



Universitat de Lleida

Canvis neuromusculars en l'envelliment: efectes de la suplementació dietètica amb flavonoides del te verd i del cacau sobre la sarcopènia

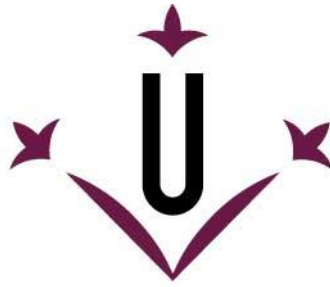
Alba Blasco Carmona

<http://hdl.handle.net/10803/688917>

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.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**Canvis neuromusculars en l'envelliment:
efectes de la suplementació dietètica
amb flavonoides del te verd i del cacau
sobre la sarcopènia**

Alba Blasco Carmona

Memòria presentada per optar al grau de Doctora per la Universitat de
Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Directors

Dr. Jordi Calderó Pardo

Dra. Olga Tarabal Mostazo

Tutor

Dr. Jordi Calderó Pardo

2023

ÍNDEX

ABREVIATURES	9
RESUMS	17
1. Resum	19
2. Summary	21
3. Resumen	23
INTRODUCCIÓ	25
1. Sarcopènia	27
2. El múscul	28
2.1. Tipologia de fibres	29
2.2. Localització nuclear	33
2.3. Mitochondris	36
2.3.1. PGC-1 α	41
2.3.2. ATP5A	42
2.4. Cèl·lules satèl·lit (SCs).....	43
2.5. Lipofuscina	45
3. La motoneurona (MN)	49
4. La unió neuromuscular (NMJ)	51
4.1. Factor de creixement transformant β (TGF- β).....	57
4.2. Factor de creixement dels fibroblasts 1 (FGFBP1).....	58
4.3. Pètid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP).....	60
4.4. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43)	62
4.5. Agrina.....	63
4.6. Regulació molecular de l'NMJ	67
5. Nervi ciàtic	68
6. Prevenió de la sarcopènia	69
6.1. Exercici.....	72

6.2. Restricció calòrica (RC).....	75
6.3. Dietes.....	77
6.3.1. Te verd.....	77
6.3.2. Cacao.....	78
7. Models experimentals de l'envelliment.....	78
7.1. Humans.....	78
7.2. Rosegadors (ratolins i rates).....	79
8. Proves motores.....	80
8.1. Grid stepping.....	80
8.2. Open-field.....	80
8.3. Rotarod.....	81
8.4. Pen test.....	82
9. Proves electrofisiològiques.....	83
HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	85
1. Hipòtesi.....	87
2. Objectius.....	89
MATERIAL I MÈTODES.....	91
1. Animals i dietes.....	93
1.1. Proves d'habilitat motora i determinació del pes dels animals.....	94
1.1.1. Grid stepping.....	95
1.1.2. Open-field.....	96
1.1.3. Rotarod.....	98
1.1.4. Pen test.....	99
2. Tests electrofisiològics.....	100
3. Tècniques de microscòpia òptica i de fluorescència.....	101
3.1. Obtenció i processament de les mostres.....	101
3.2. Tinció amb hematoxilina-eosina (HE).....	103
3.3. Tincions immunocitoquímiques. Immunofluorescència.....	105
3.4. Anàlisi dels resultats. Obtenció i processament de les imatges.....	107
3.4.1. NMJs; anàlisi en talls longitudinals dels músculs.....	107
3.4.2. Fibres musculars; anàlisi en talls transversals dels músculs.....	110

4. Western blot.....	111
4.1. Obtenció i preparació de les mostres	111
4.2. Quantificació de la concentració de les proteïnes	111
4.3. Electroforesi reductora en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)	112
4.4. Transferència de les proteïnes a la membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF) per electrotransferència.....	112
4.5. Detecció immunocitoquímica.....	113
4.6. Anàlisi dels resultats.....	114
5. Talls semifins i microscòpia òptica.....	114
5.1. Obtenció i processament de les mostres	114
5.2. Obtenció de les seccions i tincions.....	115
5.3. Anàlisi dels resultats: obtenció i processament de les imatges	116
6. Anàlisi estadística.....	116
RESULTATS. CAPÍTOL I	119
1. Canvis en el pes corporal i reducció de les habilitats motores durant l'envelliment.....	121
1.1. Pes corporal	121
1.2. Supervivència.....	121
1.3. Proves motores	123
2. Canvis electrofisiològics amb l'envelliment.....	127
3. Canvis estructurals i moleculars a les NMJs dels músculs durant els processos de maduració i envelliment.....	129
3.1. Àrea i perímetre de les NMJs.....	129
3.2. Fragmentació de les NMJs.....	129
3.3. Maduració de les NMJs.....	130
3.4. Innervació de les NMJs	135
3.5. <i>Sprouting</i> de de les NMJs	139
3.6. Canvis en els nivells d'expressió de diferents molècules a les NMJs	141
3.6.1. Pètid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP)	141
3.6.2. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43).....	141
3.6.3. Agrina	143

3.6.4. Proteïna d'unió al factor de creixement dels fibroblasts 1 (FGFBP1) i factor de creixement transformant β 1 (TGF- β 1).....	144
4. Canvis en els músculs esquelètics relacionats amb la maduració i l'envelliment.....	147
4.1. Pes muscular.....	147
4.2. Àrea muscular	147
4.3. Nuclis centrals.....	151
4.4. Cèl·lules satèl·lit (SCs).....	152
4.5. Tipologia de fibres.....	154
4.6. Lipofuscina.....	157
4.7. Mitocondri.....	160
4.8. Canvis al nervi ciàtic durant els processos de maduració i envelliment.....	163
RESULTATS. CAPÍTOL II	167
1. El te verd i el cacau augmenten la supervivència, però no eviten l'empitjorament de les habilitats motores relacionat amb l'envelliment	169
1.1. Pes corporal	169
1.2. Consum de pinso	169
1.3. Supervivència.....	169
1.4. Proves motores	171
2. Ni el te verd ni el cacau són capaços de millorar els canvis electrofisiològics relacionats amb l'envelliment	174
3. Les dietes suplementades amb te verd i amb cacau prevenen la denervació muscular i milloren les alteracions regressives que es donen en les NMJs durant l'envelliment	175
3.1. Àrea de les NMJs.....	176
3.2. Innervació de les NMJs	176
3.3. Fragmentació de les NMJs.....	176
3.4. Maduració de les NMJs.....	177
3.5. <i>Sprouting</i> de de les NMJs	177
3.6. Múscul proximal gràcil: àrea, innervació, fragmentació i maduració de les NMJs	180

3.7. Canvis en els nivells d'expressió de diferents molècules a les NMJs	183
3.7.1. Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) i agrina	183
3.7.2. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43).....	184
4. Tant el te verd com el cacau milloren el grau d'envelliment i els signes de degeneració en les fibres dels músculs esquelètics dels animals vells..	185
4.1. Pes i àrea muscular.....	186
4.2. Nuclis centrals.....	189
4.3. Cèl·lules satèl·lit (SCs).....	190
4.4. Lipofuscina.....	192
5. Tant el te verd com el cacau prevenen les alteracions associades a l'envelliment als mitocondris dels músculs esquelètics	194
DISCUSSIÓ.....	197
1. L'anàlisi simultània de les modificacions que es donen a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj permet una caracterització dels processos de maduració i envelliment.....	199
2. La conducció dels impulsos nerviosos es veu alterada amb l'edat en els ratolins C57BL/6JRj.....	201
2.1. No s'observa una pèrdua significativa de MNs als ratolins amb l'envelliment	202
3. Les NMJs dels ratolins sofreixen canvis plàstics relacionats amb l'edat.....	202
4. Els músculs esquelètics dels ratolins experimenten canvis relacionats amb l'edat, amb alteracions molt variables entre els diferents músculs	205
5. Les dietes suplementades amb cacau o amb te verd mitiguen els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment.....	213

6. Les dietes enriquides amb te verd i amb cacau reverteixen alguns dels canvis que els músculs esquelètics dels ratolins experimenten amb l'edat	214
7. Les dietes enriquides amb te verd o amb cacau són capaces de pal·liar algunes de les alteracions observades en les NMJs dels animals vells	217
CONCLUSIONS	223
BIBLIOGRAFIA	227
ARTICLES DERIVATS D'AQUESTA TESI	301
AGRAÏMENTS	381

ABREVIATURES

α -Bgtx: bungarotoxina α (en anglès, *α bungarotoxin*).

ACh: acetilcolina (en anglès, *acetylcholine*).

AChR: receptor d'acetilcolina (en anglès, *acetylcholine receptor*).

ADP: difosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine diphosphate*).

ALS: esclerosi lateral amiotròfica (en anglès, *amyotrophic lateral sclerosis*).

AMP: monofosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine monophosphate*).

AMPK: proteïna cinasa activada per adenosina monofosfat (en anglès, *adenosine monophosphate activated protein kinase*).

ANOVA: anàlisi de la variància (en anglès, *analysis of variance*).

Atg7: gen relacionat amb l'autofàgia (en anglès, *autophagy-related gene*) 7.

ATP: trifosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine triphosphate*).

ATP5A: sintasa adenosina trifosfat alfa (en anglès, *adenosine triphosphate synthase alpha*).

BMP: proteïna morfogenètica òssia (en anglès, *bone morphogenetic protein*).

BSA: albúmina de sèrum bovi (en anglès, *bovine serum albumin*).

CFP: proteïna fluorescent cian (en anglès, *cyan fluorescent protein*).

CGRP: pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (en anglès, *calcitonin gene-related peptide*).

CMAP: potencial d'acció muscular compost (en anglès, *compound muscle action potential*).

CNAP: potencial d'acció del nervi sensorial compost (en anglès, *compound sensory nerve action potential*).

DAPI: diclorhidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol (en anglès, *4' 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*).

DDSA: anhídrid dodecenil succínic (en anglès, *dodeceny succinic acid*).

DgN: quart nervi digital (en anglès, *digital nerve*).

DMP-30: 2, 4, 6-Tris-(dimetilaminometil)fenol (en anglès, 2, 4, 6-Tris-(dimethylaminomethyl)phenol).

DNA: àcid desoxiribonucleic (en anglès, *deoxiribonucleic acid*).

DNA-PK: proteïna cinasa dependent d'àcid desoxiribonucleic (en anglès, *deoxiribonucleic acid-dependent protein kinase*).

DRG: gangli de l'arrel dorsal (en anglès, *dorsal root ganglion*).

EDL: extensor llarg dels dits (*extensor digitorum longus*).

EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic (en anglès, *ethylenediaminetetraacetic acid*).

EGCg: gal·lat d'epigal·locatexina (en anglès, *epigallocatechin gallate*).

ER: reticle endoplasmàtic (en anglès, *endoplasmic reticulum*).

EtOH: etanol.

FGF: factor de creixement dels fibroblasts (en anglès, *fibroblast growth factor*).

FGFBP1: proteïna d'unió al factor de creixement dels fibroblasts (en anglès, *fibroblast growth factor binding protein*) 1.

FGFR: receptor del factor de creixement dels fibroblasts (en anglès, *fibroblast growth factor receptor*).

GAP-43: proteïna associada al creixement (en anglès, *growth-associated protein*)-43.

GAPDH: gliceraldehid 3-fosfatasa deshidrogenasa (en anglès, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

GFP: proteïna fluorescent verda (en anglès, *green fluorescent protein*).

H₂O_d: aigua destil·lada.

HE: hematoxilina-eosina.

HSPG: proteoglicans de sulfat d'heparan (en anglès, *heparan sulfate proteoglycans*).

JAK: cinasa janus (en anglès, *janus kinase*).

KO: de l'anglès, *knockout*.

LDCV: vesícules de gran nucli dens (en anglès, *large dense core vesicles*).

LDL: lipoproteïna de baixa densitat (en anglès, *low-density lipoprotein*).

LRP4: proteïna 4 de baixa densitat relacionada amb el receptor de lipoproteïnes (en anglès, *low-density lipoprotein receptor-related protein 4*).

MDS: síndrome de depleció de l'àcid desoxiribonucleic mitocondrial (en anglès, *mitochondrial deoxyribonucleic acid depletion syndrome*).

MEC: matriu extracel·lular.

MetOH: metanol.

MFN1/2: mitofusina 1/2.

MMP-9: metal·loproteinasa de matriu (en anglès, *matrix metalloproteinase*)-9.

MN: motoneurona.

