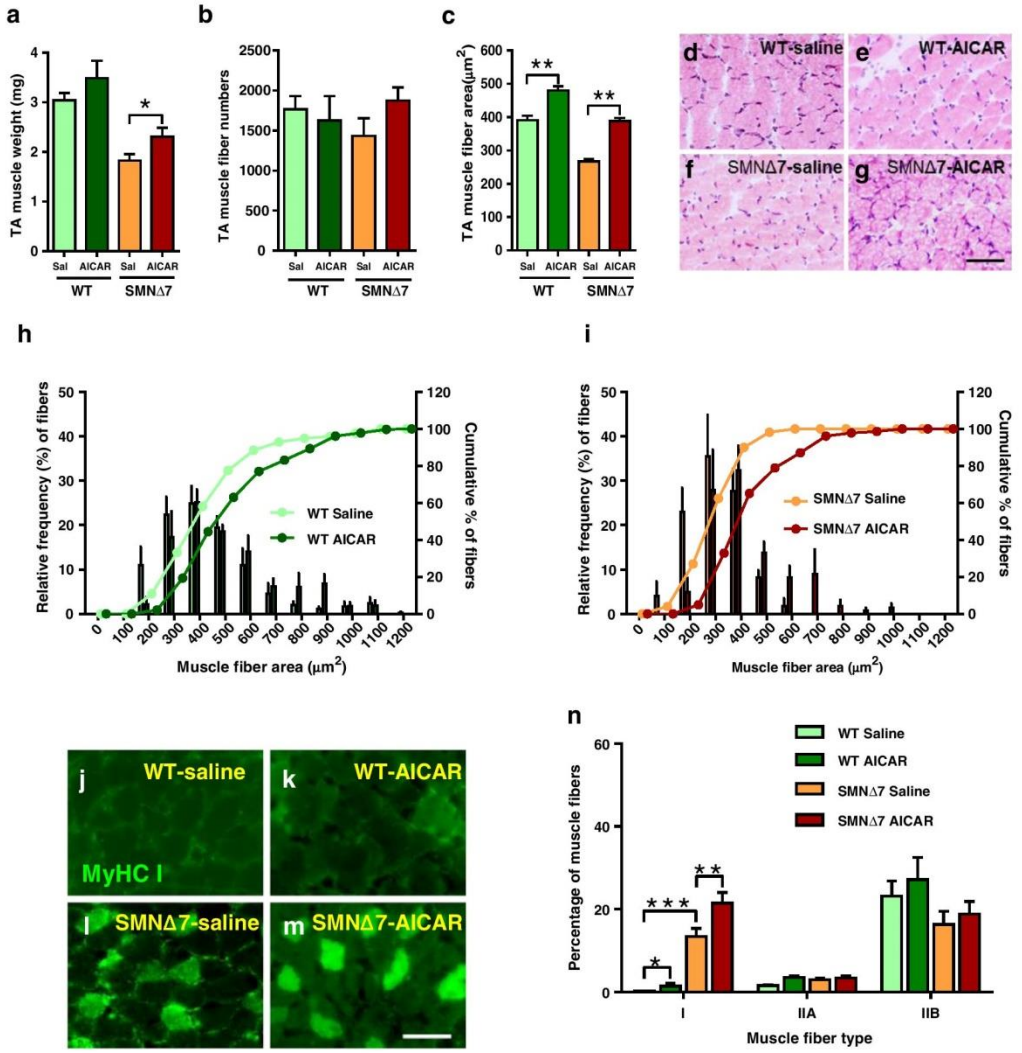


Fig. 3 Effects of chronic 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR; 500 mg/kg/day) administration on tibialis anterior (TA) muscle of *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMNΔ7*$^{+/+}$ (SMNΔ7) mice. (A) Weight of TA muscles from postnatal day (P) 8 WT and SMNΔ7 animals treated with either saline (Sal) or AICAR (*p<0.05; n=8–11 muscles per experimental condition). (B) Number of fibers in the TA muscle of P8 animals from the 4 experimental groups. There is a small, but not significant, reduction in the number of myofibers in saline-injected SMNΔ7 mice compared with saline-treated wild-type (WT) littermates; AICAR treatment increases fiber counts in muscles of mutant mice; however, the difference does not reach statistical significance (n=4 muscles from distinct animals per group). (c) Cross-sectional area of muscle fibers in the TA muscle from P8 WT and diseased mice after treatments (**p <0.001; n=200–300 fibers of TA muscles obtained from 4–5 mice per condition). (D–G) Representative micrographs of TA muscle cryosections, stained with hematoxylin and eosin, from either saline- or AICAR-treated WT and SMNΔ7 mice. (H, I) Relative frequency of fiber sizes, expressed as a percentage of the total number of fibers; in TA muscles from (H) WT and (I) SMNΔ7 mice subjected to saline or AICAR treatment (n=4–5 mice per condition); the cumulative percentages of muscle fibers in each experimental group are also shown in the same graph. (J–M) Representative images of myosin heavy chain (MyHC) I immunostaining in TA muscles of (J, K) WT and (L, M) SMNΔ7 mice treated with either (J, L) saline or (K, M) AICAR. (N) Graphical summary of percentage of MyHC I-, MyHC IIA-, and MyHC IIB-immunostained fibers (type I, IIA, and IIB myofibers, respectively) in TA muscles of P8 WT and SMNΔ7 mice after AICAR treatment. Note that muscles from WT mice treated with AICAR display a moderate, but significant, increase in slow, MyHC I, fibers; compared to WT animals, muscles from saline-injected SMNΔ7 animals show a marked elevation in the number of MyHC I fibers that is even higher after AICAR treatment (*p<0.05, **p <0.01, ***p<0.001, n=20 sections of TA muscles from 4–5 mice per experimental condition). In all graphs, values are shown as mean±SEM, and one-way analysis of variance (Bonferroni's post-hoc test) was used for statistical analysis. Scale bar=50 μm in (G) (applies to D–G) and 25 μm in (M) (applies to J–M)

IC muscle, which has an important role in maintaining respiratory function and is clinically relevant in SMA. We know from previous studies that IC muscle displays important molecular and structural NMJ defects in SMA mice [13, 61]. In relation to P8 saline-treated WT animals, IC muscles of SMNΔ7 mice treated with vehicle displayed a ~1.5-fold increase [WT-saline 25.0 %±1.1 %, SMNΔ7-saline 39.7 %± 2.1 %, n=97 and 101 NMJs, respectively, from 3–4 mice per condition (p<0.001)] in the number of denervated NMJs. AICAR treatment significantly prevented SMNΔ7 IC muscle denervation (~1.2-fold reduction *vs*. SMNΔ7-saline; p<0.05) linked to the disease (Fig. 4A–E").

It is known that NMJs of SMA mice display structural changes indicative of delayed synaptic maturation [61, 70, 75]. We found that, in the IC muscles of saline-injected SMNΔ7 mice, ~40.5 % of NMJs were innervated polyneuronally compared with ~8 % polyneuronal innervation observed in saline-treated WT littermates (p<0.001). AICAR administration significantly decreased (~1.8-fold reduction; p<0.001) the number of polyneuronally innervated NMJs found in the IC muscles of SMA animals (Fig. 4F–J"). Moreover, we analyzed the architecture of the NMJ postsynaptic site labeled with α-Bgtx and found that, in relation to saline-treated WT mice, IC muscles of SMNΔ7 mice injected with vehicle displayed a dramatic increase in the number of NMJs showing a plaque morphology and a significant reduction in the number of NMJs exhibiting folds or a perforate appearance (Fig. 4K, L). These structural alterations, reflecting NMJ immaturity in diseased animals, were partially prevented by AICAR treatment [SMNΔ7-AICAR *vs* SMNΔ7-saline=plaque: ~1.4-fold decrease (p<0.001); folds: ~1.5-fold increase (p<0.001), perforated: ~5.5-fold increase (p<0.001), n=75 NMJs from 3–4 animals per experimental condition].

Additionally, we examined whether AICAR was able to modify some presynaptic histopathological changes found in NMJs of SMA mice, such as NF accumulation in nerve terminals and axonal sprouting [13, 61, 76]. AICAR treatment was not able to prevent the abnormal NF aggregation observed in the IC synapses of saline-treated SMNΔ7 mice (Fig. 4M, O). However, AICAR significantly decreased the number of terminal sprouts found in the IC NMJs of SMNΔ7 mice (~1.2-fold reduction in the sprouting levels in AICAR-treated SMNΔ7 mice in comparison with those in saline-injected SMNΔ7 animals; p<0.001) (Fig. 4N, P).

The neuropeptide CGRP is stored in large dense core vesicles in spinal cord MN somata and nerve terminals, where it appears to have an important role in the development and maintenance of NMJs [77–80]. In agreement with our previous reports [13, 81], CGRP was markedly reduced in spinal cord MNs, and TA and IC NMJs of saline-treated SMNΔ7 mice, especially at end stages of disease (not shown). This decrease in CGRP content was not significantly modified by AICAR in any tissue samples, as shown in Fig. 4Q–U' for the IC muscle.

AICAR Treatment did not Protect Against MN Death and Reactive Gliosis but Prevented MN Deafferentation in the Spinal Cord of SMNΔ7 Mice

Progressive MN loss has been considered a pathological hallmark of SMA. In agreement with our previous report [57], we found a moderate (but significant) MN number depletion (~30 % of WT-saline) and MN size reduction (~15 % of WT-saline) in the spinal cord of saline-treated SMNΔ7 mice at P8, a time point at which diseased animals exhibited a dramatic impairment in their motor abilities. We then examined whether changes in the skeletal muscle phenotype of SMNΔ7 mice induced by chronic AICAR administration were accompanied by an increase in MN survival or size. In relation to saline-treated SMNΔ7 mice, diseased animals injected with AICAR did not exhibit any changes in the number or size of apparently healthy spinal MNs (Fig. 5A–F).

Although AICAR was not able to protect against MN degeneration in SMA, we wanted to further explore whether AICAR had any beneficial effect on other known histopathological changes in the spinal cord of SMA mice, such as microglial and astroglial reaction in the ventral horn, and the loss of glutamatergic excitatory inputs to MNs [13, 57, 74, 82, 83]. Immunocytochemistry with antibodies against IBA1 and GFAP, to stain microglia and astroglia, respectively, revealed that AICAR administration did not prevent the reactive microgliosis and astrogliosis observed in the spinal cord of SMNΔ7 animals (Fig. 5G–K and L–P, respectively). However, compared with diseased mice injected with saline, AICAR-treated SMNΔ7 animals showed a significant increase (~1.6-fold; p<0.001) in the number of VGluT1-positive synapses contacting MN somata (Fig. 5Q–U).

AICAR Treatment did not Modify the NR2A Subunit in Spinal Cord MNs of SMNΔ7 Mice

It has been reported that in the type II SMA mouse model, physical exercise is able to increase the expression of the gene encoding the NR2A subunit of the glutamate NMDA receptor in MNs [39]. To examine whether chronic AICAR treatment is able to modulate the expression of NR2A protein in the spinal cord and, particularly in MNs of SMNΔ7 mice, immuncytochemical and Western blot analyses were performed. In contrast to results by Biondi et al. [39], we did not find a reduction in NR2A expression in lumbar MNs of our SMA mouse model: the quantification of NR2A immunofluorescence in spinal cord sections of WT and SMNΔ7 mice treated with saline revealed comparable levels of intensity in both conditions. Similar results were obtained when NR2A protein content was examined in spinal cord extracts by Western blot. Levels of NR2A expression were not significantly modified after AICAR administration (Fig. 6A–O).