MND: domini mionuclear (en anglès, *myonuclear domain*).

mRNA: àcid ribonucleic missatger (en anglès, *messenger ribonucleic acid*).

mtDNA: àcid desoxiribonucleic mitocondrial (en anglès, *mitochondrial deoxyribonucleic acid*).

mTOR: molècula diana de la rapamicina en mamífers (en anglès, *mammalian target of rapamycin*).

mtRNA: àcid ribonucleic mitocondrial (en anglès, *mitochondrial ribonucleic acid*).

MUNE: estimació numèrica de la unitat motora (en anglès, *motor unit number estimation*).

MuSK: cinasa específica de múscul (en anglès, *muscle-specific kinase*).

MyHC: cadena pesada de la miosina (en anglès, *myosin heavy chain*).

NAD: nicotinamida adenina dinucleòtid.

nDNA: àcid desoxiribonucleic nuclear (en anglès, *nuclear deoxyribonucleic acid*).

NF-68: neurofilament de 68 KDa.

NGS: sèrum de cabra (en anglès, *normal goat serum*).

NMA: anhídric metil nàdic (en anglès, *nadic methyl anhydride*)

NMJ: unió neuromuscular (en anglès, *neuromuscular junction*).

NRF1/2: factor de respiració nuclear (en anglès, *nuclear respiratory factor* 1/2).

ON: durant tota la nit (en anglès, *overnight*).

P: dia postnatal.

p38MAPK: proteïna cinasa associada al mitogen p38 (en anglès, *mitogen-associated protein kinase p38*).

PAX7: de l'anglès, *paired box 7*.

PBS: solució salina de tampó fosfat (en anglès, *phosphate-buffered saline*).

PFA: paraformaldehid.

PGC-1 α/β : factor transcripcional coactivador del receptor γ 1 α/β activat pel proliferador de peroxisomes (en anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β*).

PL: plantar interossi.

PVDF: fluorur de polivinildè (en anglès, *polyvinylidene fluoride*).

RC: restricció calòrica.

RIPA: tampó d'assaig de radioimmunoprecipitació (en anglès, *radioimmunoprecipitation assay buffer*).

ROS: espècies reactives de l'oxigen (en anglès, *reactive oxygen species*).

SC: cèl·lula satèl·lit (en anglès, *satellite cell*).

SDS: dodecilsulfat sòdic (en anglès, *sodium dodecyl sulfate*).

SEM: error estàndard de la mitjana (en anglès, *standard error of the mean*).

SIRT1: sirtuïna 1.

SMA: atròfia muscular espinal (en anglès, *spinal muscular atrophy*).

SMUA: amplitud d'una sola unitat motora (en anglès, *single motor unit amplitude*).

STAT: transductor de senyal activador de la transcripció (en anglès, *signal transducers and activators of transcription*).

SV2: proteïnes de les vesícules sinàptiques (en anglès, *synaptic vesicle protein*) 2.

TA: tibial anterior.

TBST: solució salina tamponada amb Tris i Tween 20 (en anglès, *tris-buffered saline and Tween 20*).

TF: tampó fosfat.

TFAM: factor transcripcional mitocondrial A (en anglès, *mitochondrial transcription factor A*).

TGF- β : factor de creixement transformant (en anglès, *transforming growth factor*) - β .

UPP: via de la ubiquitina proteasoma (en anglès, *ubiquitin proteasome pathway*).

UPR: resposta a proteïnes mal plegades (en anglès, *unfolded protein response*).

VACHT: transportador vesicular de l'acetilcolina (en anglès, *vesicular acetylcholine transporter*).

Wnt: de l'anglès, *wingless*.

YFP: proteïna fluorescent groga (en anglès, *yellow fluorescent protein*).

RESUMS

1. Resum

La pèrdua de la massa i la força musculars (sarcopènia) és un procés característic associat a l'envelliment que té lloc en totes les espècies. En ratolins, s'han observat defectes en les habilitats motores i canvis en els patrons electromiogràfics amb l'edat. Aquestes alteracions es donen en absència d'una mort significativa de motoneurons (MNs). La disfunció de les MNs podria ser la causa per la qual les unions neuromusculars (NMJs), els axons motors i els músculs esquelètics pateixen alteracions estructurals i moleculars durant la senescència. En aquest estudi posem de manifest que el procés d'envelliment comporta la degeneració dels nervis motors i la presència de fenòmens d'*sprouting* dels terminals nerviosos. Així mateix, les fibres musculars esquelètiques experimenten cicles continus de degeneració-regeneració. Si bé l'envelliment indueix canvis similars en els diferents tipus de músculs examinats, el perfil d'algunes alteracions és molt variable entre ells. Aquesta variabilitat es dona fins i tot entre músculs que tenen una localització propera i amb una composició de fibres d'una tipologia similar, el que suggereix que el grau d'activitat i la funció específica dels músculs, més que no pas la seva topografia i la tipologia de les seves fibres, tenen un gran impacte en els canvis musculars relacionats amb l'edat.

Les dietes suplementades amb flavonoides del te verd o del cacau augmenten la taxa de supervivència dels ratolins vells i prevenen alguns dels canvis estructurals regressius que es donen durant la senescència en el múscul esquelètic i l'NMJ. Ambdues dietes frenen el progrés de la senescència dels músculs esquelètics i milloren la seva capacitat regenerativa, reduint els cicles de degeneració-regeneració de les miofibres, mantenint la població de cèl·lules satèl·lit i fent augmentar l'expressió de PGC-1 α , un regulador transcripcional de la biogènesi mitocondrial, a més de mantenir la innervació i el grau de maduresa de les NMJs. Les diferències entre els resultats obtinguts amb les dietes suplementades amb l'extracte del te verd o amb cacau sobre les alteracions que s'observen en el múscul amb l'edat indiquen que la combinació de diferents flavonoides podria tenir un major efecte a l'hora de contrarestar els canvis al sistema neuromuscular relacionats amb l'envelliment.

2. Summary

Loss of muscle mass and strength (sarcopenia) is a characteristic process associated with aging that occurs in all species. In mice, defects in motor skills and changes in electromyographic patterns have been observed with age. These alterations occur in the absence of a significant death of motoneurons (MNs). The dysfunction of MNs could be the reason why neuromuscular junctions (NMJs), motor axons and skeletal muscles suffer structural and molecular alterations during senescence. In this study we highlight that the aging process involves motor nerve degeneration and sprouting phenomena of the nerve terminals. Likewise, skeletal muscle fibers undergo continuous cycles of degeneration-regeneration. Although aging induces similar changes in the different types of muscles examined, the profile of some alterations is very variable between them. This variability occurs even between muscles that have a close localization and having similar fibre type composition, which suggests that the degree of activity and the specific function of the muscles, rather than their topography and the typology of their fibres, have a great impact on muscle changes related to age.

Diets supplemented with green tea or cocoa flavonoids boost the survival rate of old mice and prevent some of the regressive structural changes that occur during senescence in skeletal muscle and the NMJ. Both diets slow down the progress of skeletal muscle senescence and improve their regenerative capacity, reducing myofibre degeneration-regeneration cycles, maintaining the population of satellite cells and increasing the expression of PGC-1 α , a transcriptional regulator of mitochondrial biogenesis, as well as maintaining the innervation and the degree of maturation of the NMJs. The differences between the results obtained with the diets supplemented with green tea extract or with cocoa on the alterations observed in the muscle with age indicate that the combination of different flavonoids could have a greater effect on counteracting the changes in the neuromuscular system related to aging.

3. Resumen

La pérdida de la masa y la fuerza musculares (sarcopenia) es un proceso característico asociado al envejecimiento que se da en todas las especies. En ratones, se han observado defectos en las habilidades motoras y cambios en los patrones electromiográficos con la edad. Estos cambios se dan en ausencia de una muerte significativa de motoneuronas (MNs). La disfunción de las MNs podría ser la causa por la cual las uniones neuromusculares (NMJs), los axones motores y los músculos esqueléticos sufren alteraciones estructurales y moleculares durante la senescencia. En este estudio ponemos de manifiesto que el proceso de envejecimiento comporta la degeneración de los nervios motores y la presencia de fenómenos de *sprouting* de los terminales nerviosos. Asimismo, las fibras musculares esqueléticas experimentan ciclos continuos de degeneración-regeneración. Si bien el envejecimiento induce cambios similares en los distintos tipos de músculos examinados, el perfil de algunas alteraciones es muy variable entre ellos. Esta variabilidad se da incluso entre músculos que tienen una localización cercana y con una composición de fibras de una tipología similar, lo que sugiere que el grado de actividad y la función específica de los músculos, más que su topografía y la tipología de sus fibras, tienen un gran impacto en los cambios musculares relacionados con la edad.

Las dietas suplementadas con flavonoides del té verde o del cacao aumentan la tasa de supervivencia de los ratones viejos y previenen algunos de los cambios estructurales regresivos que se dan durante la senescencia en el músculo esquelético y la NMJ. Ambas dietas frenan el progreso de la senescencia de los músculos esqueléticos y mejoran su capacidad regenerativa, reduciendo los ciclos de degeneración-regeneración de las miofibras, manteniendo la población de células satélite y haciendo aumentar la expresión de PGC-1 α , un regulador transcripcional de la biogénesis mitocondrial, además de mantener la inervación y el grado de madurez de las NMJs. Las diferencias entre los resultados obtenidos con las dietas suplementadas con el extracto del té verde o con cacao sobre las alteraciones que se observan en el músculo con la edad indican que la combinación de distintos flavonoides podría tener un mayor efecto a la hora de contrarrestar los cambios en el sistema neuromuscular relacionados con el envejecimiento.

INTRODUCCIÓ

Les millores en la qualitat de vida i en el sistema sanitari i l'avenç en l'estudi de diferents malalties, entre altres factors, han fet que part de la mortalitat associada a diverses patologies com ara les malalties infeccioses s'hagi vist reduïda, mentre que s'observa un augment de la mortalitat i morbiditat associades a defectes i malalties relacionats amb l'envelliment. L'augment de l'esperança de vida en la població durant els darrers anys ha fet que els canvis en la funció muscular relacionats amb l'envelliment estiguin cobrant cada vegada més importància. Així doncs, hi ha una necessitat de conèixer els mecanismes que condueixen als diferents canvis que sofreixen els músculs esquelètics en les seves estructures i funcions per tal de dissenyar diferents estratègies destinades a frenar aquests canvis vinculats a l'edat.

L'envelliment representa un procés biològic extremadament complex durant el qual es van acumulant canvis intrínsecs al llarg del temps, el que comporta un augment de la probabilitat de mort i del desenvolupament de diverses malalties (Zurcher and Slagboom, 1994).

Aquests canvis es solen donar de manera lenta i progressiva i, tot i que hi ha una gran variabilitat entre els diferents individus, s'observen en tots els humans (Korhonen *et al.*, 2006). Un canvi molt important i molt significatiu vinculat amb l'envelliment és el que es coneix com a sarcopènia, element clau de la fragilitat física.

1. Sarcopènia

La sarcopènia és un procés que consisteix en la pèrdua progressiva de la massa i de les funcions del múscul esquelètic durant l'envelliment. Com a conseqüència, aquesta reducció en les funcions dels músculs condiciona la qualitat de vida de la gent gran i fa augmentar la probabilitat que pateixin lesions associades a caigudes i la discapacitat, a banda de conduir a unes majors mortalitat i morbiditat (Janssen *et al.*, 2004).

Tot i que hi ha diferències entre espècies en resposta a l'envelliment, la sarcopènia es dona en tots els mamífers; en els humans, es manifesta a partir de la sisena dècada de la vida (al voltant dels 50 anys), amb un deteriorament gradual: s'observa una pèrdua de massa muscular d'un 1-2 % acompanyada d'una pèrdua de la força muscular d'un 1,5 % a l'any entre els 50 i els 60 anys,

que passa a ser del ~3 % a partir dels 60 anys (von Haehling *et al.*, 2010; Gava *et al.*, 2015). No obstant això, si es té en compte que els càlculs es fan anualment respecte la massa muscular de l'any anterior, aquest deteriorament resulta en un augment del percentatge de pèrdua de massa muscular exponencial, i no lineal, any rere any (Degens and Alway, 2003); això explicaria per què en els estudis longitudinals els resultats mostren una disminució de la massa muscular superior a l'1 % per any.

Ha estat descrit que, en els mamífers bípedes i quadrúpedes, les extremitats posteriors es veuen més greument afectades per la sarcopènia que les anteriors (Oertel, 1986; Hashizume and Kanda, 1995). La sarcopènia té una prevalença del 8 al 40 % entre la gent major de 60 anys, depenent de l'estudi (Van Kan, 2009; von Haehling *et al.*, 2010), i el fet que siguin les extremitats posteriors les que es veuen més afectades fa que tingui un major impacte en la qualitat de vida de les persones. Així doncs, l'afectació de les extremitats posteriors i la disminució de la mobilitat han estat descrites com a possibles predictors de les caigudes en la gent gran (Blake *et al.*, 1988; Sager *et al.*, 1994).

La sarcopènia té un origen multifactorial; hi participen diferents factors, tant intrínsecs com extrínsecs, essent alguns dels més importants les alteracions metabòliques i endocrines, la inflamació crònica (*inflammaging*), el dany oxidatiu, la disfunció mitocondrial, els factors neurogènics i la malnutrició (Berger and Doherty, 2010; Kalinkovich and Livshits, 2015; Larsson *et al.*, 2019).

2. El múscul

Les fibres musculars esquelètiques dels animals vells es troben reduïdes pel que fa al nombre total, tenen una major heterogeneïtat de mida i de tipologia, i es troben infiltrades per adipòcits i teixit connectiu (Berger and Doherty, 2010).

En rates s'ha descrit que, en edats avançades, els músculs sofreixen una reorganització de les fibres de les unitats motores, amb una posterior agrupació per tipus de fibra, i atròfia (Edström and Larsson, 1987; Ansved and Larsson, 1990; Ansved *et al.*, 1991). A més, s'ha observat un augment del nombre de fibres musculars innervades per motoneurons (MNs) α , una disminució del

nombre total de miofibres i una disminució del nombre d'axons mielinitzats als nervis perifèrics i a les arrels nervioses ventrals, el que suggereix que hi ha una denervació com a conseqüència de la pèrdua de MNs α i una reinnervació incompleta de les fibres musculars que han estat prèviament denervades (Carlson, 2004).

2.1. Tipologia de fibres

Als músculs estriats dels mamífers s'han identificat 8 tipus diferents de la cadena pesada de la miosina (en anglès *myosin heavy chain* [MyHC]): lentes de tipus 1, cardíques α , embrionàries, fetals, Ila, IIX (també conegudes com a IId (Pette and Staron, 2001; Baldwin and Haddad, 2002), IIb i la isoforma de la miosina ocular superràpida, a més d'una novena isoforma lenta present a les fibres musculars extraoculars i intrafusals (Hoh, 1992; Schiaffino and Reggiani, 1996), el que permet una classificació de les fibres en funció de la isoforma de la miosina que tenen (I, Ila, IId o IIb), com a fibres de tipus I, IIA, IID o IIB, respectivament. La majoria de les fibres musculars contenen només una isoforma de la miosina i es coneixen com a fibres pures (Staron and Pette, 1993). No obstant això, tal com es mostra a la Figura I-1, dues isoformes de la miosina, com ara MyHCI + MyHCIIa, MyHCIIa + MyHCIIId o MyHCIIId + MyHCIIb, es troben en algunes fibres (Staron and Pette, 1993); aquestes fibres s'anomenen híbrides: aquelles que contenen MyHCI i MyHCIIa es classifiquen com a tipus IC (MyHCI > MyHCIIa) o tipus IIC (MyHCIIa > MyHCI), aquelles que contenen MyHCIIa i MyHCIIId es classifiquen com a tipus IIDA (MyHCIIa > MyHCIIId) o tipus IIDA (MyHCIIId > MyHCIIa) i aquelles que contenen MyHCIIId i MyHCIIb es classifiquen com a tipus IIDB (MyHCIIId > MyHCIIb) o tipus IIBD (MyHCIIb > MyHCIIId) (Pette and Staron, 2000). Aquesta classificació suggereix que hi ha una continuïtat dels tipus de fibres de la més lenta a la més ràpida, on les fibres híbrides es troben intermèdies a les fibres pures: **I↔IC↔IIC↔IIA↔IIAD↔IID↔IIDB↔IIB** (Pette and Staron, 2000). Tot i que les fibres híbrides no són tan comunes com les fibres pures, hi ha un nombre considerable d'aquestes fibres en animals adults (Biral et al., 1988; Staron and Pette, 1993; Galler et al., 1997; Staron et al., 1999) (Figura I-1).

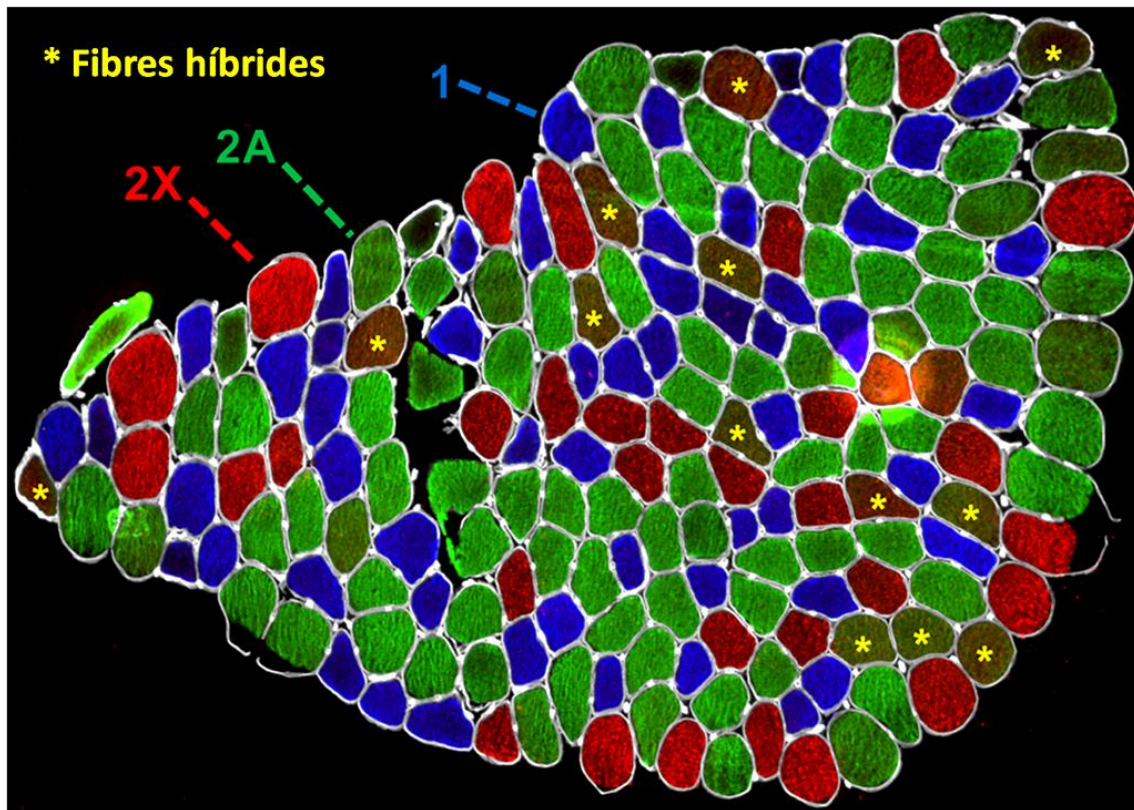


Figura I-1. Tipus de fibra identificats amb anticossos contra la miosina en músculs esquelètics humans. Secció del múscul vast lateral d'un individu adult jove. Les fibres de tipus 1, 2A i 2X es troben tenyides per diferents anticossos contra la miosina en blau, verd i vermell, respectivament; els perfils de les fibres es veuen amb tinció contra la laminina (en blanc). Els asteriscs (en groc) mostren les fibres híbrides. Imatge adaptada d'Schiaffino, 2018.

Els músculs de les extremitats posteriors de les rates adultes contenen una isoforma lenta de la miosina (MyHC I) i tres isoformes ràpides (MyHC IIa, II d i II b) (Schiaffino and Reggiani, 1994). L'anàlisi de fibres aïllades en rates adultes ha demostrat que almenys el 3 % de les fibres contenen MyHC IIa + MyHC II d i el 10 % contenen MyHC II d + MyHC II b (Staron and Pette, 1993).

En ratolins, ha estat descrit que el múscul solí està format per fibres de tipus I, II A, II AD i II D, amb predomini de les de tipus I i II A; tanmateix, també hi ha un percentatge considerable de fibres de tipus II AD ($18,74 \pm 6,95\%$) i II D ($5,69 \pm 3,09\%$). El múscul extensor llarg dels dits (*extensor digitorum longus* [EDL]) està format principalment per fibres de tipus II B i II DB, $66,01 \pm 8,51\%$ i $21,48 \pm 7,33\%$, respectivament, tot i que també s'observa un nombre menor de fibres de tipus II AD, IC/II C, II A i I. El múscul tibial anterior (TA) conté principalment

fibres de tipus IIB i IIDB, mentre que les fibres de tipus IIAD, IID, IIA, I i IC/IIC són menys abundants. Les fibres de tipus IIB i IIDB són les més nombroses al múscul gastrocnemi, seguides de les fibres de tipus IIAD, I, IIA i IID (Figura I-2) (Augusto *et al.*, 2004).

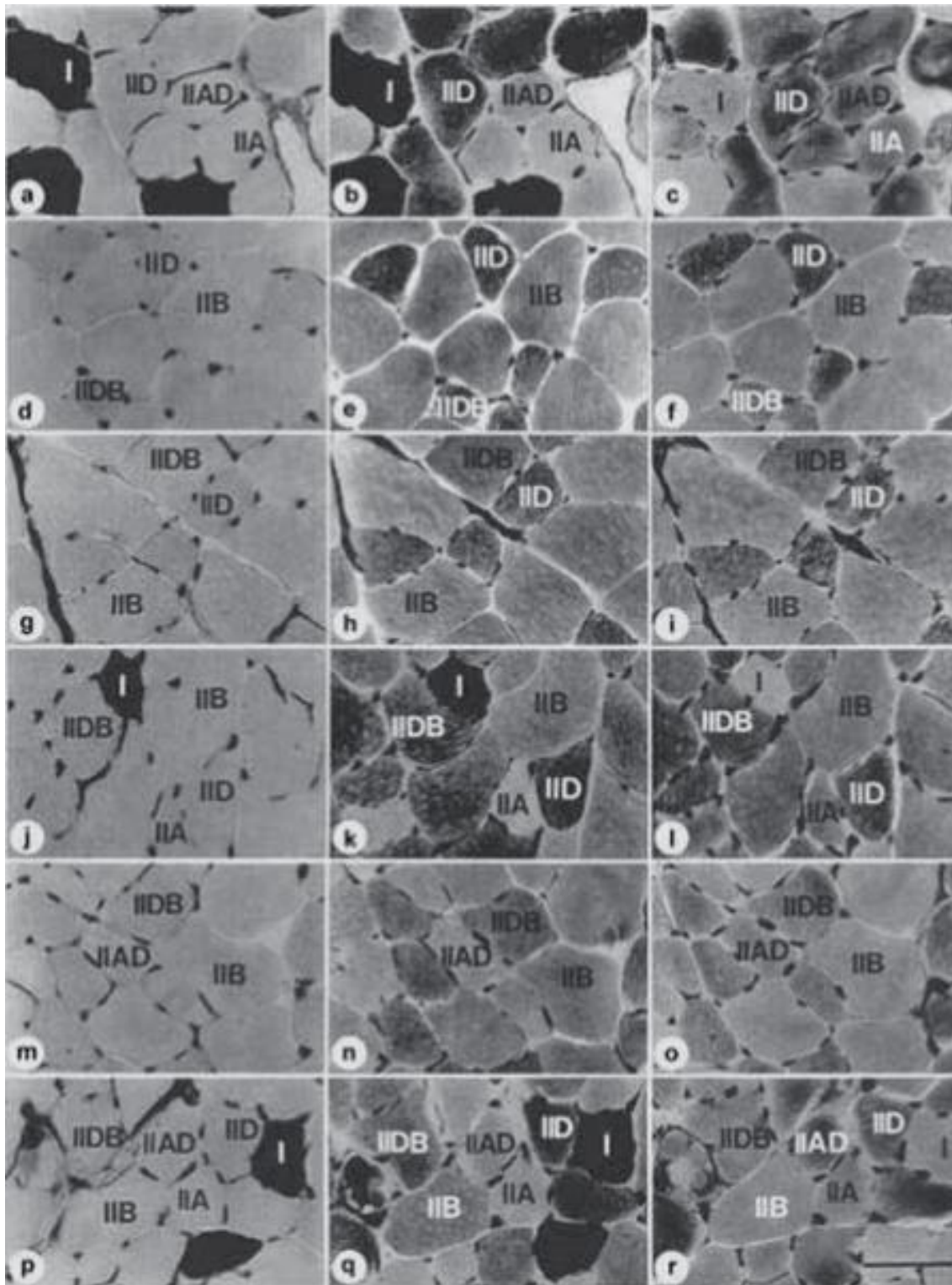


Figura I-2. Seccions transversals seriades dels músculs soli (a-c) i EDL (d-f), àrea

superficial del TA (g-i), àrea profunda del TA (j-l), àrea superficial del gastrocnemi (m-o) i àrea profunda del gastrocnemi (p-r). Els tipus de fibra s'indiquen com a I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB i IIB. El regle de calibratge (r, 50 µm) és vàlid per a les imatges a-r. Imatge obtinguda d'Augusto et al., 2004.