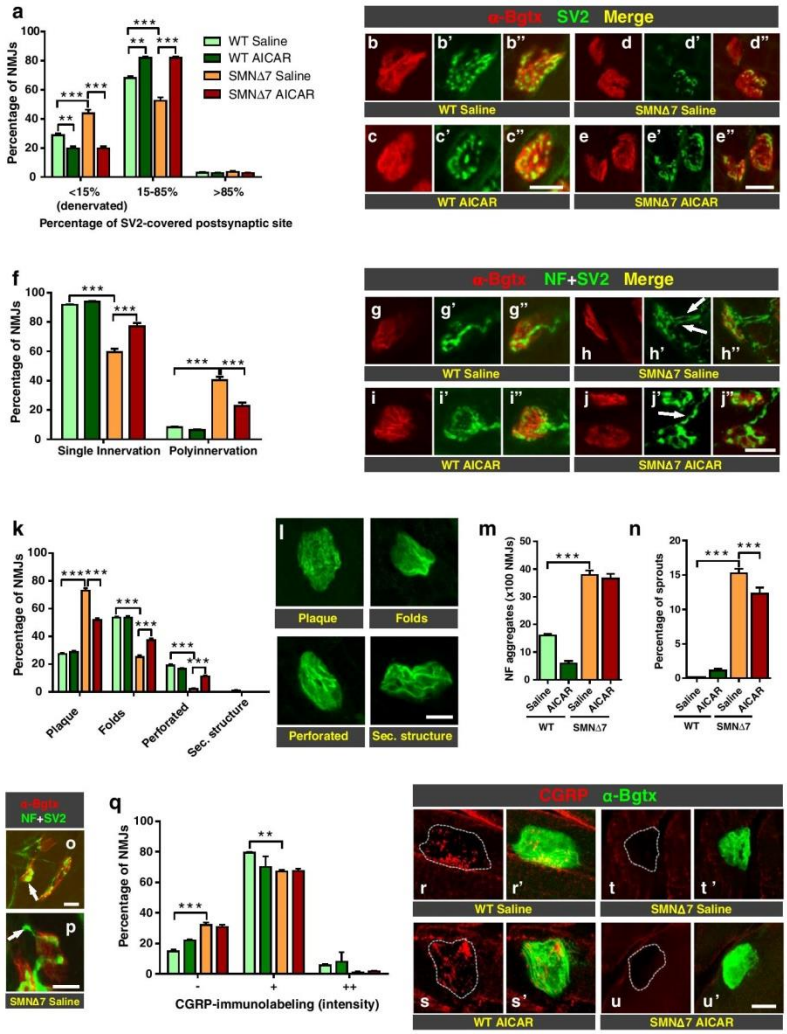


Fig. 4 Effects of chronic 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) treatment in the neuromuscular junctions (NMJs) of *Smn*$^{-/-}$;*SMN2*$^{+/+}$;*SMNΔ7*$^{+/+}$ (SMNΔ7) mice. Different presynaptic and postsynaptic structural features were analyzed in NMJs of intercostalis (IC) muscles of postnatal day (P) 8 wild-type (WT) and SMNΔ7 mice after treatment with either saline or AICAR. (A) Percentage of NMJs showing different degrees of innervation based on the proportion of α-bungarotoxin (α-Bgtx)-labeled postsynaptic site area covered by synaptic vesicle protein 2 (SV2)-immunostained presynaptic terminals. (B–E") Representative images illustrating the results shown in (A); micrographs were taken from sections immunolabeled with SV2 (green) and stained with α-Bgtx (red) for postsynaptic site identification. (F) Percentage of NMJs showing single- and multiple innervation. (G–J') Representative images illustrating the results shown in (F); muscle sections were double-immunolabeled with SV2 and neurofilament (NF; green) and stained with α-Bgtx (red). Arrows in (H') and (J') indicate NMJs (H') double and single innervated in IC muscles of SMNΔ7 mice treated with (H') saline or (J') AICAR, respectively. (K, L) Percentage of NMJs showing different degrees of maturity (K) assessed by the morphology of postsynaptic site in form of a homogeneous plaque or containing folds, perforations or secondary structure, as depicted in micrograph images shown in (L). (M, N) Number of NMJs exhibiting (M) NF aggregates and (L) terminal nerve sprouts. (O, P) Micrographs depicting representative (O, arrow) NF aggregates and (P, arrow) nerve sprouts in NMJs of IC muscles of SMNΔ7 mice that were analyzed in the different experimental conditions. (Q) Percentage of NMJs showing different intensities of calcitonin gene-related peptide (CGRP) inmunolabeling. (R–U') Representative images showing CGRP-inmunofluorescence [red in (R), (S), (T), and (U)] in NMJs of different experimental conditions; dashed lines delineated NMJs labeled with α-Bgtx [green in (R'), (S'), (T'), and (U')]. In all graphs, values are shown as mean±SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n=75–100 NMJs of IC muscles from 4–5 mice per experimental condition (one-way analysis of variance, Bonferroni's post-hoc test); legends corresponding to different experiment groups shown in graphs are indicated in (A). Scale bars: 10 μm in (C") (applies to B–C"), (E") (applies to D–E"), (J") (applies to G–J"), (L), (O), (P), and (U') (applies to R–U')

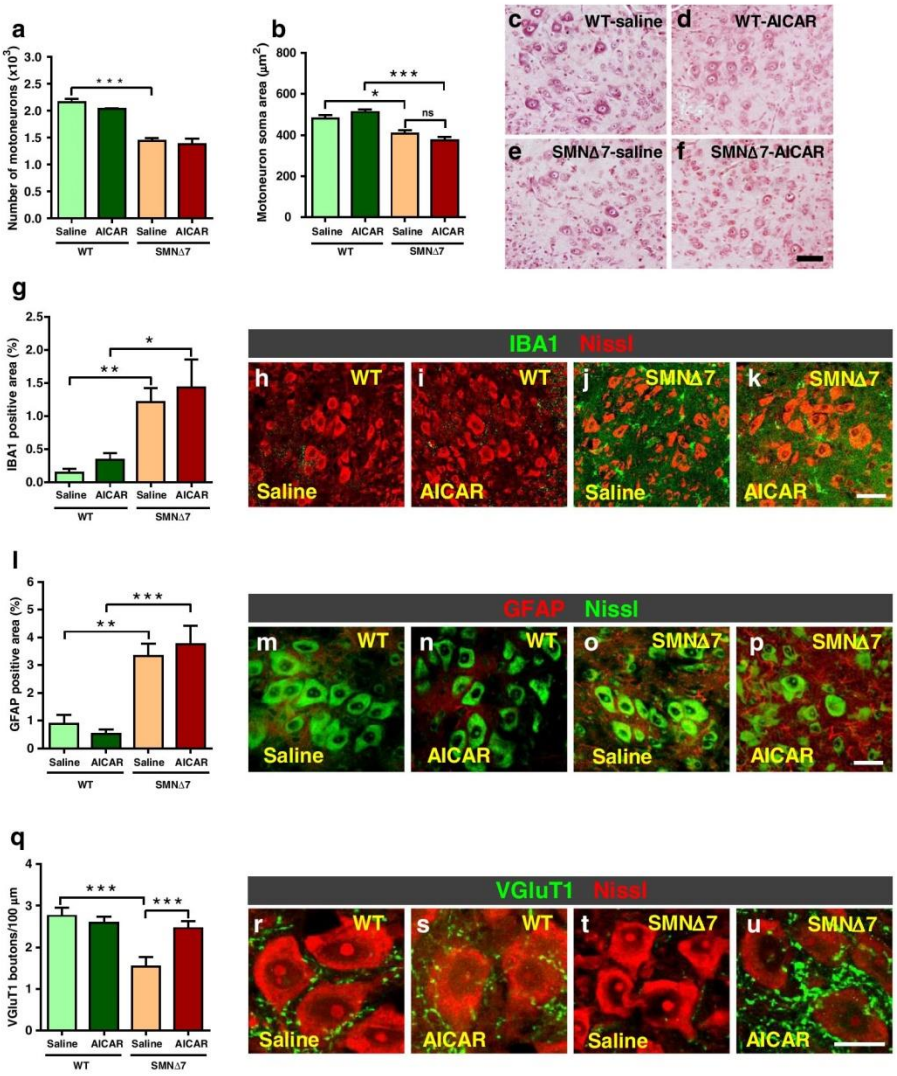


Fig. 5 Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) does not ameliorate motor neuron (MN) degeneration or the microglial and astroglial reaction observed in the spinal cord of $Smn^{-/-}$;$SMN2^{+/+}$;$SMN\Delta7^{+/+}$ (SMNΔ7) mice but prevents the loss of excitatory glutamatergic synaptic inputs linked to spinal muscular atrophy (SMA). (A, B) Number of (A) apparently healthy MNs and (B) area of MN soma in postnatal day (P) 8 wild-type (WT) and SMNΔ7 animals treated with either saline or AICAR. MNs were counted in 5–6 animals per condition; soma area was measured in 120–125 MNs per experimental group. (C–F) Representative micrographs of ventral horn MNs of (C, D) P8 WT and (E, F) SMNΔ7 mice treated with (C, E) saline or (D, F) AICAR; spinal cord paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin. (G–P) AICAR treatment does not ameliorate microgliosis or astrogliosis due to SMA. Graphs in (G) and (L) show the quantification of (L) ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA1)-positive microglial profiles and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astroglia around MNs in the ventral horn of lumbar spinal cord of P8 WT and SMNΔ7 mice treated with saline or AICAR; image analysis was performed in 30–35 spinal cord sections per experimental condition (4–6 animals per each genotype and treatment). Representative images of (H–K, green) IBA1- and (M–P, red) GFAP-immunolabeled profiles around MNs in the spinal cord of mice used for quantification are shown; fluorescent Nissl staining [red in (H–K), and green in (M–P)] was performed to visualize MNs. (Q) Number of vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1)-positive boutons apposed to WT and SMNΔ7 MNs per 100 μm of soma perimeter in the spinal cord of P8 mice after either saline or AICAR injections; counts were performed in 35–45 MNs per mouse (3–4 mice per experimental condition). (R–U) Confocal images of P8 MNs showing glutamatergic inputs labeled with anti-VGluT1 antibody (green); MNs were visualized with fluorescent Nissl stain (red). Values in graphs represent the mean±SEM. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ (one-way analysis of variance, Bonferroni's post-hoc test). Scale bars: 50 μm in (F) (applies to C–F), 60 μm in (K) (applies to H–K); 40 μm in (P) (applies to M–P), and 20 μm in (U) (applies to R–U)

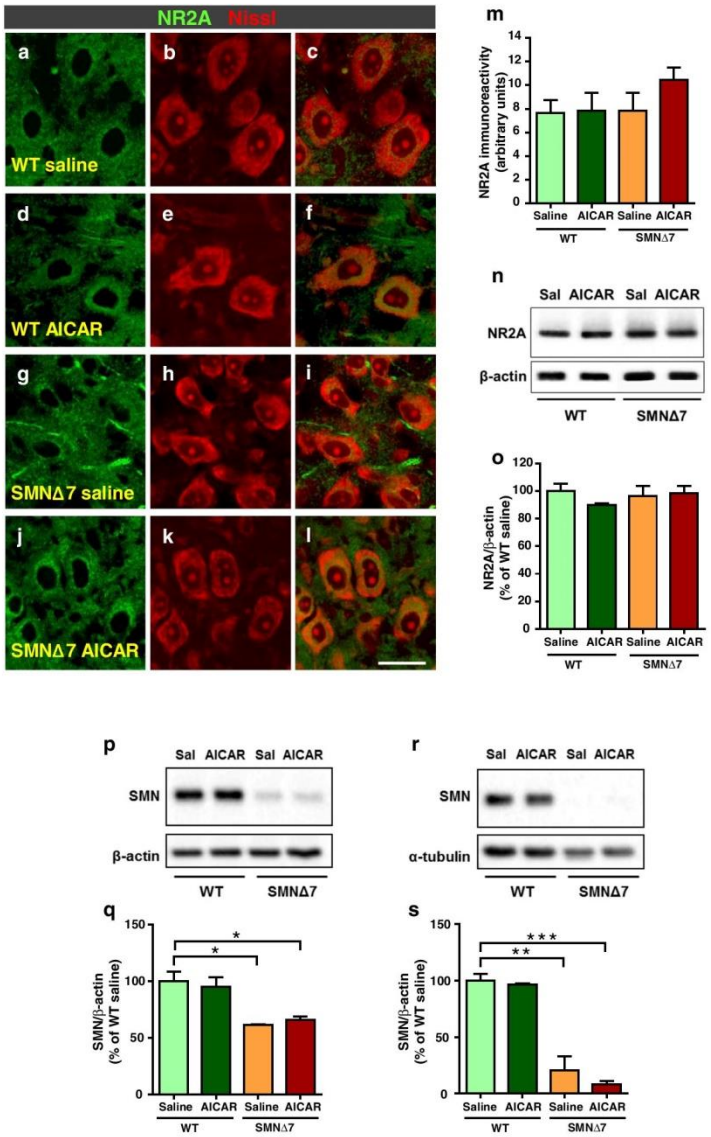


Fig. 6 (A–O) Expression of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor 2A subunit (NR2A) in lumbar spinal cord of postnatal day (P) 8 wild-type (WT) and $Smn^{-/-}$;$SMN2^{+/+}$;$SMN\Delta7^{+/+}$ (SMNΔ7) mice chronically treated with either saline or 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR). (A–L) Representative confocal micrographs of spinal cord cryostat sections from (A–C, G–I) saline- and (D–F, J–L) AICAR-treated (A–F) WT and (G–L) SMNΔ7 mice showing NR2A-immunoreactivity (green) in motor neurons (MNs), visualized with fluorescent Nissl staining (red). (M) Graph showing the quantification NR2A intensity in MN somata of mice subjected to the treatments; 75–85 MNs from 3–4 mice per experimental condition were analyzed. (N) Representative Western blots to determine NR2A expression in spinal cord extracts of mice after different treatments; β-actin was used as loading control. (O) Densitometry analysis of NR2A protein levels in Western blots; data were obtained from 3–4 mice per experimental condition and are expressed as the percentage of change in relation to the ratio of NR2A to β-actin of WT mice treated with saline. (P–S) Western blot assays, performed on (P) lumbar spinal cord and (R) skeletal muscle extracts of P8 WT and SMNΔ7 mice following saline or AICAR treatment, demonstrating no changes in survival of motor neuron (SMN) levels induced by the adenosine monophosphate-activated protein kinase agonist. β-actin and α-tubulin were used as loading controls; each sample corresponds to the spinal cord or muscle extract of one animal. (Q, S) Densitometry analysis of SMN protein levels in Western blots; data were obtained from 3 mice per experimental condition and are expressed as the percentage of change in relation to the ratio of SMN to β-actin or α-tubulin of saline-treated WT mice. Values in graphs are shown as mean± SEM and were analyzed by using one-way analysis of variance (Bonferroni's post-hoc test). Scale bar in (L)=30 μm (applies to A–L)

Treatment with AICAR did not Increase the Expression Level of SMN in the Spinal Cord and Skeletal Muscles of SMNΔ7 Mice

It has been shown that physical exercise exerts its beneficial effects on SMA mice by increasing the amount of exon 7-containing SMN transcripts and, subsequently, the levels of SMN protein in the spinal cord [38]. For this reason, we wanted to determine whether chronic AICAR treatment was able to elevate the expression levels of SMN in the spinal cord and skeletal muscle of SMNΔ7 mice. Western blot analysis of spinal cord and muscle extracts obtained from AICAR-treated SMNΔ7 animals revealed similar low levels of SMN found in diseased animals treated with saline (Fig. 6P–S). Therefore, AICAR does not elicit an increase in SMN protein in SMA.

Discussion

Various studies performed in humans and mouse models suggest that exercise is potentially beneficial in SMA by improving or stabilizing muscle strength and, consequently, motor function [38, 84–86]. In the present study, we examined the effectiveness of the synthetic AMPK agonist AICAR, an exercise mimetic pharmacological compound [50], as a putative therapeutic agent for SMA in a severe model of the disease, the SMNΔ7 mouse. We show here that chronic administration of AICAR, starting on the first day after birth, is capable of ameliorating skeletal muscle atrophy and some structural changes found in NMJs of SMA mice. AICAR is also able to prevent the loss of glutamatergic excitatory synaptic afferents on MNs, but did not prevent MN loss or the microglial and astroglial reaction occurring in the spinal cord in the course of disease. Moreover, AICAR did not improve motor behavior or lifespan of SMNΔ7 mice.