Al múscul TA de les rates, les unitats motores es troben organitzades de manera que les fibres més grans, que expressen l'MyHC de tipus IIb, es localitzen en la regió superficial del múscul, mentre que les fibres més petites, que expressen la isoforma d'MyHC de tipus IIA, es localitzen en la regió més profunda del múscul (Larsson et al., 1991). Durant el procés d'envelliment, hi ha una transició de la miosina de les fibres de contracció ràpida (de tipus IIb) cap a les de contracció lenta (Pettigrew and Gardiner, 1987; Larsson et al., 1993, 1995), mentre que les fibres que expressen la isoforma de tipus IIx de l'MyHC es localitzen en les regions que ocupaven les fibres de tipus IIb en els animals joves (Larsson et al., 1991). A més, s'ha observat que els animals vells presenten fibres musculars que expressen diverses isoformes de l'MyHC, mentre que en els animals joves les fibres mantenen una expressió de les isoformes de l'MyHC homogènia (Larsson et al., 1991). Aquesta heterogeneïtat present en les fibres dels animals vells podria ser deguda a la reinnervació que es dona en els músculs d'aquests animals amb un defecte en la transició de l'MyHC.

A més, ha estat descrit que també hi ha una transició de les fibres de tipus ràpid cap a les de tipus lent en els homes sedentaris d'edats compreses entre els 22 i els 65 anys (Larsson et al., 1978) així com en edats més avançades (Scelsi et al., 1980; Jakobsson et al., 1988; Monemi et al., 1998; Short et al., 2005; Haus et al., 2007; Hvid et al., 2014). Aquests canvis concorden amb una disminució dels nivells d'àcid ribonucleic missatger (en anglès, *messenger ribonucleic acid* [mRNA]) de les isoformes de contracció ràpida de l'MyHC que s'observa durant l'envelliment en els músculs de les extremitats en humans, mentre que els nivells d'mRNA de les isoformes de contracció lenta de l'MyHC no es veuen alterats durant l'envelliment (Brody, 1976; Welle et al., 2000; Balagopal et al., 2001; Short et al., 2005). A més, en humans també s'han descrit transicions de les fibres de contracció ràpida a les de contracció lenta al múscul esternocleidomastoideu, un múscul que no es veu tan greument afectat

pels canvis relacionats amb l'envelliment, similars a les observades en els músculs de les extremitats (López *et al.*, 2004). No obstant això, altres estudis no han descrit aquesta conversió de fibres ràpides a fibres lentes durant l'envelliment en humans (Jakobsson *et al.*, 1988; Klitgaard *et al.*, 1990; Monemi *et al.*, 1998; D'Antona *et al.*, 2003); aquestes diferències entre els resultats obtinguts en els diferents estudis podrien ser com a conseqüència de les diferències en els nivells d'activitat física dels individus analitzats, ja que aquests interfereixen en els canvis a nivell muscular relacionats amb l'envelliment (Larsson, 1982a, 1983; Larsson and Ansved, 1995; Canepari *et al.*, 2010). En canvi, els estudis realitzats amb models animals, on els factors ambientals no tenen una influència tan gran com en els humans i són més fàcils de controlar, sí que hi ha un concens amb aquesta transició de fibres ràpides a fibres lentes durant l'envelliment (Bass *et al.*, 1975; Larsson, 1978; Caccia *et al.*, 1979; Larsson and Edström, 1986; Pettigrew and Gardiner, 1987; Edström and Larsson, 1987; Kovanen and Suominen, 1987; Larsson and Ansved, 1988; Boreham *et al.*, 1988; Ansved and Larsson, 1989, 1994; Kanda and Hashizume, 1989; Larsson *et al.*, 1991, 1993; Sugiura *et al.*, 1992; Einsiedel and Luff, 1992; Larsson and Yu, 1997; Lowe *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2012; Tamaki *et al.*, 2014). Aquesta transició cap a unes fibres de contracció lenta durant l'envelliment provoca una disminució de la capacitat i de la velocitat del moviment i una disminució de la força, ja que són les fibres de contracció ràpida les que tenen una major capacitat de generar la força muscular. No obstant això, cal dir que aquests canvis en la tipologia de fibres durant l'envelliment en humans no són molt grans (Larsson and Ansved, 1995).

2.2. Localització nuclear

Donat el fet que les fibres musculars són les cèl·lules més llargues del cos humà, de fins a diversos centímetres de llarg, i que tenen uns citoplasmes grans, contenen centenars o, fins i tot, milers de nuclis (mionuclis) per tal de mantindre aquests citoplasmes. Aquests nuclis es troben normalment a la perifèria de la fibra muscular, just per sota del sarcolema, però en condicions patològiques s'hi pot observar una localització central; també s'ha descrit que moltes de les fibres musculars dels individus vells mostren nuclis situats al centre de les fibres (Tomonaga, 1977; Kang *et al.*, 2007) com a resultat d'un

procés de necrosi dels músculs en què la fibra muscular degenera i és fagocitada per les cèl·lules del sistema immune (Kelley et al., 1994). Els mionuclis es troben dispersats al llarg de tota la fibra muscular excepte a les unions neuromusculars (en anglès, *neuromuscular junctions* [NMJs]) i als extrems miotendinosos, on es troben agrupats i hi tenen funcions especialitzades (Moscoso et al., 1995; Crosbie et al., 1999). Al fet que els nuclis es trobin distribuïts al llarg de tota la fibra se li ha donat diverses possibles explicacions: que els nuclis es desplacin segons les forces de repulsió entre ells per tal d'optimitzar i minimitzar les distàncies de transport (Bruusgaard et al., 2003, 2006) o que sigui degut a les forces d'atracció entre la microvasculatura que envolta les fibres musculars, sobretot en les fibres de contracció lenta, junt amb les forces de repulsió entre els mionuclis i la desmina, un filament citoplàsmic de tipus intermedi (Nguyen et al., 2002; Ralston et al., 2006). Cadascun d'aquests mionuclis s'encarrega de regular els productes gènics d'un volum determinat anomenat domini mionuclear (en anglès, *myonuclear domain* [MND]) (Landing et al., 1974; Cheek, 1985; Hall and Ralston, 1989; Pavlath et al., 1989; Allen et al., 1996, 1999). La mida de l'MND, que és crítica per al funcionament i l'adaptabilitat de la cèl·lula muscular, pot canviar en resposta a l'atròfia o a la hipertròfia musculars i a l'envelliment (Bruusgaard et al., 2003, 2006) i es veu modificada per diversos fenòmens: i) la tipologia de fibres (segons la isoforma de l'MyHC) (Tseng et al., 1994; Kasper and Xun, 1996; Allen et al., 1999; Roy et al., 1999), ja que les fibres musculars oxidatives de contracció ràpida tenen uns MNDs més petits que les fibres glicolítiques i unes taxes de síntesi proteica i de degradació més altes que les fibres de contracció lenta (Lewis et al., 1984; Edgerton and Roy, 1991; Van Wessel et al., 2010; Ochala et al., 2011); ii) l'activitat mitocondrial (Liu et al., 2009); o iii) l'espècie (segons la mida corporal, ja que s'ha vist que hi ha diferències significatives en la mida dels MNDs entre diferents mamífers degut al fet que els mamífers d'una mida més gran tenen uns ratis de demanda metabòlica i de recanvi proteic més baixos que els dels animals més petits) (Liu et al., 2009). A més, ha estat demostrat que, en situacions d'hipertròfia, hi ha un augment del nombre de nuclis a través de l'activació de les cèl·lules satèl·lit (en anglès, *satellite cells* [SCs]) per tal de mantenir estable la mida de l'MND (Roy et al., 1999; Bruusgaard et al., 2003, 2006, 2010). D'altra banda,

s'ha vist que, en situacions d'atròfia muscular després de la denervació del múscul, els nuclis no es perden de manera proporcional a aquesta atròfia, de manera que, finalment, queda un MND amb una mida menor en resposta a l'atròfia, el que servirà com a memòria per al múscul en rebre posteriorment els estímuls d'hipertròfia (Bruusgaard *et al.*, 2010).

Pel que fa a l'envelliment, s'han publicat resultats contradictoris en diferents estudis en relació a la mida de l'MND: s'ha descrit tant que hi ha un augment de la mida de l'MND (Kadi *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2009) com que aquesta es manté invariable amb l'envelliment, tant en rates com en humans (Manta *et al.*, 1987; Putman *et al.*, 2001; Sultan *et al.*, 2001; Gallegly *et al.*, 2004). Aquestes diferències podrien ser degudes als diferents mètodes utilitzats en els diversos estudis i a llurs limitacions; a més, les diferents formes que presenten els nuclis (les quals varien durant l'envelliment) poden portar a errors a l'hora de calcular els canvis en la mida de l'MND relacionats amb l'envelliment quan les mesures es fan en talls transversals i s'assumeix que els nuclis tenen unes mides i longituds constants (Cristea *et al.*, 2010) i a vegades es fa difícil distingir aquests mionuclis dels altres nuclis presents a la fibra muscular (Brack *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Cristea *et al.*, 2010). No obstant això, en estudis 3D s'han pogut fer anàlisis al llarg de tota la fibra muscular en ratolins i s'ha demostrat que, tant en el soli, que és un múscul de contracció lenta, com en l'EDL, que n'és un de contracció ràpida, es produeixen diversos canvis relacionats amb l'envelliment com ara un menor nombre de mionuclis, un augment dels que es troben fragmentats, mionuclis amb unes formes menys estables, una major atròfia en les fibres dels músculs de contracció ràpida, i un deteriorament de la distribució ordenada dels mionuclis amb l'envelliment, el que podria venir donat per canvis en la xarxa dels miotúbuls (Bruusgaard *et al.*, 2006). Pel que fa als humans, ha estat descrit que la forma dels mionuclis no depèn de la tipologia de fibres (Cristea *et al.*, 2010) i que s'hi observen fenòmens d'agregació de mionuclis, tant en humans (Brack *et al.*, 2005) com en rosegadors (Bruusgaard *et al.*, 2006). Aquesta agregació es dona en resposta a la denervació (Viguie *et al.*, 1997), així que els processos de denervació i reinervació que s'han observat durant l'envelliment i que es donen tant en rosegadors com en humans (Larsson and Ansved, 1995) podrien ser el que

provocaria aquesta agregació mionuclear en els individus vells (Cristea *et al.*, 2010). D'altra banda, s'ha observat una petita disminució de l'MND amb l'envelliment en les fibres de la isoforma IIa de l'MyHC, tot i que la mida global de l'MND en les fibres de la isoforma I de l'MyHC no es veu afectada per l'envelliment, amb un augment de la variació de les mides dels MNDs entre els individus vells independentment del gènere. El fet que aquests MNDs siguin més petits en les fibres que expressen les isoformes IIa de l'MyHC podria tenir relació amb una adaptació fisiològica a l'atròfia que s'observa preferentment a les fibres musculars de tipus II en l'envelliment (Tomonaga, 1977; Larsson *et al.*, 1978; Scelsi *et al.*, 1980). En els músculs dels ratolins vells, l'augment de la variabilitat de la mida de l'MND ve donada per una pèrdua d'SCs i per un reemplaçament nuclear deficient (Brack *et al.*, 2005). L'acumulació de mitocondris disfuncionals i l'augment de l'estrès oxidatiu es donen de forma localitzada al llarg de tota la fibra muscular, i no de manera homogènia (Wanagat *et al.*, 2001; Oldfors *et al.*, 2006). Així doncs, les regions amb un MND amb una mida reduïda contenen una baixa concentració de proteïnes contràctils, el que fa que hi hagi una deficiència en la renovació proteica, que es vegi afectada la capacitat de la generació de la força (Larsson *et al.*, 1997; D'Antona *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2006; Cristea *et al.*, 2010), i que es donin modificacions post-traslacionals en les proteïnes amb un recanvi lent com ara en les proteïnes contràctils de les fibres musculars que expressen la isoforma de tipus I de l'MyHC (Xiaopeng and Larsson, 1996; Larsson *et al.*, 1997; Höök *et al.*, 2001; Ramamurthy *et al.*, 2001). A més, cada mionucli pot mantenir la seva funcionalitat de manera eficient en un volum limitat (Qaisar *et al.*, 2012), i en les fibres musculars dels individus vells es troben àrees que han excedit el seu volum i que poden tenir conseqüències negatives per al bon funcionament del múscul.

2.3. Mitocondris

Els mitocondris són uns orgànuls intracel·lulars que tenen un paper essencial en la vida i la mort de les cèl·lules, produeixen trifosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine triphosphate* [ATP]) cel·lular a través de la fosforilació oxidativa, són essencials per a la termogènesi i per al control de l'homeòstasi del calci i són un element clau en la via intrínseca de l'apoptosi, la mort cel·lular programada;

tots aquests processos es troben interconnectats i estan altament regulats (Bruusgaard *et al.*, 2006). Als mitocondris també es dona la betaoxidació de lípids, una part del cicle de la urea, i s'hi troben diversos enzims implicats en el metabolisme dels aminoàcids.

Els mitocondris tenen el seu propi genoma, l'àcid desoxiribonucleic (en anglès, *deoxyribonucleic acid* [DNA]) mitocondrial (mtDNA), que és diferent al genoma nuclear (en anglès, *nuclear DNA* [nDNA]) i que s'assembla als cromosomes bacterians donat el fet que els mitocondris deriven dels antics bacteris Gram-negatius que van iniciar un procés d'endosimbiosi amb el progenitor de les cèl·lules eucariotes fa uns 2000 milions d'anys (Andersson *et al.*, 1998); de fet, els mitocondris encara mantenen característiques del seu progenitor bacterià, com ara les seves dues membranes que els embolcallen (una membrana externa permeable i una membrana interna altament impermeable on es produeix l'ATP) (Emma *et al.*, 2016).

L'mtDNA no està organitzat en cromatina i és circular, té un codi genètic propi on els gens no es troben interromputs per introns i les seqüències no codificants formen menys del 5 % del total del genoma; en cada mitocondri, n'hi ha múltiples còpies. L'mtDNA es transmet només de la mare, ja que el DNA patern és eliminat del zigot; el fet que en cada mitocondri es trobin múltiples genomes fa que en cada fibra muscular hi pugui haver centenars de milers de còpies d'mtDNA de manera que, si hi ha alguna mutació, poden coexistir mtDNA *wild type* i mutant en una mateixa cèl·lula.

Diversos estudis han descrit que, amb l'envelliment, l'mtDNA sofreix diverses alteracions. L'mtDNA dels músculs esquelètics acumula reordenaments a gran escala: delecions (Katayama *et al.*, 1991), duplicacions, i altres alteracions (Tengan and Moraes, 1998) del genoma mitocondrial durant l'envelliment. Tot i que es desconeixen els mecanismes exactes pels quals l'mtDNA sofreix aquestes alteracions, s'ha pogut descriure que s'hi veuen implicats els errors de la polimerasa (Baumer *et al.*, 1994), en la replicació (Schon *et al.*, 1988; Shoffner *et al.*, 1989) o en la recombinació homòloga, trencaments de la doble cadena o defectes en els mecanismes de reparació (Bua *et al.*, 2006; Meissner *et al.*, 2006). D'aquesta manera, a través de l'expansió clonal dels mitocondris,

aquests van acumulant genomes anormals i les fibres musculars queden plenes de mitocondris disfuncionals. Durant l'envelliment, els músculs poden arribar a acumular un 90 % de mitocondris amb els seus genomes mutats, fent que aquestes fibres siguin deficientes en el procés de la respiració cel·lular (Murdock *et al.*, 2000). No obstant això, només una petita part d'aquests músculs són deficientes en la respiració cel·lular (del 5 al 14 % segons l'estudi) (Bua *et al.*, 2006; Rygiel *et al.*, 2016; Brocca *et al.*, 2017), i les seves fibres no són més petites que les que contenen mitocondris normals (Rowan *et al.*, 2011), de manera que sembla ser que aquestes alteracions no tenen un gran impacte en el correcte funcionament del múscul. Ara bé, en un model de ratolí que conté una polimerasa d'àcid ribonucleic mitocondrial (en anglès, *mitochondrial ribonucleic acid* [mtRNA]) que presenta defectes en la correcció d'errors, s'ha demostrat que s'acumulen una gran quantitat de mutacions puntuals a l'mtDNA que provoquen un envelliment prematur i atròfia muscular (Trifunovic *et al.*, 2004), tot i que el fenotip muscular d'aquests ratolins no és com el dels ratolins envellits de forma natural (mostren un augment de l'estrès oxidatiu [Trifunovic *et al.*, 2005; Kujoth *et al.*, 2006], un augment de la fissió i de l'autofàgia mitocondrials i una disminució de l'activitat dels enzims de la cadena respiratòria), mentre que en els ratolins vells normals el que s'observa és un augment de la fusió mitocondrial, amb una disminució de l'autofàgia i una activitat normal dels enzims de la cadena respiratòria (Mito *et al.*, 2015). D'altra banda, en un estudi realitzat en els membres de 3 generacions (àvies, mares i nétes) en 18 famílies s'ha descrit que no hi ha un augment significatiu de la taxa de mutacions a l'mtDNA, però sí que hi ha una disminució del nombre de còpies de l'mtDNA al múscul amb l'envelliment, que s'acompanya d'una disminució en el funcionament mitocondrial (Hebert *et al.*, 2015). Aquesta disminució del nombre de còpies de l'mtDNA relacionada amb l'envelliment ha estat descrita en diversos estudis realitzats tant en humans (Short *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2008; Wachsmuth *et al.*, 2016; Robinson *et al.*, 2017) com en un model equí (Li *et al.*, 2018); en condicions d'atròfia neurogènica severa, com és el cas dels pacients amb atròfia muscular espinal (en anglès, *spinal muscular atrophy* [SMA]), també s'ha observat una reducció del nombre de còpies d'mtDNA al múscul (Berger *et al.*, 2003). Altres estudis també han descrit que amb l'envelliment s'acumulen mutacions en la regió no codificant de l'mtDNA

(Hebert *et al.*, 2015; Wachsmuth *et al.*, 2016), sobretot en la posició 408, tot i que no s'ha pogut demostrar que aquestes afectin la replicació de l'mtDNA.

La mitofàgia és un procés altament especialitzat mitjançant el qual els mitocondris defectuosos són eliminats i reciclats (Rygiel *et al.*, 2016) i en què hi participen certes proteases que degraden selectivament les proteïnes danyades o mal plegades. Aquells mitocondris que presenten fragmentacions o que són massa petits formen una doble membrana a través de la qual generen un autofagosoma i són encapsulats; posteriorment, aquest autofagosoma es fusiona amb un lisosoma (Kim *et al.*, 2007) (Figura I-3).

El sistema ubiquitina-proteasoma, situat al citosol, també està implicat en la degradació de diverses proteïnes de membrana i de l'espai intermembrana. Ambdós processos s'encarreguen de mantenir un control de qualitat i de prevenir l'atròfia muscular. El procés de mitofàgia és indispensable per al manteniment de la massa muscular; el *knockout* (KO) al múscul d'un gen essencial en el procés de mitofàgia, el gen relacionat amb l'autofàgia 7 (en anglès, *autophagy-related gene 7* [*Atg7*]), provoca atròfia, una disminució de la força i una pèrdua de massa muscular. Els músculs afectats mostren una acumulació de mitocondris defectuosos i estructures membranoses concèntriques aberrants, una distensió del reticle sarcoplasmàtic i una desorganització dels sarcòmers (Masiero *et al.*, 2009). Aquesta acumulació de mitocondris disfuncionals pot desencadenar una via de senyalització proapoptòtica que promou l'atròfia muscular. En els músculs d'individus vells, ha estat descrit que aquests mostren un augment dels processos apoptòtics (Marzetti and Leeuwenburgh, 2006).

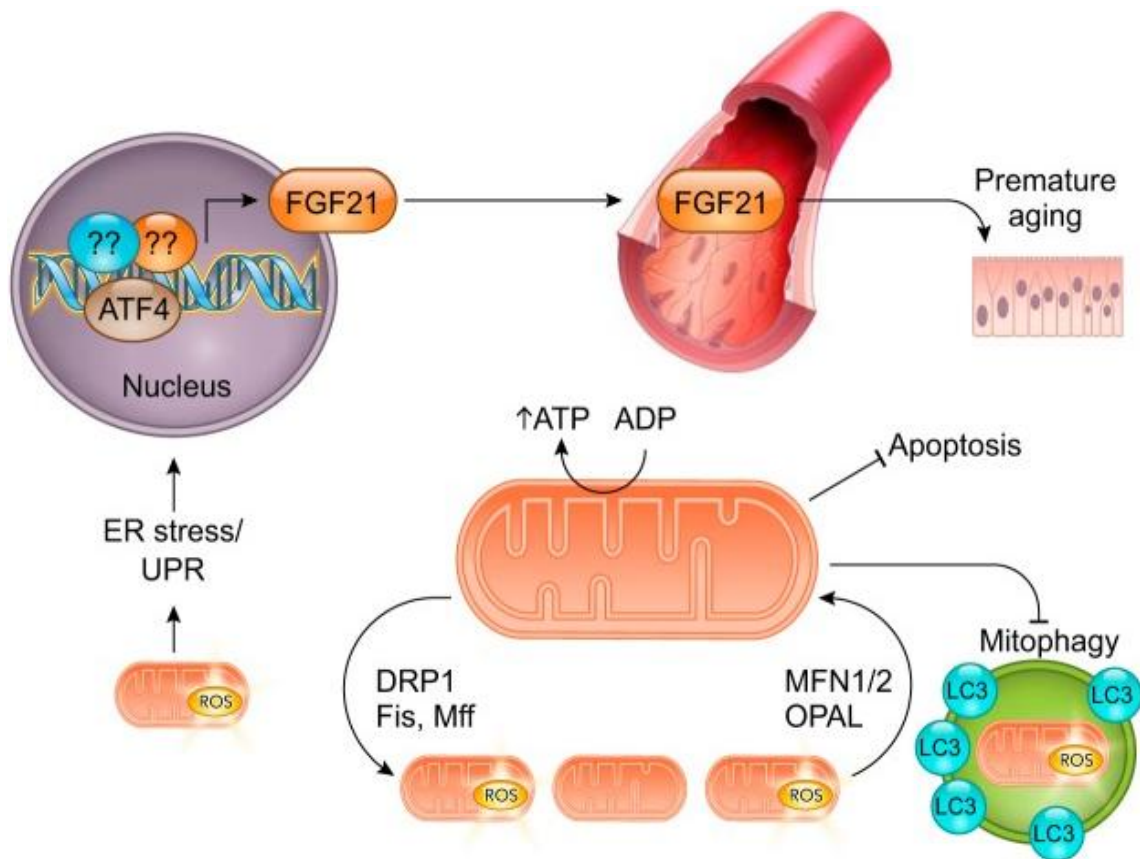


Figura I-3. Processos cel·lulars i biològics mitocondrials. Les mitofusines 1 i 2 (MFN1/2) i l'OPA1 promouen la fusió mitocondrial per generar una xarxa mitocondrial més allargada que optimitza la producció d'energia, prevé l'apoptosi i redueix la mitofàgia. DRP1, Mff i Fis promouen la fissió mitocondrial per tal de generar una xarxa mitocondrial fragmentada i, d'aquesta manera, promouen la mitofàgia per eliminar els mitocondris disfuncionals, però també indueix la producció d'espècies reactives de l'oxigen (en anglès, *reactive oxygen species* [ROS]) que provoquen l'estrès del reticle endoplasmàtic (en anglès, *endoplasmic reticulum* [ER]) i l'activació de la resposta a proteïnes mal plegades (en anglès, *unfolded protein response* [UPR]). L'UPR indueix la regulació d'FGF21, a través d'ATF4, que és secretat pel múscul i provoca una senescència prematura del teixit epitelial. Figura obtinguda de Larsson et al., 2019.

Per tal de mantenir la massa muscular, també és essencial que hi hagi un balanç ben regulat entre els processos de fusió i fissió. En models murins ha estat descrit que, amb l'envelliment, hi ha un augment de la fusió i/o una disminució de la fissió (Leduc-Gaudet *et al.*, 2015); no obstant això, un augment en la fissió també resulta en una disminució de la massa muscular, dificultats per realitzar exercici i modificacions en la xarxa mitocondrial (Touvier *et al.*, 2015).