In normal conditions, exercise induces important adaptive changes in the metabolism and gene expression programs of skeletal muscle leading to modifications in its fiber type composition (i.e., type II to type I fiber switch) [71, 87]. AMPK activation appears to play an important role in these muscular changes induced by exercise [45]. AICAR has been reported to be a potent stimulator of AMPK activity in the skeletal muscle [46], and its chronic administration elicits important phenotypic changes in myofibers, such as the shift from a fast (glycolytic) to slow (oxidative) program, which improve exercise performance as demonstrated in distinct animal models (see [44, 88] for reviews). In this respect, AICAR has been shown to increase endurance in the absence of physical exercise [50]. In the present study we noticed only a modest capacity of AICAR to stimulate AMPK activation (evaluated by kinase phosphorylation) in the skeletal muscle of WT mice *in vivo*. This is in contrast to the strong effect of AICAR promoting AMPK activity in C_2C_{12} muscle cells found *in vitro* in a previous study [51]. Although these authors did not examine the activation of AMPK *in vivo*, they reported beneficial effects of AICAR in skeletal muscles of the *mdx* mouse (a model of Duchenne muscular dystrophy) when chronically administered at the same dose, regimen, and mode of injection as used here. Indeed, we found phenotypic changes in the skeletal muscle and NMJ (as discussed below) of SMNΔ7 mice after AICAR administration, suggesting a pharmacological effect of the agent in our model, despite moderate AMPK activation. In fact, it is known that AICAR is not a selective activator of AMPK and can also stimulate other AMP-sensitive enzymes, which play an important role in the regulation of muscle metabolism [89]. Interestingly, we found that muscles from SMNΔ7 mice have a basal increase in AMPK activity that is not significantly modified by AICAR treatment, similar to what has been reported in dystrophic muscles from *mdx* mice [62]. Muscle dysfunction, linked to SMA, could account for the elevated AMPK activity found in our model. According to this possibility, increases in the expression and activity of different kinases have been observed in a variety of muscle pathologies [62, 90–92].

We found that AICAR ameliorates muscular atrophy in SMNΔ7 as a consequence of the increase in myofiber size, which appears to be responsible for the modest increase in body weight of diseased animals treated with the compound. This is in contrast to the absence of changes in the cross-sectional area of myofibers reported in the dystrophic muscle of *mdx* mice following chronic treatment with AICAR [51]. Differences in the physiological and histopathological alterations occurring in muscles affected by SMA and in dystrophic muscles (see, e.g., [93]) could account for the discrepancies existing between these mouse models regarding the effects of AICAR on myofiber size. However, in agreement with findings reported in *mdx* mice [51], we also observed that AICAR increases the proportion of type I slow-twitch myofibers in SMNΔ7 mice. It is important to note that in basal (saline-treated) conditions we observed that muscles from SMNΔ7 mice had a dramatic increase in the proportion of type I fibers in a predominantly fast muscle, the TA. This change could be the consequence of a metabolic oxidative myogenic compensatory program intended to limit muscle dysfunction resulting from the disease. Similar changes in the myofiber typology have been reported in hindlimb muscles other than TA [69]. Type I (slow, oxidative) myofibers, which have slow isoforms of contractile proteins, are more resistant to fatigue than type II (fast, glycolytic) myofibers, and skeletal muscles with a higher content of type I fibers are more resistant to wasting than those with a predominance of type II fibers [64, 94]. As AICAR promotes an oxidative response in skeletal muscle [44], the increase in the proportion of type I fibers in SMA may be beneficial by favoring the oxidative phenotype of myofibers that mitigate the consequences of muscular denervation.

It has been documented that regular physical exercise has a beneficial effect in a mouse model of SMA type II (*Smn*$^{-/-}$;*SMN2*[*2Hung*]$^{+/+}$ mice) by increasing the lifespan, reducing MN degeneration, and limiting the muscular atrophy characteristic of the disease. This therapeutic action has been attributed to the elevation of SMN levels, which appears to be the result of an increase in exon 7-containing SMN transcripts, as has been reported in the spinal cord of SMA-trained mice [38]. In our study, we found that AICAR did not elicit any beneficial effects on MN degeneration or reactive gliosis occurring in spinal cord of SMNΔ7 mice [57], indicating that AICAR is not as effective as physical exercise, in promoting MN survival in SMA affected animals. The absence of changes in SMN protein levels we observed in the spinal cord and skeletal muscle of SMNΔ7 mice after AICAR administration may account for these differences. It is known that the expression of SMN at prenatal and early postnatal stages is crucial for MN survival and the normal development of motor units, as well as for the refinement and maturation of NMJs [95–97]. Although AICAR was not able to promote MN survival in SMA animals, this compound did ameliorate some NMJ alterations linked to the disease. Thus, we observed that AICAR mitigated denervation and favored the maturation of SMA NMJs, as determined by the reduction in polyneuronal innervation and the achievement of a more mature architecture (i.e., pretzel-like morphology) of postsynaptic sites. Moreover, AICAR reduced axonal sprouting observed in NMJs of SMNΔ7 mice. As no elevation in muscle SMN protein levels was found in AICAR-treated SMNΔ7 animals, these beneficial effects on NMJs, which occur in a SMN-independent manner, appear to be a consequence of a direct action of AICAR on skeletal muscle. In fact, it has been shown that AICAR alters the content of different muscle phenotypic modifiers (including the transcriptional coactivator PGC-1α, the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor δ, the nicotinamide adenine dinucleotide-dependent protein deacetylase sirtuin-1, and the receptor-interacting protein 140), which appear to be, at least in part, responsible for AICAR functional improvements on dystrophic muscle [44, 51]. PGC-1α, either directly or through the activation of the neuregulin-1-dependent pathway, induces the transcription of synaptic genes that play a key role in the formation of acetylcholine receptor clusters and NMJ maintenance [98]. PGC-1α expression has been shown to be increased in muscle after physical exercise ([66, 99], see also [100] for a review), and in normal and dystrophic muscles of mice chronically treated with AICAR [50, 51]. The latter results contrast with the absence of a substantial increase in PGC-1α protein content induced by AICAR in our study. The age of the animals and the time frame of AICAR administration could explain the disparity of results; thus, adult animals and longer periods of treatment (~30 days) have been used in the previous studies [50, 51]. In fact, we noticed a moderate increase in PGC-1α band density in muscles from some mice (both WT and SMNΔ7) treated with the compound, although, owing to sample variability, no statistically significant changes were observed when individual data were pooled. However, in agreement with our findings, no changes in PGC-1α mRNA expression have been reported in *mdx* mice subjected to chronic AICAR treatment. Whether the activation of phenotypic modifiers other than PGC-1α or additional mechanisms, such as the expression of neurotrophic factors, are important as mediators of the AICAR actions we describe here, needs further investigation. In this respect, it is well known that exercise induces the expression of several neurotrophic factors including insulin-like growth factor-1, neurotrophin-4, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor that are important in maintaining the integrity of NMJs [100].

MN loss has been considered a histopathological hallmark of human SMA, which has also been found to occur in mouse models of this disease. However, in contrast to the extensive spinal MN loss reported in humans [2], most of the studies performed on SMA mice, including the SMNΔ7 model, have shown that, even at end stages of disease, MN death is modest and does not account for the degree of muscular weakness and paralysis exhibited by these animals [13, 55, 57, 61, 81]. Nevertheless, surviving MNs in SMA mice display alterations indicative of cellular dysfunction, which include the loss of glutamatergic (VGluT1 immunoreactive) synaptic afferents [57, 74, 81–83]. We and others have reported that this glutamatergic deafferentation precedes MN death and begins at prenatal stages in SMNΔ7 animals [57, 83], long before MN loss is observed. However, whether or not MN deafferentation modifies cell death in SMA is not clear, and may, in fact, be a consequence of primary MN pathology [61, 101, 102]. In this regard, it has been recently reported that SMN deficiency results in intrinsic changes in the electrophysiological properties of MNs [103], and that replacement of SMN only in MNs is necessary and sufficient to restore the functional deficits of motor units [104]. These findings suggest that adequate levels of SMN in MNs are crucial to avoid the dysfunction and subsequent degeneration of MNs. Here we show that the loss of VGluT1 synapses on MNs of SMNΔ7 mice can be prevented by chronic AICAR administration. Nevertheless, this improvement in central synaptic connectivity is not sufficient to prevent the progressive MN loss that takes place in the course of the disease. As VGluT1 is expressed in synaptic boutons on MNs mainly derived from proprioceptive sensory axons [105], it is possible that, at least in part, the effect of AICAR in preventing the glutamatergic deafferentation is due to the action of this compound on

skeletal muscle and, particularly, on muscle spindles. In fact, it has been shown that there is a loss of proprioceptive, muscle spindle inputs to MNs, which occurs early in SMA and appears to be secondary to MN dysfunction [83, 102]. Whether AICAR is able to modify muscle spindles in SMNΔ7 requires further detailed studies.

It is important to note that SMA is a complex and multisystemic disorder, although it is phenotypically expressed mainly as a neuromuscular disease [13, 61, 106, 107]. It appears that muscle and nerve may be independently affected by SMN deficiency [17, 107], and muscle has only a minor impact on SMA pathogenesis. Indeed, several studies have reported that improvements in skeletal muscle and NMJ morphology and physiology, after SMN replacement in MNs, do not result in a significant increase in survival [61, 82, 101, 104, 108, 109]. Moreover, it has been recently shown that low levels of SMN in muscle are sufficient for its normal function, and muscular replacement of SMN does not modify the lifespan of SMA [110]. Nevertheless, these results should be interpreted cautiously as a conspicuous myopathy has been reported to occur after deletion of murine *SMN* exon 7 in the skeletal muscle [11]. In any case, an intricate crosstalk between the MN and muscle occurs in normal and pathological conditions. As our results suggest that AICAR mainly targets the muscular side of the system, it would be interesting to examine whether the association of this compound with MN-directed therapies results in a more remarkable benefit in SMA clinical outcome. Perhaps, an AICAR assay in a less severe model of this disease, such as the $Smn^{2B/-}$ mouse [76, 111], may further clarify the benefits of this compound as a muscle-directed therapy in the context of SMA.

Acknowledgments We thank Dr. Ronald W. Oppenheim for critical reading of the manuscript and for helpful comments and suggestions; Dr. Anna Casanovas and Dr. Sara Hernández for useful discussions; and Marta Hereu and Alexandra Eritja for technical assistance. We also thank Javier Sábado, Alba Blasco, and Ariadna Salvador for their help with some experiments of this study. This work was supported by grants from the *Ministerio de Economía y Competitividad* cofinanced by FEDER (SAF2012-31831 to J.C., and SAF2011-22908 to J.E.E.).

References

1. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. Neuromuscul Disord 1991;1:19-29.
2. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 1996;3:97-110.
3. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell 1995;80:155-165.
4. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. Cell 1998;95:615-624.
5. Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G. Molecular functions of the SMN complex. J Child Neurol 2007;22:990-994.
6. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:6307-6011.
7. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat Genet 1997;16:265-269.
8. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. Hum Mol Gen 1997;6:1205-1214.
9. Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? Nat Rev Neurosci 2009;10:597-609.
10. Dombert B, Sivadasan R, Simon CM, Jablonka S, Sendtner M. Presynaptic localization of Smn and hnRNP R in axon terminals of embryonic and postnatal mouse motoneurons. PLoS One 2014;9:e110846.
11. Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. J Cell Biol 2001;152:1107-1114.
12. Arnold AS, Gueye M, Guettier-Sigrist S, et al. Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients. Lab Invest 2004;84:1271-1278.
13. Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, Casanovas A, Calderó J, Esquerda JE. Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. J Neuropathol Exp Neurol 2011;70:444-461.
14. Boyer JG, Deguise MO, Murray LM, et al. Myogenic program dysregulation is contributory to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy. Hum Mol Gen 2014;23:4249-4259.
15. Bricceno KV, Martinez T, Leikina E, et al. Survival motor neuron protein deficiency impairs myotube formation by altering myogenic gene expression and focal adhesion dynamics. Hum Mol Gen 2014;23:4745-4757.
16. Fayzullina S, Martin LJ. Skeletal muscle DNA damage precedes spinal motor neuron DNA damage in a mouse model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). PLoS One 2014;9:e93329.
17. Boyer JG, Ferrier A, Kothary R. More than a bystander: the contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases. Front Physiol 2013;4:356.
18. Pruss RM, Giraudon-Paoli M, Morozova S, Berna P, Abitbol JL, Bordet T. Drug discovery and development for spinal muscular atrophy: lessons from screening approaches and future challenges for clinical development. Future Med Chem 2010;2:1429-1440.
19. Tsai LK. Therapy development for spinal muscular atrophy in SMN independent targets. Neural Plast 2012;2012:456478.
20. Seo J, Howell MD, Singh NN, Singh RN. Spinal muscular atrophy: an update on therapeutic progress. Biochim Biophys Acta 2013;1832:2180-2190.
21. d'Ydewalle C, Sumner CJ. Spinal muscular atrophy therapeutics: where do we stand? Neurotherapeutics 2015;12:303-316.
22. Makhortova NR, Hayhurst M, Cerqueira A, et al. A screen for regulators of survival of motor neuron protein levels. Nat Chem Biol 2011;7:544-552.
23. Chen PC, Gaisina IN, El-Khodor BF, et al. Identification of a maleimide-masked glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitor, BIP-135, that prolongs the median survival time of delta7 SMA KO mouse model of spinal muscular atrophy. ACS Chem Neurosci 2012;3:5-11.
24. Markowitz JA, Singh P, Darras BT. Spinal muscular atrophy: a clinical and research update. Pediatr Neurol 2012;46:1-12.
25. Cherry JJ, Kobayashi DT, Lynes MM, et al. Assays for the identification and prioritization of drug candidates for spinal muscular atrophy. Assay Drug Dev Technol 2014;12:315-341.
26. Iascone DM, Henderson CE, Lee JC. Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies. F1000Prime Rep 2015;7:04.

27. Monani UR, De Vivo DC. Neurodegeneration in spinal muscular atrophy: from disease phenotype and animal models to therapeutic strategies and beyond. Future Neurol 2014;9:49-65.
28. Burghes AH, McGovern VL. Antisense oligonucleotides and spinal muscular atrophy: skipping along. Genes Dev 2010;24:1574-1579.
29. Passini MA, Bu J, Richards AM, et al. Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy. Sci Transl Med 2011;3:72ra18.
30. Rigo F, Hua Y, Krainer AR, Bennett CF. Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy. J Cell Biol 2012;199: 21-25.
31. Douglas AG, Wood MJ. Splicing therapy for neuromuscular disease. Mol Cell Neurosci 2013;56:169-185.
32. Sivanesan S, Howell MD, Didonato CJ, Singh RN. Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy. Transl Neurosci 2013;4.
33. Wyatt TJ, Keirstead HS. Stem cell-derived neurotrophic support for the neuromuscular junction in spinal muscular atrophy. Expert Opin Biol Ther 2010;10:1587-1594.
34. Gowing G, Svendsen CN. Stem cell transplantation for motor neuron disease: current approaches and future perspectives. Neurother 2011;8:591-606.
35. Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT. Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Ann of Neurol 2003;53:804-807.
36. Liebetanz D HK, von Lewinski F, Kahler E, Paulus W. Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurosci 2004;20:3115-3120.
37. Mahoney DJ, Rodriguez C, Devries M, Yasuda N, Tarnopolsky MA. Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 2004;29:656-662.
38. Grondard C, Biondi O, Armand AS, et al. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 2005;25:7615-7622.
39. Biondi O, Grondard C, Lecolle S, et al. Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. J Neurosci 2008;28:953-962.
40. Andreassi C, Patrizi AL, Monani UR, Burghes AH, Brahe C, Eboli ML. Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. Neurogenetics 2002;4:29-36.
41. Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:1150-1155.
42. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. Diabetes 2003;52: 2205-2212.
43. Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. Mol Cell 2001;7:1085-1094.
44. Ljubicic V, Burt M, Jasmin BJ. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. FASEB J 2014;28:548-568.
45. Jorgensen SB, Richter EA, Wojtaszewski JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. J Physiol 2006;574:17-31.
46. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. Am J Physiol 1997;273:E1107-E1112.
47. Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. J Appl Physiol 1999;87:1990-1995.
48. Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. J Appl Physiol 2000;88:2219-2226.
49. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. J Appl Physiol 2011;110:264-274.
50. Narkar VA, Downes M, Yu RT, et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. Cell 2008;134:405-415.
51. Ljubicic V, Miura P, Burt M, et al. Chronic AMPK activation evokes the slow, oxidative myogenic program and triggers beneficial adaptations in mdx mouse skeletal muscle. Hum Mol Gen 2011;20:3478-3493.
52. Bueno Junior CR, Pantaleao LC, Voltarelli VA, Bozi LH, Brum PC, Zatz M. Combined effect of AMPK/PPAR agonists and exercise training in mdx mice functional performance. PLoS One 2012;7:e45699.
53. Jahnke VE, Van Der Meulen JH, Johnston HK, et al. Metabolic remodeling agents show beneficial effects in the dystrophin-deficient mdx mouse model. Skelet Muscle 2012;2:16.
54. Pauly M, Daussin F, Burelle Y, et al. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. Am J Pathol 2012;181:583-592.
55. Le TT, Pham LT, Butchbach ME, et al. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum Mol Gen 2005;14:845-857.
56. Sleigh JN, Gillingwater TH, Talbot K. The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy. Dis Model Mech 2011;4:457-467.
57. Tarabal O, Caraballo-Miralles V, Cardona-Rossinyol A, et al. Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. J Neuropathol Exp Neurol 2014;73:519-535.
58. El-Khodor BF, Edgar N, Chen A, et al. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. Exp Neurol 2008;212:29-43.
59. Clarke PGH, Oppenheim RW. Neuron death in vertebrate development—in-vivo methods. Methods Cell Biol 1995;46:277-321.
60. Calderó J, Ciutat D, Lladó J, Castán E, Oppenheim RW, Esquerda JE. Effects of excitatory amino acids on neuromuscular development in the chick embryo. J Comp Neurol 1997;387:73-95.
61. Gogliotti RG, Quinlan KA, Barlow CB, Heier CR, Heckman CJ, Didonato CJ. Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction. J Neurosci 2012;32: 3818-3829.
62. Ljubicic V, Khogali S, Renaud JM, Jasmin BJ. Chronic AMPK stimulation attenuates adaptive signaling in dystrophic skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 2012;302:C110-C121.
63. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. Biochim Biophys Acta 2011;1813:1269-1278.
64. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev 2011;91:1447-1531.
65. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. FASEB J 2002; 16:1879-1886.
66. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and

peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. Diabetes 2003;52:2874-2881.
67. Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. Biochem Biophys Res Commun 2002;296:350-354.
68. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:12017-12022.
69. Lee YI, Mikesh M, Smith I, Rimer M, Thompson W. Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons. Dev Biol 2011;356:432-444.
70. Kong L, Wang X, Choe DW, et al. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. J Neurosci 2009;29:842-851.
71. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. Microsc Res Tech 2000;50:500-509.
72. Hamalainen N, Pette D. The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit. J Histochem Cytochem 1993;41:733-743.
73. Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, Ko CP. Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. Hum Mol Gen 2012;21:185-195.
74. Ling KK, Lin MY, Zingg B, Feng Z, Ko CP. Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. PLoS One 2010;5:e15457.
75. Murray LM, Comley LH, Thomson D, Parkinson N, Talbot K, Gillingwater TH. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. Hum Mol Gen 2008;17:949-962.
76. Murray LM, Beauvais A, Bhanot K, Kothary R. Defects in neuromuscular junction remodelling in the Smn(2B/–) mouse model of spinal muscular atrophy. Neurobiol Dis 2013;49:57-67.
77. Matteoli M, Balbi S, Sala C, et al. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular-junction. J Mol Neurosci 1990;2:175-184.
78. Sala C, Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T. Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions. J Neurosci 1995;15:520-528.
79. Tarabal O, Calderó J, Esquerda JE. Intramuscular nerve sprouting induced by CNTF is associated with increases in CGRP content in mouse motor nerve terminals. Neurosci Lett 1996;219:60-64.
80. Tarabal O, Calderó J, Ribera J, et al. Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats. Eur J Neurosci 1996;8:829-836.
81. Dachs E, Piedrafita L, Hereu M, Esquerda JE, Calderó J. Chronic treatment with lithium does not improve neuromuscular phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. Neuroscience 2013;250:417-433.
82. Park GH, Maeno-Hikichi Y, Awano T, Landmesser LT, Monani UR. Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene. J Neurosci 2010;30:12005-12019.
83. Mentis GZ, Blivis D, Liu W, et al. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. Neuron 2011;69:453-467.
84. McCartney N, Moroz D, Garner SH, McComas AJ. The effects of strength training in patients with selected neuromuscular disorders. Med Sci Sports Exerc 1988;20:362-368.
85. Lewelt A, Krosschell KJ, Stoddard GJ, et al. Resistance Strength Training Exercise in Children with Spinal Muscular Atrophy. Muscle Nerve 2015;52:559-567.
86. Madsen KL, Hansen RS, Preisler N, Thogersen F, Berthelsen MP, Vissing J. Training improves oxidative capacity, but not function in Spinal Muscular Atrophy Type III. Muscle Nerve 2015;52:240-244.
87. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. Int Rev Cytol 1997;170:143-223.
88. Ljubicic V, Jasmin BJ. AMP-activated protein kinase at the nexus of therapeutic skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy. Trends Mol Med 2013;19:614-624.
89. Witczak CA, Sharoff CG, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. Cell Mol Life Sci 2008;65:3737-3755.
90. Mylabathula DB, Rice KM, Wang Z, Uddemarri S, Kinnard RS, Blough ER. Age-associated changes in MAPK activation in fast- and slow-twitch skeletal muscle of the F344/NNiaHSD X Brown Norway/BiNia rat model. Exp Gerontol 2006;41:205-214.
91. Singh R, Millman G, Turin E, et al. Increases in nuclear p65 activation in dystrophic skeletal muscle are secondary to increases in the cellular expression of p65 and are not solely produced by increases in IkappaB-alpha kinase activity. J Neurol Sci 2009;285:159-171.
92. Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, et al. AMP-activated protein kinase response to contractions and treatment with the AMPK activator AICAR in young adult and old skeletal muscle. Journal Physiol 2009;587:2077-2086.
93. Dubowitz V, Sewry CA. Muscle biopsy: a practical approach. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2007.
94. Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJ, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MK. Skeletal muscle wasting and contractile performance in septic rats. Muscle Nerve 2005;31:339-348.
95. Le TT, McGovern VL, Alwine IE, et al. Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice. Hum Mol Gen 2011;20:3578-3591.
96. Lutz CM, Kariya S, Patruni S, et al. Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. J Clin Invest 2011;121:3029-3041.
97. Kariya S, Obis T, Garone C, et al. Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation. J Clin Invest 2014;124:785-800.
98. Handschin C, Kobayashi YM, Chin S, Seale P, Campbell KP, Spiegelman BM. PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. Genes Dev 2007;21:770-783.
99. Goto M, Terada S, Kato M, et al. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. Biochem Biophys Res Commun 2000;274:350-354.
100. Nishimune H, Stanford JA, Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. Muscle Nerve 2014;49:315-324.
101. Martinez TL, Kong L, Wang X, et al. Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. J Neurosci 2012;32:8703-8715.
102. Thirumalai V, Behrend RM, Birineni S, Liu W, Blivis D, O'Donovan MJ. Preservation of VGLUT1 synapses on ventral calbindin-immunoreactive interneurons and normal locomotor function in a mouse model of spinal muscular atrophy. J Neurophysiol 2013;109:702-710.
103. Liu H, Lu J, Chen H, Du Z, Li XJ, Zhang S. Spinal muscular atrophy patient-derived motor neurons exhibit hyperexcitability. Sci Rep 2015;5:12189.

104. McGovern VL, Iyer CC, Arnold WD, et al. SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMNDelta7 mouse model of SMA. Hum Mol Genet 2015;24:5524-5541.
105. Alvarez FJ, Titus-Mitchell HE, Bullinger KL, Kraszpulski M, Nardelli P, Cope TC. Permanent central synaptic disconnection of proprioceptors after nerve injury and regeneration. I. Loss of VGLUT1/IA synapses on motoneurons. J Neurophysiol 2011;106:2450-2470.
106. Schreml J, Riessland M, Paterno M, et al. Severe SMA mice show organ impairment that cannot be rescued by therapy with the HDACi JNJ-26481585. Eur J Hum Gen 2013;21:643-652.
107. Hamilton G, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron. Trends Mol Med 2013;19:40-50.
108. Lee AJ, Awano T, Park GH, Monani UR. Limited phenotypic effects of selectively augmenting the SMN protein in the neurons of a mouse model of severe spinal muscular atrophy. PLoS One 2012;7:e46353.
109. Paez-Colasante X, Seaberg B, Martinez TL, Kong L, Sumner CJ, Rimer, M. Improvement of neuromuscular synaptic phenotypes without enhanced survival and motor function in severe spinal muscular atrophy mice selectively rescued in motor neurons. PLoS One 2013;8:e75866.
110. Iyer CC, McGovern VL, Murray JD, et al. Low levels of Survival Motor Neuron protein are sufficient for normal muscle function in the SMNDelta7 mouse model of SMA. Hum Mol Genet 2015;24:6160-6173.
111. Bowerman M, Murray LM, Beauvais A, Pinheiro B, Kothary R. A critical smn threshold in mice dictates onset of an intermediate spinal muscular atrophy phenotype associated with a distinct neuromuscular junction pathology. Neuromuscul Disord 2012;22:263-276.

XIII. REFERÈNCIES

1. Werdnig, G., *Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber anf neurotischer Grundlage.* Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten, 1891. **22**(2): p. 437-480.
2. Hoffmann, J., *Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis.* Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde, 1893. **3**(6): p. 427-470.
3. Prior, T.W., et al., *Newborn and Carrier Screening for Spinal Muscular Atrophy.* American Journal of Medical Genetics Part A, 2010. **152A**(7): p. 1608-1616.
4. Sugarman, E.A., et al., *Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72,400 specimens.* Eur J Hum Genet, 2012. **20**(1): p. 27-32.
5. Wirth, B., L. Brichta, and E. Hahnen, *Spinal muscular atrophy: from gene to therapy.* Semin Pediatr Neurol, 2006. **13**(2): p. 121-31.
6. Montes, J., et al., *Clinical outcome measures in spinal muscular atrophy.* J Child Neurol, 2009. **24**(8): p. 968-78.
7. Talbot, K., *Spinal muscular atrophy.* J Inherit Metab Dis, 1999. **22**(4): p. 545-54.
8. Lunn, M.R. and C.H. Wang, *Spinal muscular atrophy.* The Lancet, 2008. **371**(9630): p. 2120-2133.
9. Dubowitz, V., *Chaos in the classification of SMA: a possible resolution.* Neuromuscul Disord, 1995. **5**(1): p. 3-5.
10. Wang, C.H., et al., *Consensus statement on standard of care for congenital myopathies.* J Child Neurol, 2012. **27**(3): p. 363-82.
11. Swoboda, K.J., et al., *Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function.* Ann Neurol, 2005. **57**(5): p. 704-12.
12. Markowitz, J.A., M.B. Tinkle, and K.H. Fischbeck, *Spinal muscular atrophy in the neonate.* J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 2004. **33**(1): p. 12-20.
13. Pearn, J.H., P. Hudgson, and J.N. Walton, *A Clinical and Genetic Study of Spinal Muscular Atrophy of Adult Onset: The Autosomal Recessive Form as a Discrete Disease Entity.* Brain, 1978. **101**(4): p. 591-606.
14. MacLeod, M.J., et al., *Prenatal onset spinal muscular atrophy.* Eur J Paediatr Neurol, 1999. **3**(2): p. 65-72.
15. Kelly, T.E., et al., *Spinal muscular atrophy variant with congenital fractures.* Am J Med Genet, 1999. **87**(1): p. 65-8.
16. Felderhoff-Mueser, U., et al., *Severe spinal muscular atrophy variant associated with congenital bone fractures.* J Child Neurol, 2002. **17**(9): p. 718-21.
17. Menke, L.A., et al., *Congenital heart defects in spinal muscular atrophy type I: a clinical report of two siblings and a review of the literature.* Am J Med Genet A, 2008. **146A**(6): p. 740-4.
18. Rudnik-Schoneborn, S., et al., *Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy.* Journal of Medical Genetics, 2008. **45**(10): p. 635-638.
19. Monani, U.R. and D.C. De Vivo, *Neurodegeneration in spinal muscular atrophy: from disease phenotype and animal models to therapeutic strategies and beyond.* Future Neurol, 2014. **9**(1): p. 49-65.