2.3.1. PGC-1 α

El factor transcripcional coactivador del receptor γ 1 α activat pel proliferador de peroxisomes (en anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α* [PGC-1 α]) és el principal regulador del procés de biogènesi mitocondrial (Lin *et al.*, 2013). Diversos sensors metabòlics com la sirtuïna 1 (SIRT1), la proteïna cinasa associada al mitogen p38 (en anglès, *mitogen-associated protein kinase p38* [p38MAPK]) i la proteïna cinasa activada per adenosina monofosfat (en anglès, *adenosine monophosphate activated protein kinase* [AMPK]) activen el PGC-1 α al citoplasma i indueixen la seva translació tant cap al nucli com cap als mitocondris, on regula la transcripció dels gens codificats per l'nDNA i l'mtDNA així com la replicació de l'mtDNA (Safdar *et al.*, 2011). SIRT1 forma part de la família de les sirtuïnes, un grup de proteïnes desacetilases, i és dependent de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD)⁺. Es troba predominantment al nucli, però també es pot trobar al citosol, ja que es pot transportar entre aquests dos compartiments (Lin *et al.*, 2018). Un augment en els nivells intracel·lulars de NAD⁺ estimula l'activitat de SIRT1, la qual desacetila, entre altres molècules, PGC-1 α (Sephrose *et al.*, 2005). Per tal que es doni aquesta desacetilació, PGC-1 α ha de ser prèviament fosforilat per AMPK (Cantó *et al.*, 2010), la qual és activada en situacions d'un alt ràtio de monofosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine monophosphate* [AMP])/ATP (Moore *et al.*, 1991). Un cop el PGC-1 α està activat, indueix l'expressió dels factors de respiració nuclear 1 i 2 (en anglès, *nuclear respiratory factors 1 and 2* [NRF-1 i NRF-2]), i interactua amb NRF1 i coactiva la seva funció transcripcional al promotor del factor transcripcional mitocondrial A (en anglès, *mitochondrial transcription factor A* [TFAM]) (Wu *et al.*, 1999). Alhora, TFAM promou la transcripció de l'mtDNA, però també és important per a la replicació i l'empaquetament de l'mtDNA (Kang *et al.*, 2018). Així doncs, mutacions en TFAM provoquen una forma severa de la síndrome de depleció de l'mtDNA (en anglès, *mtDNA depletion syndrome* [MDS]) hepatocerebral (Stiles *et al.*, 2016), que afecta el nombre de còpies d'mtDNA.

La sobre-expressió de PGC-1 α provoca un augment de la massa mitocondrial (Wu *et al.*, 1999). No obstant això, ha estat descrit que el PGC-1 α no és l'únic regulador d'aquest procés, ja que en ratolins KO específics per a PGC-1 α al

múscul esquelètic s'ha observat una biogènesi mitocondrial induïda amb l'exercici (Rowe *et al.*, 2012). La deleció simultània al múscul esquelètic de PGC-1 α i β (una proteïna relacionada que també pot activar la biogènesi mitocondrial) té un efecte sinèrgic i provoca una gran disfunció mitocondrial (Arany *et al.*, 2007; Zechner *et al.*, 2010).

S'ha vist que l'exercici podria reduir els efectes de l'envelliment en la biogènesi mitocondrial, ja que s'ha descrit que els nivells de PGC-1 α es veuen disminuïts en els individus sedentaris i que l'exercici físic pot augmentar la seva expressió. A més, s'ha demostrat que la disfunció mitocondrial relacionada amb l'envelliment es pot recuperar amb l'exercici aeròbic a través de la reversió de l'alteració del proteasoma mitocondrial al múscul (Robinson *et al.*, 2017).

D'altra banda, també s'ha relacionat el PGC-1 α amb el manteniment de l'NMJ a través de la modulació de la mitofàgia induïda per la denervació al múscul esquelètic (Vainshtein *et al.*, 2015) i del seu paper protector a les neurones després de dany axonal (O'Donnell *et al.*, 2013). A més, ha estat descrit que l'augment dels nivells de PGC-1 α per part de la quinona quinolona, un antioxidant implicat en la modulació mitocondrial, prevé l'atròfia muscular induïda per la denervació (Kuo *et al.*, 2015). També s'ha descrit que la denervació provoca un augment de la sensibilitat en la permeabilitat de la transició mitocondrial (Spendiff *et al.*, 2016).

Donat el fet que les diferents funcions mitocondrials com ara la mitofàgia, la biogènesi o l'apoptosi estan estretament connectades, sembla ser que totes elles participen en el procés d'envelliment fisiològic i que podrien representar uns potencials objectius terapèutics.

2.3.2. ATP5A

La sintasa ATP alfa (en anglès, *ATP synthase alpha* [ATP5A]) de membrana mitocondrial produeix ATP a través de difosfat d'adenosina (en anglès, *adenosine diphosphate* [ADP]) en presència d'un gradient de protons a través de la membrana que és generat pels complexos de transport electrònic de la cadena respiratòria. Diversos estudis han demostrat que el J147, un fàrmac que té com a diana l'ATP5A, provoca un aliberament del calci intracel·lular en diferents models murins d'Alzheimer que porta a una activació de la via

AMPK/mTOR (la molècula diana de la rapamicina en mamífers; de l'anglès, *mamalian target of rapamycin*), que és un mecanisme canònic de longevitat (Goldberg *et al.*, 2018; Larrick *et al.*, 2018); també s'ha vist que la supressió parcial de la cadena de transport d'electrons en *C. Elegans* (Tsang *et al.*, 2001; Dillin *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003) i que l'ús de J147 en drosophila (Goldberg *et al.*, 2018) provoquen una expansió de les seves esperances de vida.

2.4. Cèl·lules satèl·lit (SCs)

Un altre factor que pot promoure la sarcopènia és l'acumulació gradual del microdany que ha estat reparat de forma incompleta (Faulkner *et al.*, 1995). Aquesta reparació requereix l'activació de les SCs (Hawke and Garry, 2005) i ha estat descrit que hi ha una disminució tant del seu nombre com de la seva capacitat per proliferar i diferenciar-se amb l'envelliment, el que contribueix a la sarcopènia (Degens, 2010). Tal com s'ha vist en l'atròfia que es produeix durant les isquèmies prolongades (Devece and Egginton, 2002) o en la fatiga muscular que s'observa durant la isquèmia aguda (Wüst *et al.*, 2008), un subministrament sanguini adient és important per a la mida i les funcions dels músculs.

Les SCs quiescents es troben en un nínxol situat entre la membrana cel·lular i la làmina basal. Aquest nínxol conté miofibres, factors de creixement, proteïnes de la matriu extracel·lular (MEC), macròfags, cèl·lules T reguladores, etc (Almada and Wagers, 2016). Les SCs representen una població de cèl·lules mare específiques del múscul i la seva activació indueix els processos de reparació i regeneració musculars, de manera que les SCs entren al cicle cel·lular i hi promouen la proliferació de precursors miogènics que es diferencien i es fusionen amb les fibres musculars existents o formen noves fibres musculars (Yin *et al.*, 2013; von Maltzahn *et al.*, 2015). El factor transcripcional *paired box 7* (PAX7) és un marcador d'SCs i és un important regulador del procés de reparació (Seale *et al.*, 2000; Günther *et al.*, 2012; von Maltzahn *et al.*, 2013).

Durant l'envelliment, al múscul esquelètic s'ha descrit que es donen canvis tant quantitius com qualitius a les SCs que afecten la seva capacitat per regenerar els músculs: hi ha una disminució del ~65 % en el nombre d'SCs

(Brack *et al.*, 2005; Cosgrove *et al.*, 2014), un augment del dany al DNA, una disminució en la capacitat antioxidant i alteracions en l'expressió gènica (Brack and Muñoz-Cánoves, 2016). Aquesta disminució en la capacitat de regeneració muscular durant l'envelliment ha estat relacionada amb dèficits en les funcions de les SCs (Casarin *et al.*, 2012; Cerutti *et al.*, 2014; Cosgrove *et al.*, 2014). No obstant això, no s'han descrit diferències en la mida ni en el nombre de les fibres musculars, en la força de les fibres o en el nombre de mio nuclis entre ratolins vells control i els manipulats genèticament amb una depleció de les SCs que provoca la seva pèrdua fins a un nivell que impedeix la regeneració en adults al llarg de tota la seva vida (Cantó *et al.*, 2010). Així doncs, sembla ser que en els ratolins que no han estat debilitats amb un dany muscular durant l'envelliment, les SCs no influeixen en la pèrdua de massa muscular o de les seves funcions, com per exemple la sarcopènia. Ara bé, sí que s'ha observat un augment del col·lagen muscular i de la fibrosi durant l'envelliment en els ratolins amb una depleció de les SCs, el que indica que aquesta pèrdua d'SCs relacionada amb l'envelliment podria contribuir a la fibrosi muscular en edats avançades (Cantó *et al.*, 2010).

La inflamació, considerada un marcador d'envelliment, ha estat associada amb la fragilitat geriàtrica, la disminució de la força muscular i la incapacitat de respondre a l'estrès (Michaud *et al.*, 2013). Ha estat descrit que nivells elevats de citoquines proinflamàtores regulen les funcions de les SCs a través de la via JAK/STAT (cinasa janus/transductor de senyal i activador de la transcripció; en anglès, *janus kinase/signal transducer and activator of transcription*), i que la inhibició d'aquesta via millora la funció de les SCs, essent així una potencial diana terapèutica per al tractament de la sarcopènia (Pauff and Miller, 2012; Price *et al.*, 2015); els inhibidors de JAK fan disminuir l'acumulació de teixit adipòs relacionada amb l'envelliment, la fragilitat i la inflamació (Xu *et al.*, 2015). Així doncs, donat el fet que les cèl·lules senescentes contribueixen a la inflamació relacionada amb l'envelliment, la inhibició de la via JAK/STAT podria inhibir els efectes negatius de la via sobre les funcions de les SCs (Pauff and Miller, 2012; Price *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015). Diferents estratègies basades en millorar o alterar les funcions de les SCs poden millorar les deficiències relacionades amb l'envelliment en la capacitat regenerativa del múscul

esquelètic després de patir lesions repetides i reduir la fibrosi muscular relacionada amb l'envelliment.

2.5. Lipofuscina

El nom de lipofuscina ve del grec *lipo* (greix) i del llatí *fuscus* (fosc) i és una substància polimèrica intralisosomal formada principalment per residus de proteïnes reticulars que es formen com a resultat de diversos processos oxidatius catalitzats pel ferro. Es tracta d'una substància que comença a acumular-se immediatament des del naixement i que ho continua fent en major o menor grau durant tota la vida (Farin and Porta, 2002) i que no es pot degradar ni eliminar mitjançant exocitosi, de manera que la seva acumulació a les cèl·lules postmitòtiques és inevitable, mentre que les cèl·lules proliferatives la dilueixen de manera eficient durant la divisió (Terman, 2001); no obstant això, si s'inhibeix la proliferació de les cèl·lules actives mitòtiques normals, la lipofuscina comença a acumular-s'hi (Brunk *et al.*, 1973; Terman and Brunk, 1998). A més, la lipofuscina és un fluorocrom i pot sensibilitzar els lisosomes a la llum visible, el que és potencialment important per a la patogènesi de la degeneració macular relacionada amb l'edat. El ferro associat a la lipofuscina sensibilitza els lisosomes a l'estrès oxidatiu, posant en perill l'estabilitat lisosomal i provocant apoptosi a causa de l'alliberament del contingut lisosomal. L'acumulació de lipofuscina també pot disminuir la capacitat autofagocítica actuant com a dipòsit d'enzims lisosomals de nova producció i, per tant, interferir amb el reciclatge dels components cel·lulars.

L'acumulació de lipofuscina (que és un material marró groguenc, autofluorescent i electrodens) a les cèl·lules postmitòtiques, com ara les neurones, els miòcits cardíacs, les fibres musculars esquelètiques o les cèl·lules epitelials pigmentàries de la retina, és un segell reconegut de l'envelliment que es produeix amb una taxa inversament relacionada amb la longevitat; de fet, la lipofuscina també és coneguda amb el nom d'"el pigment de l'edat", ja que la quantitat de lipofuscina augmenta amb l'edat (Strehler *et al.*, 1959) i perquè el seu rati d'acumulació es correlaciona de forma negativa amb la longevitat (Munnell and Getty, 1968; Nakano and Gotoh, 1992; Hosokawa *et al.*, 1994; Sheehy *et al.*, 1995); així doncs, es tracta d'un fiable biomarcador per a l'edat de les cèl·lules, com ara les neurones i, per tant, també dels seus

hostes. A més, en certes patologies com ara les malalties d'emmagatzematge lisosomal (com és el cas de la lipofuscinosi ceroide neuronal o de la malaltia de Batten), els tumors, les lesions induïdes per radiació o la desnutrició també s'associen amb una acumulació d'un pigment lisosomal amb unes propietats similars a les de la lipofuscina anomenat ceroide o lipofuscina de tipus ceroide (Terman and Brunk, 1998).

Dins els grànuls de lipofuscina, s'observa la presència de diversos compostos, principalment d'origen lipídic (que inclou triglicèrids, àcids grassos lliures, colesterol, fosfolípids, dolicol i dolicol fosforilat) i proteic (amb una gran varietat d'aminoàcids), amb un 30-70 % de lípids, un 20-50 % de proteïnes, només un 4-7 % de carbohidrats (Terman and Brunk, 1998) i alguns metalls com ara coure, zinc i, especialment, ferro (Brun and Brunk, 1970; Brunk, 1989; Jolly *et al.*, 1995).

La lipofuscina pot ser detectada a través de diverses tècniques immunohistoquímiques, com ara la tinció de lípids (amb negre Sudan, blau de Nil, OsO_4 , etc) o de carbohidrats (amb àcid periòdic Schiff o lectines) (Montserrat *et al.*, 1995). També es pot detectar mitjançant microscòpia electrònica, on els grànuls de lipofuscina es mostren com a cossos osmòfils, la major part d'ells perinuclears i de formes irregulars, amb una densitat electrònica variable i envoltats d'una membrana típica lisosomal (Miyagishi *et al.*, 1967; Brunk and Ericsson, 1972). A més, gràcies a l'autofluorescència de la lipofuscina, aquesta pot ser detectada en forma de grànuls en mostres morfològiques no tenyides a través de tècniques de fluorescència o amb microscòpia d'escaneig làser mitjançant llums d'excitació a diferents longituds d'ona en combinació amb diferents filtres barrera (Figura I-4). No obstant això, aquesta mateixa autofluorescència pot suposar un problema a l'hora d'estudiar cèl·lules que contenen lipofuscina mitjançant tècniques de tinció fluorescentes com són els mètodes d'immunofluorescència; en aquests casos, la brillantor del fluorocrom utilitzat per a la tinció hauria de ser considerablement superior a la dels grànuls de lipofuscina (Terman *et al.*, 1999).

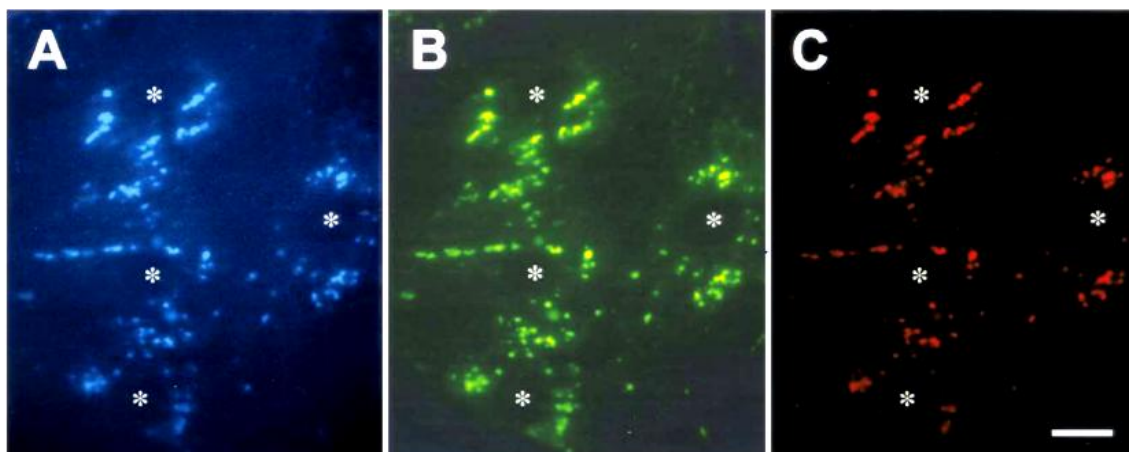


Figura I-4. Autofluorescència dels grànuls de lipofuscina als miòcits cardíacs de rata neonatal mantinguts en cultiu durant 3 mesos. Les imatges A, B i C mostren imatges de fluorescència capturades utilitzant llums d'excitació ultravioleta (330-380 nm), blava (450-490 nm) i verda (510-560 nm) i filtres de barrera de 420, 520 i 590 nm, respectivament. Els asteriscs indiquen els nuclis; el regle de calibratge (C, 10 μm) és vàlid per a les imatges A-C. Imatge adaptada de Brunk and Terman, 2002.

Ha estat descrit que l'estrès oxidatiu promou la formació de lipofuscina, mentre que les defenses antioxidants la prevenen; en fibroblasts, cèl·lules glials, miòcits cardíacs i cèl·lules epitelials pigmentàries de la retina cultivats en un alt contingut d'oxigen, s'ha observat una accelerada formació de lipofuscina. D'altra banda, la restricció calòrica (RC), que alenteix el procés oxidatiu, retarda l'acumulació de lipofuscina (Brunk and Terman, 2002) mentre que la deficiència en vitamina E està associada amb un augment de la formació de lipofuscina (Moore and Wang, 1947).

Un altre factor que contribueix a la formació de lipofuscina és l'autofagocitosi dels mitocondris (Collins *et al.*, 1980), ja que són el lloc principal on es formen les ROS i també són el principal objectiu del seu atac (Harman, 1956). Els mitocondris danyats oxidativament, que s'observen freqüentment en cèl·lules postmitòtiques velles i en malalties d'emmagatzematge lisosomal (March *et al.*, 1995; Brunk and Terman, 2002), poden contenir algunes macromolècules no degradables que ja han estat peroxidades i, a més, aquests mitocondris són rics en proteïnes hem i poden generar unes quantitats del radical superòxid O_2^- majors de les que produeixen els mitocondris funcionals. Aquesta implicació mitocondrial en la formació de lipofuscina queda, a més, demostrada pel fet que un dels components principals de la lipofuscina de les neurones envellides

i del ceroides en una sèrie de malalties d'emmagatzematge lisosomal és la subunitat c de l'ATP sintasa, una proteïna mitocondrial (Elleder *et al.*, 1997).

També ha estat descrit que, en algunes neurones cerebrals, la lipofuscina pot representar el 75 % del total del pericarió (Terman and Brunk, 1998) i que, tot i que encara estan vives, l'adaptabilitat d'aquestes cèl·lules es troba alterada. A més, la gran acumulació de lipofuscina de tipus ceroides que es dona en les malalties d'emmagatzematge lisosomal produeix importants disfuncions cel·lulars (Armstrong and Koppang, 1981; Neufeld, 1991).

Una altra via on es veu implicada la lipofuscina és la de la ubiquitina-proteasoma (en anglès, *ubiquitin proteasome pathway* [UPP]), ja que és el segon sistema de proteòlisi més important de les cèl·lules i, de la mateixa manera que el sistema lisosomal, es torna menys eficient amb l'envelliment (Gray *et al.*, 2003). L'UPP és el mecanisme més ràpid d'eliminació de proteïnes cel·lulars i s'encarrega de la degradació proteolítica de substrats a través del citosol i el nucli. Les cèl·lules amb un alt contingut en lipofuscina tenen la seva activitat proteasomal disminuïda i també ha estat demostrada la inhibició directa dels proteasomes amb lipofuscina *in vitro* (Sitte *et al.*, 2000); d'altra banda, la inhibició del proteasoma a través de l'agent específic MG-262 fa augmentar l'acumulació de lipofuscina en fibroblasts humans en cultiu (Terman and Sandberg, 2002) i aquest mateix inhibidor proteasomal fa que les cèl·lules humanes neurals SH-SY5Y mostrin signes d'alteracions mitocondrials com ara una disminució en la producció energètica en el procés de respiració acompanyada d'un augment de la glicòlisi com a mecanisme compensatori, un augment en la producció de ROS, un augment del nombre de cossos autofàgics que contenen mitocondris i un augment de les concentracions de materials amb les propietats de la lipofuscina (Sullivan *et al.*, 2004).

Aquest entrecruament dels efectes en ambdues vies es dona pel fet que la renovació proteasomal es realitza a través de l'autofàgia mitjançada pels lisosomes (Cuervo *et al.*, 1995; Cuervo, 2003). Les ROS produïdes pels mitocondris dins els lisosomes autofàgics poden ser alliberades del compartiment lisosomal i provocar estrès oxidatiu a les proteïnes citosòliques; aquestes haurien de ser degradades pel proteasoma (Grune *et al.*, 1996, 1997,

2003; Shringarpure *et al.*, 2001), però en un sistema que està saturat amb mitocondris que produeixen grans quantitats de ROS o lipofuscina, aquests poden saturar l'UPP amb substrats proteics oxidats. Tot aquest procés es veu accelerat amb l'envelliment.

Ara bé, el fet que les neurones que contenen grans quantitats de lipofuscina, com ara les neurones del nucli geniculat lateral, estiguin entre les més resistents als canvis degeneratius relacionats amb l'envelliment fa pensar que la formació de lipofuscina es pugui donar com a resposta adaptativa a la degeneració (Stojanovic *et al.*, 1994); no obstant això, hi ha evidències recents que indiquen que la lipofuscina acumulada pot ser perillosa per a les funcions cel·lulars (Brunk and Terman, 2002).

Fins al moment, no hi ha cap agent farmacològic que previngui o reverteixi la formació de lipofuscina de forma eficaç. La centrofenoxina va mostrar uns efectes prometedors en conillets d'índies en la reducció de la lipofuscina neuronal (Nandy and Bourne, 1966), però la seva eficàcia ha estat posada en dubte en estudis posteriors (Katz and Robison, 1983; Andrews and Brizzee, 1986; Katz, 2002). D'altra banda, s'ha demostrat que l'RC retarda la taxa d'envelliment de moltes espècies i augmenta el recanvi proteic i hi ha diversos agents farmacològics que poden actuar a través de vies de transducció de senyals afectats per l'RC per millorar la macroautofàgia i els sistemes de degradació lisosomal (Bergamini *et al.*, 2003). Donat el fet que els mamífers no disposen de cap enzim que sigui capaç de degradar la lipofuscina, s'han buscat altres vies d'eliminació: s'han estudiat microbis del sòl que podrien eliminar la lipofuscina en la natura (de Grey, 2002) i la possibilitat d'utilitzar els seus enzims en teràpia gènica.

3. La motoneurona (MN)

Ha estat descrit que, durant l'envelliment, es produeix una pèrdua gradual del nombre d'MNs. A més, s'ha observat que les MNs α més grans i de velocitat de conducció més ràpida moren abans i es veuen més afectades durant l'envelliment que les d'una mida més petita (Cottrell, 1940; O'Sullivan and Swallow, 1968; Ochoa and Mair, 1969; Tohgi *et al.*, 1977; Mittal and Logmani, 1987; Hartung and Asmussen, 1988; Hashizume *et al.*, 1988; Ansved and

Larsson, 1990). Així doncs, la pèrdua d'aquestes MNs de mida més gran de les unitats motores de contracció ràpida, junt amb la presència d'unes MNs danyades que són incapaces de reinnervar les fibres musculars denervades, fan que es vegin alterades l'estructura i les funcions del múscul esquelètic dels animals vells, el que pot acabar en una pèrdua d'aquestes fibres musculars o en canvis en la seva tipologia (Doherty *et al.*, 1995). Tots aquests canvis fan que les funcions dels músculs es vegin afectades: la pèrdua de fibres musculars fa que hi hagi una disminució de la força muscular, la pèrdua de les unitats motores fa que disminueixi la finesa del control motor i el canvi de la tipologia de fibres dins d'un mateix múscul modifica la seva cinètica de contracció i fa que es vegi afectada la seva resistència a la fatiga.

S'ha suggerit que el dany al DNA i les modificacions que s'hi acumulen al llarg dels anys sovint condueixen a un deteriorament funcional i a una mort cel·lular i que podrien tenir un paper important en la pèrdua d'MNs α durant l'envelliment (De Waard *et al.*, 2010; Borgesius *et al.*, 2011).

Ha estat descrit que durant l'envelliment hi ha una disminució dels axons mielinitzats als nervis perifèrics tant en humans (Swallow, 1966; Tohgi *et al.*, 1977; Tomlinson and Irving, 1977; Jacobs and Love, 1985) com en ratolins (Samorajski, 1974; Caccia *et al.*, 1979), en rates (Greenman, 1917; Van Steenis and Kroes, 1971; Hashizume *et al.*, 1988; Ansved and Larsson, 1990; Einsiedel and Luff, 1992; Tamaki *et al.*, 2014) o en cavalls (Wheeler and Plummer, 1989) així com a les arrels ventrals tant en humans (Gardner, 1940; Rexed, 1944; Notes and Oppermann, 1976; Mittal and Logmani, 1987) com en rates (Between *et al.*, 1934; Ansved and Larsson, 1990). A banda de tots aquests canvis estructurals, també ha estat descrit que hi ha una disminució en les velocitats de transport i conducció axonals i de la regeneració nerviosa (Mcmartin and Connor, 1979; Pestronk *et al.*, 1980; Brunetti *et al.*, 1987; Kanda and Hashizume, 1989).