20. Wirth, B., *Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives.* Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2002. **3**(2): p. 87-95.

21. Zerres, K. and S. Rudnikschoneborn, *Natural-History in Proximal Spinal Muscular-Atrophy - Clinical Analysis of 445 Patients and Suggestions for a Modification of Existing Classifications.* Archives of Neurology, 1995. **52**(5): p. 518-523.

22. Melki, J., et al., *Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q.* Nature, 1990. **344**(6268): p. 767-8.

23. Brzustowicz, L.M., et al., *Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3.* Nature, 1990. **344**(6266): p. 540-1.

24. Melki, J., et al., *Refined linkage map of chromosome 5 in the region of the spinal muscular atrophy gene.* Genomics, 1993. **15**(3): p. 521-4.

25. Didonato, C.J., et al., *Association between Ag1-Ca Alleles and Severity of Autosomal Recessive Proximal Spinal Muscular-Atrophy.* American Journal of Human Genetics, 1994. **55**(6): p. 1218-1229.

26. Melki, J., et al., *De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies.* Science, 1994. **264**(5164): p. 1474-7.

27. Soares, V.M., et al., *Refinement of the Spinal Muscular-Atrophy Locus to the Interval between D5s435 and Map1b.* Genomics, 1993. **15**(2): p. 365-371.

28. Wirth, B., et al., *Large Linkage Analysis in 100 Families with Autosomal Recessive Spinal Muscular-Atrophy (Sma) and 11 Ceph Families Using 15 Polymorphic Loci in the Region 5q11.2-Q13.3.* Genomics, 1994. **20**(1): p. 84-93.

29. Wirth, B., et al., *Mapping of the spinal muscular atrophy (SMA) gene to a 750-kb interval flanked by two new microsatellites.* Eur J Hum Genet, 1995. **3**(1): p. 56-60.

30. Lefebvre, S., et al., *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.* Cell, 1995. **80**(1): p. 155-65.

31. Burglen, L., et al., *sStructure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene.* Genomics, 1996. **32**(3): p. 479-82.

32. Chen, Q., et al., *Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP.* Genomics, 1998. **48**(1): p. 121-7.

33. Coovert, D.D., et al., *The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 1997. **6**(8): p. 1205-14.

34. Lefebvre, S., et al., *Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy.* Nature Genetics, 1997. **16**(3): p. 265-269.

35. Schrank, B., et al., *Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9920-5.

36. Miguel-Aliaga, I., et al., *The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability.* Human Molecular Genetics, 1999. **8**(12): p. 2133-2143.

37. Paushkin, S., et al., *The survival motor neuron protein of Schizosacharomyces pombe. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms.* J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23841-6.

38. Rochette, C.F., N. Gilbert, and L.R. Simard, *SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens.* Human Genetics, 2001. **108**(3): p. 255-266.

39. Hahnen, E., et al., *Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals.* Hum Mol Genet, 1995. **4**(10): p. 1927-33.

40. Wirth, B., *An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA).* Hum Mutat, 2000. **15**(3): p. 228-37.

41. Cartegni, L. and A.R. Krainer, *Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1.* Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 377-84.

42. Kashima, T. and J.L. Manley, *A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy.* Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 460-3.

43. Lorson, C.L., et al., *A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(11): p. 6307-6311.

44. Lorson, C.L. and E.J. Androphy, *An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN.* Human Molecular Genetics, 2000. **9**(2): p. 259-266.

45. Lorson, C.L., et al., *SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity.* Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 63-6.

46. Burghes, A.H. and C.E. Beattie, *Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?* Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(8): p. 597-609.

47. Mailman, M.D., et al., *Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2.* Genet Med, 2002. **4**(1): p. 20-6.

48. Prior, T.W., et al., *Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2.* Am J Med Genet A, 2004. **130A**(3): p. 307-10.

49. Monani, U.R., *Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease.* Neuron, 2005. **48**(6): p. 885-96.

50. Liu, Q. and G. Dreyfuss, *A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein.* EMBO J, 1996. **15**(14): p. 3555-65.

51. Burlet, P., et al., *The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 1998. **7**(12): p. 1927-33.

52. Fakan, S., G. Leser, and T.E. Martin, *Ultrastructural Distribution of Nuclear Ribonucleoproteins as Visualized by Immunocytochemistry on Thin-Sections.* Journal of Cell Biology, 1984. **98**(1): p. 358-363.

53. Cauchi, R.J., *SMN and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN.* Bioessays, 2010. **32**(12): p. 1077-89.

54. Coady, T.H. and C.L. Lorson, *SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis.* Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna, 2011. **2**(4): p. 546-564.

55. Pellizzoni, L., B. Charroux, and G. Dreyfuss, *SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11167-72.

56. Wan, L., et al., *Inactivation of the SMN complex by oxidative stress.* Mol Cell, 2008. **31**(2): p. 244-54.

57. Raker, V.A., et al., *Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6554-65.

58. Gubitz, A.K., W. Feng, and G. Dreyfuss, *The SMN complex.* Exp Cell Res, 2004. **296**(1): p. 51-6.

59. Gabanella, F., et al., *The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation.* Human Molecular Genetics, 2005. **14**(23): p. 3629-3642.

60. Fischer, U., C. Englbrecht, and A. Chari, *Biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. **2**(5): p. 718-31.

61. Zhang, Z., et al., *SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing.* Cell, 2008. **133**(4): p. 585-600.

62. Boulisfane, N., et al., *Impaired minor tri-snRNP assembly generates differential splicing defects of U12-type introns in lymphoblasts derived from a type I SMA patient.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(4): p. 641-8.

63. Lotti, F., et al., *An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function.* Cell, 2012. **151**(2): p. 440-54.

64. Pellizzoni, L., et al., *A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II.* Journal of Cell Biology, 2001. **152**(1): p. 75-85.

65. Williams, B.Y., S.L. Hamilton, and H.K. Sarkar, *The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain.* FEBS Lett, 2000. **470**(2): p. 207-10.

66. Zou, J., et al., *Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A.* J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14922-8.

67. Yang, L., et al., *An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B.* Biochem J, 2003. **369**(Pt 3): p. 651-7.

68. MacKenzie, A.E. and N.H. Gendron, *Tudor reign.* Nat Struct Biol, 2001. **8**(1): p. 13-5.

69. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.* Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.

70. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death.* Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.

71. Oppenheim, R.W., *Cell death during development of the nervous system.* Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 453-501.

72. Anderton, R.S., et al., *Spinal muscular atrophy and the antiapoptotic role of survival of motor neuron (SMN) protein.* Mol Neurobiol, 2013. **47**(2): p. 821-32.

73. Simic, G., et al., *Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(5): p. 398-407.

74. Soler-Botija, C., et al., *Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord.* Brain, 2002. **125**: p. 1624-1634.

75. Tsai, M.S., et al., *Abolishing Bax-dependent apoptosis shows beneficial effects on spinal muscular atrophy model mice.* Molecular Therapy, 2006. **13**(6): p. 1149-1155.

76. Tsai, M.S., et al., *Abolishing Trp53-dependent apoptosis does not benefit spinal muscular atrophy model mice.* Eur J Hum Genet, 2006. **14**(3): p. 372-5.

77. Vyas, S., et al., *Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(22): p. 2751-64.

78. Parker, G.C., et al., *Survival motor neuron protein regulates apoptosis in an in vitro model of spinal muscular atrophy.* Neurotox Res, 2008. **13**(1): p. 39-48.

79. Anderton, R.S., et al., *Survival of motor neuron protein over-expression prevents calpain-mediated cleavage and activation of procaspase-3 in differentiated human SH-SY5Y cells.* Neuroscience, 2011. **181**: p. 226-33.

80. Burlacu, A., *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins.* J Cell Mol Med, 2003. **7**(3): p. 249-57.

81. Gangwani, L., et al., *Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 376-83.

82. Young, P.J., et al., *A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(4): p. 2852-2859.

83. Kesari, A., et al., *Study of survival of motor neuron (SMN) and neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) gene deletions in SMA patients.* J Neurol, 2005. **252**(6): p. 667-71.

84. Khandjian, E.W., et al., *Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13357-62.

85. Bechara, E., et al., *Fragile X related protein 1 isoforms differentially modulate the affinity of fragile X mental retardation protein for G-quartet RNA structure.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(1): p. 299-306.

86. Wang, T., S.M. Bray, and S.T. Warren, *New perspectives on the biology of fragile X syndrome.* Curr Opin Genet Dev, 2012. **22**(3): p. 256-63.

87. Darnell, J.C. and J.D. Richter, *Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(8): p. a012344.

88. Khusial, P., R. Plaag, and G.W. Zieve, *LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs.* Trends in Biochemical Sciences, 2005. **30**(9): p. 522-528.

89. Galao, R.P., et al., *LSm1-7 complexes bind to specific sites in viral RNA genomes and regulate their translation and replication.* Rna-a Publication of the Rna Society, 2010. **16**(4): p. 817-827.

90. Sanchez, G., et al., *A novel function for the survival motoneuron protein as a translational regulator.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(4): p. 668-84.

91. Nover, L., K.D. Scharf, and D. Neumann, *Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(3): p. 1298-308.

92. Clemens, M.J., *Translational regulation in cell stress and apoptosis. Roles of the eIF4E binding proteins.* J Cell Mol Med, 2001. **5**(3): p. 221-39.

93. Hua, Y. and J. Zhou, *Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules.* FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 69-74.

94. Zou, T., et al., *SMN deficiency reduces cellular ability to form stress granules, sensitizing cells to stress.* Cell Mol Neurobiol, 2011. **31**(4): p. 541-50.

95. Gabanella, F., et al., *Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs.* PLoS One, 2007. **2**(9): p. e921.

96. Ruggiu, M., et al., *A role for SMN exon 7 splicing in the selective vulnerability of motor neurons in spinal muscular atrophy.* Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 126-38.

97. Setola, V., et al., *Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(6): p. 1959-1964.

98. Fan, L. and L.R. Simard, *Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(14): p. 1605-14.

99. Zhang, H.L., et al., *Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization.* J Neurosci, 2003. **23**(16): p. 6627-37.

100. van Bergeijk, J., et al., *The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus.* FASEB J, 2007. **21**(7): p. 1492-502.

101. Bowerman, M., D. Shafey, and R. Kothary, *Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity.* J Mol Neurosci, 2007. **32**(2): p. 120-31.

102. Oprea, G.E., et al., *Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy.* Science, 2008. **320**(5875): p. 524-527.

103. Wen, H.L., et al., *Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy(dagger).* Human Molecular Genetics, 2010. **19**(9): p. 1766-1778.

104. Zhang, H., et al., *Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons.* J Neurosci, 2006. **26**(33): p. 8622-32.

105. Hubers, L., et al., *HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects.* Human Molecular Genetics, 2011. **20**(3): p. 553-579.

106. Fallini, C., et al., *The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons.* J Neurosci, 2011. **31**(10): p. 3914-25.

107. Rossoll, W., et al., *Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons.* J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 801-12.

108. Fallini, C., G.J. Bassell, and W. Rossoll, *Spinal muscular atrophy: the role of SMN in axonal mRNA regulation.* Brain Res, 2012. **1462**: p. 81-92.

109. Bradley, W.G., *Recent views on amyotrophic lateral sclerosis with emphasis on electrophysiological studies.* Muscle Nerve, 1987. **10**(6): p. 490-502.

110. Conwit, R.A., et al., *The relationship of motor unit size, firing rate and force.* Clin Neurophysiol, 1999. **110**(7): p. 1270-5.

111. Mescher, A., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 13th Edition ed. 2013: McGraw-Hill Medical.

112. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Development of the vertebrate neuromuscular junction.* Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 389-442.

113. Witzemann, V., *Development of the neuromuscular junction.* Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 263-71.

114. Marques, M.J., J.A. Conchello, and J.W. Lichtman, *From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction.* Journal of Neuroscience, 2000. **20**(10): p. 3663-3675.

115. Gogliotti, R.G., et al., *Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction.* J Neurosci, 2012. **32**(11): p. 3818-29.

116. Lichtman, J.W. and H. Colman, *Synapse elimination and indelible memory.* Neuron, 2000. **25**(2): p. 269-78.

117. Kariya, S., et al., *Requirement of enhanced Survival Motoneuron protein imposed during neuromuscular junction maturation.* J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 785-800.

118. Mishra, V.N., et al., *A clinical and genetic study of spinal muscular atrophy.* Electromyogr Clin Neurophysiol, 2004. **44**(5): p. 307-12.

119. Cifuentes-Diaz, C., et al., *Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model.* Human Molecular Genetics, 2002. **11**(12): p. 1439-1447.

120. Murray, L.M., et al., *Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy.* Human Molecular Genetics, 2008. **17**(7): p. 949-962.

121. Kariya, S., et al., *Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(16): p. 2552-69.

122. Dachs, E., et al., *Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy.* J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(6): p. 444-61.

123. Kong, L., et al., *Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice.* J Neurosci, 2009. **29**(3): p. 842-51.

124. Biondi, O., et al., *Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse.* J Neurosci, 2008. **28**(4): p. 953-62.

125. Martinez-Hernandez, R., et al., *Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development.* J Pathol, 2013. **229**(1): p. 49-61.

126. Dombert, B., et al., *Presynaptic Localization of Smn and hnRNP R in Axon Terminals of Embryonic and Postnatal Mouse Motoneurons.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110846.

127. Greensmith, L. and G. Vrbova, *Disturbances of neuromuscular interaction may contribute to muscle weakness in spinal muscular atrophy.* Neuromuscular Disorders, 1997. **7**(6-7): p. 369-372.

128. Walker, M.P., et al., *SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain.* Human Molecular Genetics, 2008. **17**(21): p. 3399-3410.

129. Lee, Y.I., et al., *Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons.* Dev Biol, 2011. **356**(2): p. 432-44.

130. Martinez-Hernandez, R., et al., *The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation.* J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(5): p. 474-81.

131. Stevens, L., et al., *Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2008. **34**(6): p. 659-70.

132. Mutsaers, C.A., et al., *Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy.* Human Molecular Genetics, 2011. **20**(22): p. 4334-4344.

133. Boyer, J.G., et al., *Early onset muscle weakness and disruption of muscle proteins in mouse models of spinal muscular atrophy.* Skelet Muscle, 2013. **3**(1): p. 24.

134. Fayzullina, S. and L.J. Martin, *Skeletal muscle DNA damage precedes spinal motor neuron DNA damage in a mouse model of Spinal Muscular Atrophy (SMA).* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93329.

135. Bricceno, K.V., et al., *Survival motor neuron protein deficiency impairs myotube formation by altering myogenic gene expression and focal adhesion dynamics.* Hum Mol Genet, 2014. **23**(18): p. 4745-57.

136. Rajendra, T.K., et al., *A Drosophila melanogaster model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle.* J Cell Biol, 2007. **176**(6): p. 831-41.

137. Shafey, D., P.D. Cote, and R. Kothary, *Hypomorphic Smn knockdown C2C12 myoblasts reveal intrinsic defects in myoblast fusion and myotube morphology.* Exp Cell Res, 2005. **311**(1): p. 49-61.

138. Boyer, J.G., et al., *Myogenic program dysregulation is contributory to disease pathogenesis in spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2014. **23**(16): p. 4249-59.

139. Arnold, A.S., et al., *Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients.* Lab Invest, 2004. **84**(10): p. 1271-8.

140. Hayhurst, M., et al., *A cell-autonomous defect in skeletal muscle satellite cells expressing low levels of survival of motor neuron protein.* Dev Biol, 2012. **368**(2): p. 323-34.

141. Hunter, G., et al., *SMN-dependent intrinsic defects in Schwann cells in mouse models of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2014. **23**(9): p. 2235-50.

142. Boyer, J.G., A. Ferrier, and R. Kothary, *More than a bystander: the contributions of intrinsic skeletal muscle defects in motor neuron diseases.* Front Physiol, 2013. **4**: p. 356.

143. Briese, M., et al., *Deletion of smn-1, the Caenorhabditis elegans ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(1): p. 97-104.

144. Chang, H.C., et al., *Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila.* PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3209.

145. Dimitriadi, M., et al., *Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects.* Plos Genetics, 2010. **6**(10).

146. McWhorter, M.L., et al., *Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding.* J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 919-31.

147. Boon, K.L., et al., *Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(19): p. 3615-25.

148. Ymlahi-Ouazzani, Q., et al., *Reduced levels of survival motor neuron protein leads to aberrant motoneuron growth in a Xenopus model of muscular atrophy.* Neurogenetics, 2010. **11**(1): p. 27-40.

149. Winkler, C., et al., *Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy.* Genes Dev, 2005. **19**(19): p. 2320-30.

150. Edens, B.M., et al., *Molecular mechanisms and animal models of spinal muscular atrophy.* Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(4): p. 685-92.

151. DiDonato, C.J., et al., *Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene.* Genome Res, 1997. **7**(4): p. 339-52.

152. Hsieh-Li, H.M., et al., *A mouse model for spinal muscular atrophy.* Nature Genetics, 2000. **24**(1): p. 66-70.

153. Monani, U.R., et al., *The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy.* Human Molecular Genetics, 2000. **9**(3): p. 333-339.

154. Le, T.T., et al., *SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(6): p. 845-57.

155. McGovern, V.L., et al., *Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(18): p. 2900-9.

156. Torres-Benito, L., et al., *SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals.* PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26164.

157. Sleigh, J.N., T.H. Gillingwater, and K. Talbot, *The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy.* Dis Model Mech, 2011. **4**(4): p. 457-67.

158. Bowerman, M., et al., *A critical smn threshold in mice dictates onset of an intermediate spinal muscular atrophy phenotype associated with a distinct neuromuscular junction pathology.* Neuromuscul Disord, 2012. **22**(3): p. 263-76.

159. DiDonato, C.J., et al., *Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying Smn exon 7 splicing.* Hum Mol Genet, 2001. **10**(23): p. 2727-36.

160. Hammond, S.M., et al., *Mouse survival motor neuron alleles that mimic SMN2 splicing and are inducible rescue embryonic lethality early in development but not late.* PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15887.

161. Crawford, T.O. and C.A. Pardo, *The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy.* Neurobiol Dis, 1996. **3**(2): p. 97-110.

162. Conforti, L., R. Adalbert, and M.P. Coleman, *Neuronal death: where does the end begin?* Trends in Neurosciences, 2007. **30**(4): p. 159-166.

163. Park, G.H., et al., *Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene.* J Neurosci, 2010. **30**(36): p. 12005-19.

164. Martinez, T.L., et al., *Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy.* J Neurosci, 2012. **32**(25): p. 8703-15.

165. Cifuentes-Diaz, C., et al., *Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy.* J Cell Biol, 2001. **152**(5): p. 1107-14.

166. Iyer, C.C., et al., *Low levels of Survival Motor Neuron protein are sufficient for normal muscle function in the SMNDelta7 mouse model of SMA.* Hum Mol Genet, 2015.

167. Gavrilina, T.O., et al., *Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(8): p. 1063-75.

168. Ito, Y., et al., *Thalamic lesions in a long-surviving child with spinal muscular atrophy type I: MRI and EEG findings.* Brain Dev, 2004. **26**(1): p. 53-6.

169. Shishikura, K., et al., *A neuropathologic study of Werdnig-Hoffmann disease with special reference to the thalamus and posterior roots.* Acta Neuropathol, 1983. **60**(1-2): p. 99-106.

170. d'Errico, P., et al., *Selective vulnerability of spinal and cortical motor neuron subpopulations in delta7 SMA mice.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82654.

171. Wishart, T.M., et al., *SMN deficiency disrupts brain development in a mouse model of severe spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(21): p. 4216-28.

172. Rudnik-Schoneborn, S., et al., *Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy.* Neurology, 2003. **60**(6): p. 983-7.

173. Jablonka, S., et al., *Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(3): p. 511-8.

174. Ling, K.K., et al., *Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy.* PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15457.

175. Mentis, G.Z., et al., *Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Neuron, 2011. **69**(3): p. 453-67.

176. Tarabal, O., et al., *Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Neuropathol Exp Neurol, 2014. **73**(6): p. 519-35.

177. Imlach, W.L., et al., *SMN is required for sensory-motor circuit function in Drosophila.* Cell, 2012. **151**(2): p. 427-39.

178. Lewelt, A., T.M. Newcomb, and K.J. Swoboda, *New therapeutic approaches to spinal muscular atrophy.* Curr Neurol Neurosci Rep, 2012. **12**(1): p. 42-53.

179. Wang, D.D. and A. Bordey, *The astrocyte odyssey.* Prog Neurobiol, 2008. **86**(4): p. 342-67.

180. Chung, W.S., et al., *Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease?* Nat Neurosci, 2015. **18**(11): p. 1539-45.

181. Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, *Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 119-45.

182. McGivern, J.V., et al., *Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production.* Glia, 2013. **61**(9): p. 1418-28.

183. McGovern, V.L., et al., *SMN expression is required in motor neurons to rescue electrophysiological deficits in the SMNDelta7 mouse model of SMA.* Hum Mol Genet, 2015. **24**(19): p. 5524-41.

184. Rindt, H., et al., *Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2015. **24**(14): p. 4094-102.

185. Heier, C.R. and C.J. DiDonato, *Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(7): p. 1310-22.

186. Bevan, A.K., et al., *Early heart failure in the SMNDelta7 model of spinal muscular atrophy and correction by postnatal scAAV9-SMN delivery.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 3895-905.

187. Schreml, J., et al., *Severe SMA mice show organ impairment that cannot be rescued by therapy with the HDACi JNJ-26481585.* Eur J Hum Genet, 2013. **21**(6): p. 643-52.

188. Shababi, M., et al., *Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 4059-71.

189. Heier, C.R., et al., *Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(20): p. 3906-18.

190. Shababi, M., et al., *Partial restoration of cardio-vascular defects in a rescued severe model of spinal muscular atrophy.* J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(5): p. 1074-82.

191. Bowerman, M., et al., *Glucose metabolism and pancreatic defects in spinal muscular atrophy.* Ann Neurol, 2012. **72**(2): p. 256-68.

192. LaMarca, N.H., et al., *Diabetic Ketoacidosis in an Adult Patient With Spinal Muscular Atrophy Type II: Further Evidence of Extraneural Pathology Due to Survival Motor Neuron 1 Mutation?* Journal of Child Neurology, 2012. **28**(11): p. 1517-1520.

193. Vitte, J.M., et al., *Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload.* Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1731-41.

194. Hua, Y.M., et al., *Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model.* Nature, 2011. **478**(7367): p. 123-126.

195. Le, T.T., et al., *Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(18): p. 3578-91.

196. Araujo, A., M. Araujo, and K.J. Swoboda, *Vascular perfusion abnormalities in infants with spinal muscular atrophy.* J Pediatr, 2009. **155**(2): p. 292-4.

197. Rudnik-Schoneborn, S., et al., *Digital necroses and vascular thrombosis in severe spinal muscular atrophy.* Muscle Nerve, 2010. **42**(1): p. 144-7.

198. Foust, K.D., et al., *Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(3): p. 271-4.

199. Narver, H.L., et al., *Sustained improvement of spinal muscular atrophy mice treated with trichostatin A plus nutrition.* Ann Neurol, 2008. **64**(4): p. 465-70.

200. Valori, C.F., et al., *Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy.* Sci Transl Med, 2010. **2**(35): p. 35ra42.

201. Shanmugarajan, S., et al., *Congenital bone fractures in spinal muscular atrophy: functional role for SMN protein in bone remodeling.* J Child Neurol, 2007. **22**(8): p. 967-73.

202. Shanmugarajan, S., et al., *Bone loss in survival motor neuron (Smn(-/-) SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy.* J Pathol, 2009. **219**(1): p. 52-60.

203. Hamilton, G. and T.H. Gillingwater, *Spinal muscular atrophy: going beyond the motor neuron.* Trends Mol Med, 2013. **19**(1): p. 40-50.

204. Lorson, C.L., H. Rindt, and M. Shababi, *Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(R1): p. R111-8.

205. Nurputra, D.K., et al., *Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials.* Ann Hum Genet, 2013. **77**(5): p. 435-63.

206. Riessland, M., et al., *The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells.* Human Genetics, 2006. **120**(1): p. 101-110.

207. Garbes, L., et al., *LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate.* Human Molecular Genetics, 2009. **18**(19): p. 3645-3658.

208. Chang, J.G., et al., *Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9808-13.

209. Andreassi, C., et al., *Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy.* Eur J Hum Genet, 2004. **12**(1): p. 59-65.

210. Riessland, M., et al., *SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(8): p. 1492-506.

211. Avila, A.M., et al., *Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 659-71.

212. Sumner, C.J., et al., *Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells.* Ann Neurol, 2003. **54**(5): p. 647-54.

213. Mercuri, E., et al., *Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy.* Neuromuscul Disord, 2004. **14**(2): p. 130-5.

214. Mercuri, E., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy.* Neurology, 2007. **68**(1): p. 51-5.

215. Swoboda, K.J., et al., *Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy.* PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5268.

216. Weihl, C.C., A.M. Connolly, and A. Pestronk, *Valproate may improve strength and function in patients with type III/IV spinal muscle atrophy.* Neurology, 2006. **67**(3): p. 500-501.

217. Brahe, C., et al., *Phenylbutyrate increases SMN gene expression in spinal muscular atrophy patients.* Eur J Hum Genet, 2005. **13**(2): p. 256-9.

218. Pane, M., et al., *Daily salbutamol in young patients with SMA type II.* Neuromuscul Disord, 2008. **18**(7): p. 536-40.

219. Tiziano, F.D., et al., *Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design.* J Med Genet, 2010. **47**(12): p. 856-8.

220. Thurmond, J., et al., *Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy.* J Med Chem, 2008. **51**(3): p. 449-69.

221. Butchbach, M.E., et al., *Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(3): p. 454-67.

222. Hastings, M.L., et al., *Tetracyclines That Promote SMN2 Exon 7 Splicing as Therapeutics for Spinal Muscular Atrophy.* Science Translational Medicine, 2009. **1**(5).

223. Nizzardo, M., et al., *Beta-lactam antibiotic offers neuroprotection in a spinal muscular atrophy model by multiple mechanisms.* Exp Neurol, 2011. **229**(2): p. 214-25.

224. Makhortova, N.R., et al., *A screen for regulators of survival of motor neuron protein levels.* Nat Chem Biol, 2011. **7**(8): p. 544-52.

225. Chen, P.C., et al., *Identification of a Maleimide-Based Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitor, BIP-135, that Prolongs the Median Survival Time of Delta7 SMA KO Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy.* ACS Chem Neurosci, 2012. **3**(1): p. 5-11.

226. Farooq, F., et al., *Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway.* J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3042-50.

227. Lunn, M.R., et al., *Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism.* Chemistry & Biology, 2004. **11**(11): p. 1489-1493.

228. Farooq, F., et al., *Celecoxib increases SMN and survival in a severe spinal muscular atrophy mouse model via p38 pathway activation.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(17): p. 3415-24.

229. Lim, S.R. and K.J. Hertel, *Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing.* J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45476-83.

230. Cartegni, L. and A.R. Krainer, *Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators.* Nat Struct Biol, 2003. **10**(2): p. 120-5.

231. Skordis, L.A., et al., *Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(7): p. 4114-4119.

232. Meyer, K., et al., *Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(3): p. 546-55.

233. Coady, T.H. and C.L. Lorson, *Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy.* J Neurosci, 2010. **30**(1): p. 126-30.

234. Shababi, M., J. Glascock, and C.L. Lorson, *Combination of SMN trans-splicing and a neurotrophic factor increases the life span and body mass in a severe model of spinal muscular atrophy.* Hum Gene Ther, 2011. **22**(2): p. 135-44.

235. Singh, N.K., et al., *Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron.* Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(4): p. 1333-1346.

236. Porensky, P.N., et al., *A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(7): p. 1625-38.

237. Hua, Y., et al., *Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model.* Genes Dev, 2010. **24**(15): p. 1634-44.

238. Passini, M.A., et al., *Antisense oligonucleotides delivered to the mouse CNS ameliorate symptoms of severe spinal muscular atrophy.* Sci Transl Med, 2011. **3**(72): p. 72ra18.

239. Osman, E.Y., et al., *Morpholino antisense oligonucleotides targeting intronic repressor Element1 improve phenotype in SMA mouse models.* Hum Mol Genet, 2014. **23**(18): p. 4832-45.

240. Nizzardo, M., et al., *Effect of combined systemic and local morpholino treatment on the spinal muscular atrophy Delta7 mouse model phenotype.* Clin Ther, 2014. **36**(3): p. 340-56 e5.

241. Keil, J.M., et al., *A short antisense oligonucleotide ameliorates symptoms of severe mouse models of spinal muscular atrophy.* Mol Ther Nucleic Acids, 2014. **3**: p. e174.

242. Rigo, F., et al., *Antisense-based therapy for the treatment of spinal muscular atrophy.* J Cell Biol, 2012. **199**(1): p. 21-5.

243. Azzouz, M., et al., *Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1726-31.

244. Duque, S., et al., *Intravenous administration of self-complementary AAV9 enables transgene delivery to adult motor neurons.* Mol Ther, 2009. **17**(7): p. 1187-96.

245. Passini, M.A., et al., *CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1253-64.

246. Dominguez, E., et al., *Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(4): p. 681-93.

247. Benkhelifa-Ziyyat, S., et al., *Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice.* Mol Ther, 2013. **21**(2): p. 282-90.

248. Passini, M.A., et al., *Translational fidelity of intrathecal delivery of self-complementary AAV9-survival motor neuron 1 for spinal muscular atrophy.* Hum Gene Ther, 2014. **25**(7): p. 619-30.

249. Tsai, L.K., et al., *Systemic Administration of a Recombinant AAV1 Vector Encoding IGF-1 Improves Disease Manifestations in SMA Mice.* Mol Ther, 2014. **22**(8): p. 1450-9.

250. Sivanesan, S., et al., *Antisense oligonucleotide mediated therapy of spinal muscular atrophy.* Transl Neurosci, 2013. **4**(1).

251. Corti, S., et al., *Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3316-30.

252. Corti, S., et al., *Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice.* Brain, 2010. **133**(Pt 2): p. 465-81.

253. Corti, S., et al., *Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy.* Sci Transl Med, 2012. **4**(165): p. 165ra162.

254. Mattis, V.B., et al., *Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts.* Hum Genet, 2006. **120**(4): p. 589-601.

255. Mattis, V.B., et al., *Subcutaneous administration of TC007 reduces disease severity in an animal model of SMA.* BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 142.

256. Lutz, C.M., et al., *Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy.* J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3029-41.

257. Tsai, L.K., *Therapy development for spinal muscular atrophy in SMN independent targets.* Neural Plast, 2012. **2012**: p. 456478.

258. Lesbordes, J.C., et al., *Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(11): p. 1233-9.

259. Simon, C.M., et al., *Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(6): p. 973-86.

260. Haddad, H., et al., *Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model.* Muscle Nerve, 2003. **28**(4): p. 432-7.

261. Russman, B.S., S.T. Iannaccone, and F.J. Samaha, *A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy.* Arch Neurol, 2003. **60**(11): p. 1601-3.

262. Dimitriadi, M., et al., *The neuroprotective drug riluzole acts via small conductance Ca2+-activated K+ channels to ameliorate defects in spinal muscular atrophy models.* J Neurosci, 2013. **33**(15): p. 6557-62.

263. Miller, R.G., et al., *A placebo-controlled trial of gabapentin in spinal muscular atrophy.* J Neurol Sci, 2001. **191**(1-2): p. 127-31.

264. Merlini, L., et al., *Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study.* J Child Neurol, 2003. **18**(8): p. 537-41.

265. Rose, F.F., Jr., et al., *Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(6): p. 997-1005.

266. Sumner, C.J., et al., *Inhibition of myostatin does not ameliorate disease features of severe spinal muscular atrophy mice.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(17): p. 3145-52.

267. Rindt, H., et al., *Transgenic inactivation of murine myostatin does not decrease the severity of disease in a model of Spinal Muscular Atrophy.* Neuromuscul Disord, 2012. **22**(3): p. 277-85.

268. Bosch-Marce, M., et al., *Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(9): p. 1844-53.

269. Murdocca, M., et al., *IPLEX administration improves motor neuron survival and ameliorates motor functions in a severe mouse model of spinal muscular atrophy.* Mol Med, 2012. **18**: p. 1076-85.

270. McGovern, V.L., et al., *Plastin 3 Expression Does Not Modify Spinal Muscular Atrophy Severity in the 7 SMA Mouse.* PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132364.

271. Bowerman, M., et al., *Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(8): p. 1468-78.

272. Bowerman, M., et al., *Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy.* BMC Med, 2012. **10**: p. 24.

273. curesma.org. *SMA drug pipeline: June 2015*. [cited 2016 May 09]; Available from: http://www.curesma.org/documents/research-documents/june-2015-drug-pipeline.pdf.

274. Iascone, D.M., C.E. Henderson, and J.C. Lee, *Spinal muscular atrophy: from tissue specificity to therapeutic strategies.* F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 04.

275. El-Khodor, B.F., et al., *Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy.* Exp Neurol, 2008. **212**(1): p. 29-43.

276. Willmann, R., et al., *Developing standard procedures for pre-clinical efficacy studies in mouse models of spinal muscular atrophy: report of the expert workshop "Pre-clinical testing for SMA", Zurich, March 29-30th 2010.* Neuromuscul Disord, 2011. **21**(1): p. 74-7.

277. Barlow, C., et al., *Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia.* Cell, 1996. **86**(1): p. 159-71.

278. Tarabal, O., J. Caldero, and J.E. Esquerda, *Intramuscular nerve sprouting induced by CNTF is associated with increases in CGRP content in mouse motor nerve terminals.* Neuroscience Letters, 1996. **219**(1): p. 60-64.

279. Wright, M.C. and Y.J. Son, *Ciliary neurotrophic factor is not required for terminal sprouting and compensatory reinnervation of neuromuscular synapses: re-evaluation of CNTF null mice.* Exp Neurol, 2007. **205**(2): p. 437-48.

280. Clarke, P.G.H. and R.W. Oppenheim, *Neuron Death in Vertebrate Development - in-Vivo Methods.* Methods in Cell Biology, Vol 46, 1995. **46**: p. 277-321.

281. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.

282. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

283. Kapoukranidou, D., et al., *Assessment of motoneuron death during development following neonatal nerve crush and Mg2+ treatment.* Med Sci Monit, 2005. **11**(10): p. BR373-9.

284. Li, L., et al., *Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice.* J Comp Neurol, 1998. **396**(2): p. 158-68.

285. Murray, L.M., et al., *The response of neuromuscular junctions to injury is developmentally regulated.* Faseb Journal, 2011. **25**(4): p. 1306-1313.

286. Bowerman, M., et al., *SMN, profilin IIa and plastin 3: A link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis.* Molecular and Cellular Neuroscience, 2009. **42**(1): p. 66-74.

287. Liu, H., et al., *Smn deficiency causes neuritogenesis and neurogenesis defects in the retinal neurons of a mouse model of spinal muscular atrophy.* Dev Neurobiol, 2011. **71**(2): p. 153-69.

288. Burke, R.E., et al., *Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius.* J Physiol, 1973. **234**(3): p. 723-48.

289. Frey, D., et al., *Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases.* J Neurosci, 2000. **20**(7): p. 2534-42.

290. Pun, S., et al., *Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF.* Nat Neurosci, 2006. **9**(3): p. 408-19.

291. Dengler, R., et al., *Amyotrophic lateral sclerosis: macro-EMG and twitch forces of single motor units.* Muscle Nerve, 1990. **13**(6): p. 545-50.

292. Hashizume, K., K. Kanda, and R.E. Burke, *Medial gastrocnemius motor nucleus in the rat: age-related changes in the number and size of motoneurons.* J Comp Neurol, 1988. **269**(3): p. 425-30.

293. Hirofuji, C., et al., *SDH activity and cell size of tibialis anterior motoneurons and muscle fibers in SAMP6.* Neuroreport, 2000. **11**(4): p. 823-8.

294. Kaplan, A., et al., *Neuronal Matrix Metalloproteinase-9 Is a Determinant of Selective Neurodegeneration.* Neuron, 2014. **81**(2): p. 333-348.

295. Rushton, W.A.H., *A Theory of the Effects of Fibre Size in Medullated Nerve.* Journal of Physiology-London, 1951. **115**(1): p. 101-122.

296. Blinzinger, K. and G. Kreutzberg, *Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells.* Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1968. **85**(2): p. 145-57.

297. Alvarez, F.J., et al., *Vesicular glutamate transporters in the spinal cord, with special reference to sensory primary afferent synapses.* J Comp Neurol, 2004. **472**(3): p. 257-80.

298. Todd, A.J., et al., *The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn.* Eur J Neurosci, 2003. **17**(1): p. 13-27.

299. Oliveira, A.L., et al., *Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia.* Synapse, 2003. **50**(2): p. 117-29.

300. Ernfors, P., et al., *Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents.* Cell, 1994. **77**(4): p. 503-12.

301. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain.* Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.

302. Ling, K.K., et al., *Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(1): p. 185-95.

303. Matteoli, M., et al., *Developmentally Regulated Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide at Mammalian Neuromuscular-Junction.* Journal of Molecular Neuroscience, 1990. **2**(3): p. 175-184.

304. Sala, C., et al., *Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions.* J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 2): p. 520-8.

305. Tarabal, O., et al., *Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats.* Eur J Neurosci, 1996. **8**(4): p. 829-36.

306. Dachs, E., et al., *Chronic treatment with lithium does not improve neuromuscular phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy.* Neuroscience, 2013. **250**: p. 417-33.

307. Hamalainen, N. and D. Pette, *The histochemical profiles of fast fiber types IIB, IID, and IIA in skeletal muscles of mouse, rat, and rabbit.* J Histochem Cytochem, 1993. **41**(5): p. 733-43.

308. Casanovas, A., et al., *Prevention by lamotrigine, MK-801 and N omega-nitro-L-arginine methyl ester of motoneuron cell death after neonatal axotomy.* Neuroscience, 1996. **71**(2): p. 313-25.

309. Casanovas, A., et al., *c-Jun regulation in rat neonatal motoneurons postaxotomy.* J Neurosci Res, 2001. **63**(6): p. 469-79.

310. Houenou, L.J., et al., *Naturally-Occurring and Axotomy-Induced Motoneuron Death and Its Prevention by Neurotrophic Agents - a Comparison between Chick and Mouse.* Self-Organizing Brain: From Growth Cones to Functional Networks, 1994. **102**: p. 217-226.

311. Toth, C.C., et al., *Locally synthesized calcitonin gene-related Peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration.* J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(3): p. 326-37.

312. Gordon, T., J. Hegedus, and S.L. Tam, *Adaptive and maladaptive motor axonal sprouting in aging and motoneuron disease.* Neurol Res, 2004. **26**(2): p. 174-85.

313. Pamphlett, R., *Early terminal and nodal sprouting of motor axons after botulinum toxin.* J Neurol Sci, 1989. **92**(2-3): p. 181-92.

314. Wright, M.C., W.J. Cho, and Y.J. Son, *Distinct patterns of motor nerve terminal sprouting induced by ciliary neurotrophic factor vs. botulinum toxin.* J Comp Neurol, 2007. **504**(1): p. 1-16.

315. Hoffman, H., *Local reinnervation in partially denervated muscle: a histophysiological study.* Aust. J. exp. Biol. med. Sci, 1950(28): p. 14.

316. Caldero, J., et al., *Calcitonin gene-related peptide in rat spinal cord motoneurons: subcellular distribution and changes induced by axotomy.* Neuroscience, 1992. **48**(2): p. 449-61.

317. Csillik, B., et al., *Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor.* J Histochem Cytochem, 1993. **41**(10): p. 1547-55.

318. Aigner, L., et al., *Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice.* Cell, 1995. **83**(2): p. 269-278.

319. Strittmatter, S.M., et al., *Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43.* Cell, 1995. **80**(3): p. 445-452.

320. Donnelly, C.J., et al., *Axonally synthesized beta-actin and GAP-43 proteins support distinct modes of axonal growth.* J Neurosci, 2013. **33**(8): p. 3311-22.

321. Yoo, S., et al., *A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element.* J Neurochem, 2013. **126**(6): p. 792-804.

322. Shababi, M., C.L. Lorson, and S.S. Rudnik-Schoneborn, *Spinal muscular atrophy: a motor neuron disorder or a multi-organ disease?* J Anat, 2014. **224**(1): p. 15-28.

323. Simone, C., et al., *Is spinal muscular atrophy a disease of the motor neurons only: pathogenesis and therapeutic implications?* Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(5): p. 1003-20.

324. Janeway, C.A., et al., *The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. 2001, New York: Garland Science.

325. Kanning, K.C., A. Kaplan, and C.E. Henderson, *Motor neuron diversity in development and disease.* Annu Rev Neurosci, 2010. **33**: p. 409-40.

326. Saxena, S., et al., *Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival.* Neuron, 2013. **80**(1): p. 80-96.

327. Miles, G.B., et al., *Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(7): p. 2448-53.

328. Zagoraiou, L., et al., *A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity.* Neuron, 2009. **64**(5): p. 645-62.

329. Hellstrom, J., et al., *Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2.* J Comp Neurol, 2003. **460**(4): p. 476-86.

330. Deardorff, A.S., et al., *Expression of postsynaptic Ca2+-activated K+ (SK) channels at C-bouton synapses in mammalian lumbar -motoneurons.* J Physiol, 2013. **591**(4): p. 875-97.

331. Yamamoto, T., E.L. Hertzberg, and J.I. Nagy, *Subsurface cisterns in alpha-motoneurons of the rat and cat: immunohistochemical detection with antibodies against connexin32.* Synapse, 1991. **8**(2): p. 119-36.

332. Gallart-Palau, X., et al., *Neuregulin-1 is concentrated in the postsynaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to alpha-motoneurons and altered during motoneuron diseases.* Faseb Journal, 2014. **28**(8): p. 3618-3632.

333. Mavlyutov, T.A., et al., *The Sigma-1 Receptor Is Enriched in Postsynaptic Sites of C-Terminals in Mouse Motoneurons. An Anatomical and Behavioral Study.* Neuroscience, 2010. **167**(2): p. 247-255.

334. Aydar, E., et al., *The Sigma Receptor as a Ligand-Regulated Auxiliary Potassium Channel Subunit.* Neuron, 2002. **34**(3): p. 399-410.

335. Su, T.P., et al., *The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator.* Trends in Pharmacological Sciences, 2010. **31**(12): p. 557-566.

336. Alonso, G., et al., *Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system.* Neuroscience, 2000. **97**(1): p. 155-70.

337. Hayashi, T. and T.P. Su, *Sigma-1 receptor chaperones at the ER-Mitochondrion interface regulate Ca2+ signaling and cell survival.* Cell, 2007. **131**(3): p. 596-610.

338. Luty, A.A., et al., *Sigma nonopioid intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease.* Ann Neurol, 2010. **68**(5): p. 639-49.

339. Al-Saif, A., F. Al-Mohanna, and S. Bohlega, *A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis.* Ann Neurol, 2011. **70**(6): p. 913-9.

340. Mavlyutov, T.A., et al., *Lack of sigma-1 receptor exacerbates ALS progression in mice.* Neuroscience, 2013. **240**: p. 129-34.

341. Prause, J., et al., *Altered localization, abnormal modification and loss of function of Sigma receptor-1 in amyotrophic lateral sclerosis.* Hum Mol Genet, 2013. **22**(8): p. 1581-600.

342. Guzman-Lenis, M.S., X. Navarro, and C. Casas, *Selective Sigma Receptor Agonist 2-(4-Morpholinethyl)1-Phenylcyclohexanecarboxylate (Pre084) Promotes Neuroprotection and Neurite Elongation through Protein Kinase C (Pkc) Signaling on Motoneurons.* Neuroscience, 2009. **162**(1): p. 31-38.

343. Penas, C., et al., *Sigma receptor agonist 2-(4-morpholinethyl)1 phenylcyclohexanecarboxylate (Pre084) increases GDNF and BiP expression and promotes neuroprotection after root avulsion injury.* J Neurotrauma, 2011. **28**(5): p. 831-40.

344. Mancuso, R., et al., *Sigma-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice.* Neurotherapeutics, 2012. **9**(4): p. 814-26.

345. Witts, E.C., L. Zagoraiou, and G.B. Miles, *Anatomy and function of cholinergic C bouton inputs to motor neurons.* J Anat, 2014. **224**(1): p. 52-60.

346. Mavlyutov, T.A., et al., *Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N,N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase.* Neuroscience, 2012. **206**: p. 60-8.

347. Schafer, D.P., E.K. Lehrman, and B. Stevens, *The "quad-partite" synapse: Microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS.* Glia, 2013. **61**(1): p. 24-36.

348. Perry, V.H., J.A.R. Nicoll, and C. Holmes, *Microglia in neurodegenerative disease.* Nature Reviews Neurology, 2010. **6**(4): p. 193-201.

349. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases.* Mol Neurobiol, 2015.

350. Zhang, X.J., et al., *Activation of the zeta receptor 1 suppresses NMDA responses in rat retinal ganglion cells.* Neuroscience, 2011. **177**: p. 12-22.

351. Nishimune, H., J.A. Stanford, and Y. Mori, *Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction.* Muscle Nerve, 2014. **49**(3): p. 315-24.

352. Shrader, J.A., et al., *A randomized controlled trial of exercise in spinal and bulbar muscular atrophy.* Ann Clin Transl Neurol, 2015. **2**(7): p. 739-47.

353. McCartney, N., et al., *The effects of strength training in patients with selected neuromuscular disorders.* Med Sci Sports Exerc, 1988. **20**(4): p. 362-8.

354. Lewelt, A., et al., *Resistance Strength Training Exercise in Children with Spinal Muscular Atrophy.* Muscle Nerve, 2015.

355. Madsen, K.L., et al., *Training improves oxidative capacity, but not function in Spinal Muscular Atrophy Type III.* Muscle Nerve, 2014.

356. Kirkinezos, I.G., et al., *Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.* Annals of Neurology, 2003. **53**(6): p. 804-807.

357. Liebetanz D, H.K., von Lewinski F, Kahler E, Paulus W *Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis.*

358. Mahoney, D.J., et al., *Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.* Muscle Nerve, 2004. **29**(5): p. 656-62.

359. Grondard, C., et al., *Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse.* J Neurosci, 2005. **25**(33): p. 7615-22.

360. Chali, F., et al., *Long-term exercise-specific neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy-like mice.* J Physiol, 2016.

361. Andreassi, C., et al., *Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor.* Neurogenetics, 2002. **4**(1): p. 29-36.

362. Fujii, N., et al., *Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(3): p. 1150-5.

363. Chen, Z.P., et al., *Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans.* Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2205-12.

364. Mu, J., et al., *A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle.* Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 1085-94.

365. Ljubicic, V., M. Burt, and B.J. Jasmin, *The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets.* FASEB J, 2014. **28**(2): p. 548-68.

366. Jorgensen, S.B., E.A. Richter, and J.F. Wojtaszewski, *Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise.* J Physiol, 2006. **574**(Pt 1): p. 17-31.

367. Merrill, G.F., et al., *AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle.* Am J Physiol, 1997. **273**(6 Pt 1): p. E1107-12.

368. Holmes, B.F., E.J. Kurth-Kraczek, and W.W. Winder, *Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle.* J Appl Physiol (1985), 1999. **87**(5): p. 1990-5.

369. Winder, W.W., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle.* J Appl Physiol (1985), 2000. **88**(6): p. 2219-26.

370. Yan, Z., et al., *Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle.* J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(1): p. 264-74.

371. Narkar, V.A., et al., *AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics.* Cell, 2008. **134**(3): p. 405-15.

372. Ljubicic, V., et al., *Chronic AMPK activation evokes the slow, oxidative myogenic program and triggers beneficial adaptations in mdx mouse skeletal muscle.* Hum Mol Genet, 2011. **20**(17): p. 3478-93.

373. Ljubicic, V., et al., *Chronic AMPK stimulation attenuates adaptive signaling in dystrophic skeletal muscle.* Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C110-21.

374. Scarpulla, R.C., *Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1269-78.

375. Schiaffino, S. and C. Reggiani, *Fiber types in mammalian skeletal muscles.* Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1447-531.

376. Baar, K., et al., *Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1.* FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1879-86.

377. Russell, A.P., et al., *Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle.* Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2874-81.

378. Terada, S., et al., *Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(2): p. 350-4.

379. Jager, S., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12017-22.

380. Pette, D. and R.S. Staron, *Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions.* Microsc Res Tech, 2000. **50**(6): p. 500-9.

381. Murray, L.M., et al., *Defects in neuromuscular junction remodelling in the Smn(2B/-) mouse model of spinal muscular atrophy.* Neurobiol Dis, 2013. **49**: p. 57-67.

382. Soler-Botija, C., et al., *Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development.* J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(4): p. 420-6.

383. Murray, L.M., et al., *Transcriptional profiling of differentially vulnerable motor neurons at pre-symptomatic stage in the Smn (2b/-) mouse model of spinal muscular atrophy.* Acta Neuropathol Commun, 2015. **3**: p. 55.

384. Dubowitz, V., *Muscle disorders in childhood.* Major Probl Clin Pediatr, 1978. **16**: p. iii-xiii, 1-282.

385. Lu, B., et al., *Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction.* Nature, 1993. **363**(6424): p. 76-9.

386. Duclert, A.C., JP., *Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction.* Physiol. Rev., 1995. **75**: p. 339-368.

387. Grasselli, G., et al., *Impaired sprouting and axonal atrophy in cerebellar climbing fibres following in vivo silencing of the growth-associated protein GAP-43.* PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20791.

388. Booth, C.M. and M.C. Brown, *Expression of GAP-43 mRNA in Mouse Spinal Cord Following Unilateral Peripheral Nerve Damage: is There a Contralateral Effect?* European Journal of Neuroscience, 1993. **5**(12): p. 1663-1676.

389. Kobayashi, N., H. Kiyama, and M. Tohyama, *GAP-43 (B50/F1) gene regulation by axonal injury of the hypoglossal nerve in the adult rat.* Brain Res Mol Brain Res, 1994. **21**(1-2): p. 9-18.

390. Fallini, C., et al., *Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons.* J Neurosci, 2016. **36**(13): p. 3811-20.

391. Fallini, C., et al., *Dynamics of survival of motor neuron (SMN) protein interaction with the mRNA-binding protein IMP1 facilitates its trafficking into motor neuron axons.* Dev Neurobiol, 2014. **74**(3): p. 319-32.

392. Koltzenburg, M., P.D. Wall, and S.B. McMahon, *Does the right side know what the left is doing?* Trends in Neurosciences, 1999. **22**(3): p. 122-127.

393. Misgeld, T., et al., *Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase.* Neuron, 2002. **36**(4): p. 635-48.

394. Kummer, T.T., et al., *Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus.* J Cell Biol, 2004. **164**(7): p. 1077-87.

395. Ruggiu, M., et al., *Rescuing Z+ agrin splicing in Nova null mice restores synapse formation and unmasks a physiologic defect in motor neuron firing.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3513-8.

396. Thirumalai, V., et al., *Preservation of VGLUT1 synapses on ventral calbindin-immunoreactive interneurons and normal locomotor function in a mouse model of spinal muscular atrophy.* J Neurophysiol, 2013. **109**(3): p. 702-10.

397. Killeen, N., et al., *Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 360-7.

398. Nemazee, D. and K.A. Hogquist, *Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination.* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 182-9.

399. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.

400. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 350-4.

401. Salah-Mohellibi, N., et al., *Bone marrow transplantation attenuates the myopathic phenotype of a muscular mouse model of spinal muscular atrophy.* Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2723-32.

402. Peviani, M., et al., *Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation.* Neurobiol Dis, 2014. **62**: p. 218-32.

403. Tsai, S.Y., et al., *Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders.* Expert Opin Ther Targets, 2014. **18**(12): p. 1461-76.

404. Gekker, G., et al., *Cocaine-induced HIV-1 expression in microglia involves sigma-1 receptors and transforming growth factor-beta1.* Int Immunopharmacol, 2006. **6**(6): p. 1029-33.

405. Ajmo, C.T., et al., *Sigma receptor activation reduces infarct size at 24 hours after permanent middle cerebral artery occlusion in rats.* Current Neurovascular Research, 2006. **3**(2): p. 89-98.

406. Hall, A.A., et al., *Sigma receptors suppress multiple aspects of microglial activation.* Glia, 2009. **57**(7): p. 744-54.

407. Bourrie, B., et al., *SSR125329A, a high affinity sigma receptor ligand with potent anti-inflammatory properties.* Eur J Pharmacol, 2002. **456**(1-3): p. 123-31.

408. Patitucci, T.N. and A.D. Ebert, *SMN deficiency does not induce oxidative stress in SMA iPSC-derived astrocytes or motor neurons.* Hum Mol Genet, 2016. **25**(3): p. 514-23.

409. Streit, W.J., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective.* J Neuroinflammation, 2004. **1**(1): p. 14.

410. Lalancette-Hebert, M., et al., *Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain.* J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2596-605.

411. Francardo, V., et al., *Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism.* Brain, 2014. **137**(Pt 7): p. 1998-2014.

412. Bourrie, B., et al., *Enhancement of endotoxin-induced interleukin-10 production by SR 31747A, a sigma ligand.* Eur J Immunol, 1995. **25**(10): p. 2882-7.

413. Pette, D. and R.S. Staron, *Mammalian skeletal muscle fiber type transitions.* Int Rev Cytol, 1997. **170**: p. 143-223.

414. Ljubicic, V. and B.J. Jasmin, *AMP-activated protein kinase at the nexus of therapeutic skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy.* Trends Mol Med, 2013. **19**(10): p. 614-24.

415. Witczak, C.A., C.G. Sharoff, and L.J. Goodyear, *AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(23): p. 3737-3755.

416. Mylabathula, D.B., et al., *Age-associated changes in MAPK activation in fast- and slow-twitch skeletal muscle of the F344/NNiaHSD X Brown Norway/BiNia rat model.* Exp Gerontol, 2006. **41**(2): p. 205-14.

417. Singh, R., et al., *Increases in nuclear p65 activation in dystrophic skeletal muscle are secondary to increases in the cellular expression of p65 and are not solely produced by increases in IkappaB-alpha kinase activity.* J Neurol Sci, 2009. **285**(1-2): p. 159-71.

418. Thomson, D.M., et al., *AMP-activated protein kinase response to contractions and treatment with the AMPK activator AICAR in young adult and old skeletal muscle.* J Physiol, 2009. **587**(Pt 9): p. 2077-86.

419. Dubowitz V, S.C., *Muscle Biopsy. A practical approach*. Third edition ed. 2007, Philadelphia: Saunders Elsevier.

420. Minnaard, R., et al., *Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats.* Muscle Nerve, 2005. **31**(3): p. 339-48.

421. Kummer, T.T., T. Misgeld, and J.R. Sanes, *Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost.* Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(1): p. 74-82.

422. Handschin, C., et al., *PGC-1alpha regulates the neuromuscular junction program and ameliorates Duchenne muscular dystrophy.* Genes Dev, 2007. **21**(7): p. 770-83.

423. Goto, M., et al., *cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(2): p. 350-4.

424. Liu, H., et al., *Spinal muscular atrophy patient-derived motor neurons exhibit hyperexcitability.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 12189.

425. Alvarez, F.J., et al., *Permanent central synaptic disconnection of proprioceptors after nerve injury and regeneration. I. Loss of VGLUT1/IA synapses on motoneurons.* J Neurophysiol, 2011. **106**(5): p. 2450-70.

426. Lee, A.J., et al., *Limited phenotypic effects of selectively augmenting the SMN protein in the neurons of a mouse model of severe spinal muscular atrophy.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e46353.

427. Paez-Colasante, X., et al., *Improvement of neuromuscular synaptic phenotypes without enhanced survival and motor function in severe spinal muscular atrophy mice selectively rescued in motor neurons.* PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75866.