També s'ha vist que hi ha una gliosi abundant al voltant de les MNs velles tant a nivell de micròglia com d'astròglia. Al nostre grup, s'ha descrit un augment dels fenotips proinflamatoris microglics i astroglics (M1 i A1, respectivament) a la medul·la espinal en ratolins vells amb una reducció dels fenotips

antiinflamatoris i neuroprotectors (M2 i A2, respectivament) (Blasco *et al.*, 2020).

4. La unió neuromuscular (NMJ)

Tot i que s'ha avançat molt en el coneixement dels factors causants de la sarcopènia, encara es desconeixen els mecanismes cel·lulars i moleculars exactes d'aquest procés. De fet, no hi ha un consens entre els diferents estudis pel que fa als canvis relacionats amb l'envelliment descrits en els diferents components del sistema neuromuscular i la seva contribució al desgast muscular progressiu en la gent gran, sobretot quan es comparen dades provinents d'estudis realitzats en diferents models animals i, encara més, quan aquests es comparen amb els descrits en estudis realitzats en humans. A més, encara no s'ha pogut determinar si el deteriorament de les NMJs contribueix a la sarcopènia o si, pel contrari, n'és una conseqüència. Alguns estudis mostren que les alteracions en la innervació muscular podrien explicar la pèrdua de massa muscular en edats avançades (Rowan *et al.*, 2012) i que els canvis estructurals a nivell pre-sinàptic i postsinàptic de l'NMJ, així com en altres components del sistema neuromuscular com les MNs de la medulla espinal o les neurones sensorials dels ganglis de l'arrel dorsal (en anglès, *dorsal root ganglions* [DRGs]) es donen amb l'envelliment tant en animals com en humans (Jang and Van Remmen, 2011; Tintignac *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Willadt *et al.*, 2018; Khosa *et al.*, 2019; Larsson *et al.*, 2019; Blasco *et al.*, 2020). Tot i que durant l'envelliment hi ha una pèrdua del nombre de fibres musculars, la mida mitjana de les unitats motores preservades es veu augmentada. En altres estudis realitzats amb rosegadors vells, s'han descrit alteracions morfològiques als terminals nerviosos motors, amb una extensió i una complexitat majors de la seva arborització, junt amb un augment de la fragmentació de la regió postsinàptica i una agrupació dels receptors d'acetilcolina (en anglès, *acetylcholine (ACh) receptors* [AChRs]) en petites illes, que es troben distribuïdes en una àrea major que les agrupacions en forma de *pretzel* observades en els animals adults (Valdez *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2011; Blasco *et al.*, 2020) (Figura I-5); aquests canvis reflecteixen continus cicles de denervació i reinnervació durant l'envelliment (Li *et al.*, 2011; Kang and Lichtman, 2013) i moltes d'aquestes agrupacions tenen una menor densitat

d'AChRs (Valdez *et al.*, 2010).

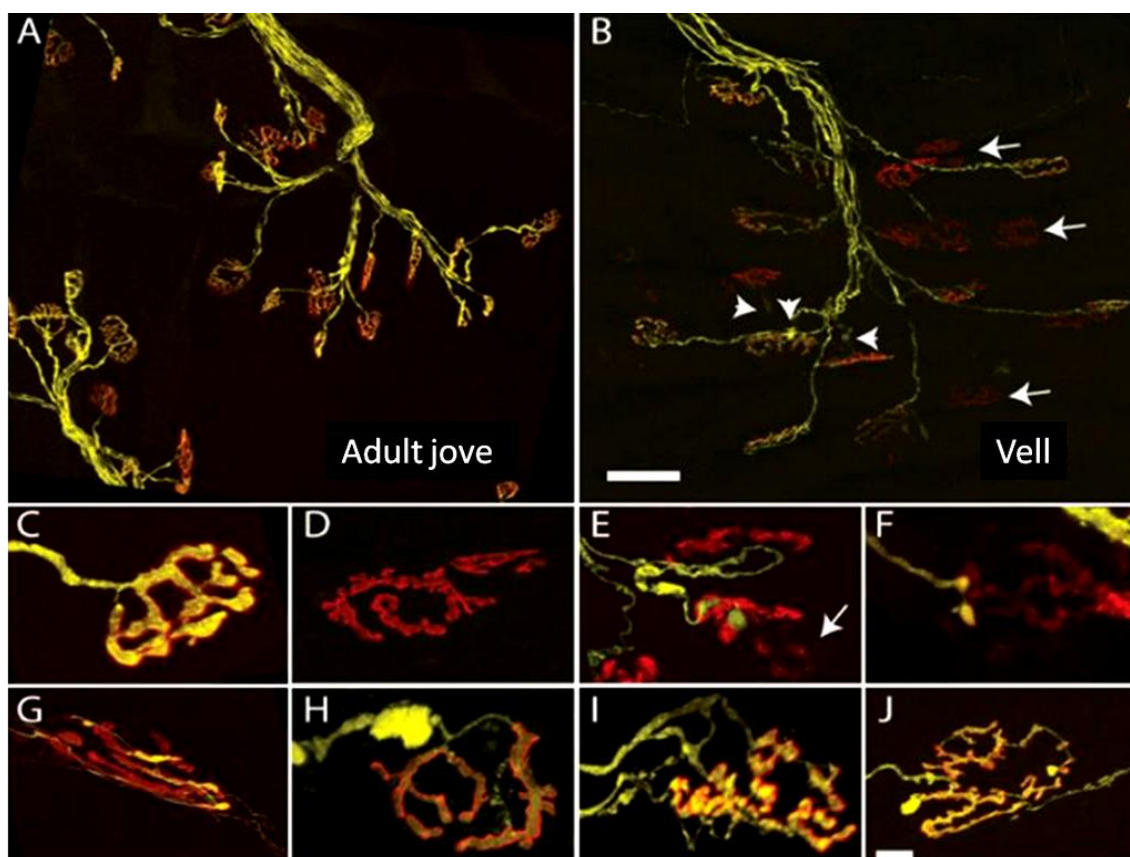


Figura I-5. Canvis relacionats amb l'edat al sistema neuromuscular. A) Múscul TA d'un ratolí adult jove que expressa proteïna fluorescent groga (en anglès, *yellow fluorescent protein* [YFP]) als axons motors; dos feixos nerviosos (en groc) innerven fibres musculars individuals. Els AChRs estan marcats amb Alexa-549-BTX (vermell). En animals joves, és freqüent l'aposió entre els terminals nerviosos i els AChRs. B) Múscul TA d'un ratolí de 24 mesos d'edat. Els llocs dels AChRs denervats (fletxes) i parcialment desocupats, així com els engruiximents axonals prominents (punta de fletxa), són freqüents. Les alteracions relacionades amb l'edat inclouen la denervació completa dels llocs dels AChRs postsinàptics (D), la fragmentació i fragments dels receptors dèbilment marcats (E), i receptors només parcialment coberts pel terminal nerviós (E-F). En alguns casos, els axons innervants són molt prims (G), presenten grans engruiximents proximals al terminal nerviós (H), múltiples axons innerven una sola NMJ (I), o s'estenen més enllà de l'àrea del receptor (J). Els regles de calibratge (B, 50 μm i J, 10 μm) són vàlids per a les imatges A i B i C-J, respectivament. Imatge adaptada de Valdez *et al.*, 2010.

Aquest procés de remodelació de les NMJs és el resultat de la degeneració de les MNs amb l'envelliment. De fet, altres estudis han demostrat que hi ha una disminució en el nombre d'MNs en la gent major de 60 anys i que aquestes es

tornen disfuncionals i mostren una reducció del nombre de terminals nerviosos i signes de degeneració amb l'envelliment (Tomlinson and Irving, 1977); a més, en models murins d'envelliment, també s'ha descrit que hi ha una pèrdua d'MNs en edats avançades (Ishihara *et al.*, 1987; Hashizume and Kanda, 1990; Jacob, 1998; Rowan *et al.*, 2012). Aquesta mort de les MNs podria ser conseqüència de la pèrdua de les unitats motores relacionada amb l'envelliment, en especial d'aquelles que innerven els músculs de contracció ràpida, i de la disminució de la força muscular (Doherty *et al.*, 1995; Berger and Doherty, 2010; Power *et al.*, 2010; McKinnon *et al.*, 2015).

D'altra banda, però, altres estudis realitzats en models murins no han descrit una pèrdua significativa del nombre d'MNs amb l'edat (Chopek and Gardiner, 2010; Chai *et al.*, 2011). No obstant això, el fet que les alteracions en els terminals nerviosos motors siguin conseqüència d'una patologia del múscul esquelètic intrínseca, i no un defecte primari de les MNs, no es pot descartar. De fet, ha estat descrit que les fibres musculars tenen un paper molt important en el manteniment de les NMJs (Funakoshi *et al.*, 1995; Gonzalez *et al.*, 1999; Schinder and Poo, 2000; Belluardo *et al.*, 2001; Messi and Delbono, 2003). Així, el procés retrògrad de mort conegut com *dying-back*, que condueix a una interrupció progressiva de les NMJs i a una disfunció de les MNs, podria resultar d'un defecte inherent a les fibres musculars amb la posterior disminució dels senyals tròfics derivats del múscul necessaris per mantenir la integritat i l'estabilitat dels components pre-sinàptics neuromusculars. Aquesta teoria concorda amb el fet que s'hagi descrit que les NMJs són notablement estables durant tota la vida adulta dels humans (Jones *et al.*, 2017), el que suggereix que les alteracions neuromusculars estructurals i funcionals que es produeixen durant l'envelliment venen donades principalment per deficiències intrínseques en el múscul.

Ha estat descrit que durant l'envelliment s'observa un procés d'*sprouting*, el creixement de nous processos nerviosos des del terminal axonal, que es produeix per tal de reinervar les fibres musculars denervades i que precedeix la pèrdua d'MNs relacionada amb l'envelliment (Einsiedel and Luff, 1992; Son and Thompson, 1995b) i que es dona especialment seguit d'una denervació parcial (Son and Thompson, 1995a). Durant aquesta denervació parcial, es

danyen alguns dels axons que innerven el múscul, mentre que d'altres queden intactes en la seva innervació; en aquests casos, les fibres musculars denervades estimulen un *sprouting* terminal i nodal. Aquests *sprouts* poden créixer al llarg de les cèl·lules glials per tal de reinnervar els terminals motors de les fibres musculars més properes (Son and Thompson, 1995b, 1995a); en aquests casos, la morfologia de la nova sinapsi formada pot canviar, per exemple, degut a una reinnervació polineuronal seguida d'una competició per un mateix terminal motor, a un desplaçament d'algun dels axons o a la pèrdua de receptors deguda a la pèrdua d'aquests axons (Rich and Lichtman, 1989).

Quan la innervació d'un axó motor cap a una NMJ és interrompuda, l'axó es regenera per tornar a ocupar el mateix lloc que ocupava a la placa motora (Rich and Lichtman, 1989; Hashizume and Kanda, 1995; Nguyen *et al.*, 2002); no obstant això, si el dany del nervi és més sever, la reinnervació es dona de manera més lenta i és poc probable que el nervi torni a tots i cadascun dels llocs que ocupava anteriorment, de manera que alguns llocs queden desocupats i se'n creen altres de nous, probablement a causa de l'agrina que es secreta durant l'*sprouting* de les fibres nervioses (Rich and Lichtman, 1989; Nguyen *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2014).

D'altra banda, s'ha vist que les NMJs dels músculs de rates velles tenen un patró més fragmentat en comparació amb les rates adultes. Tot i que ha estat descrit que la fragmentació en ratolins comença a fer-se més evident a partir dels 20 mesos d'edat, també s'han observat NMJs fragmentades fins i tot en ratolins més joves (Akaaboune *et al.*, 1999; Decary *et al.*, 2000). A més, ha estat descrit que les NMJs dels ratolins vells també presenten un perímetre més gran, amb una arborització del terminal nerviós també més gran i més complexa i una fragmentació dels contactes nerviosos (Fahim *et al.*, 1983; Lehmann and Kretzschmar, 1983; Robbins and Fahim, 1985).

Altres estudis (Li *et al.*, 2011) han demostrat que al múscul esternocleidomastoïdal dels ratolins vells es poden observar dos tipus d'NMJs: unes amb una aparença jove, en forma de *pretzel*, com les que es veuen en la Figura I-6, i unes altres que tenen els AChRs segmentats en petits fragments, com es pot observar a la Figura I-7 A.

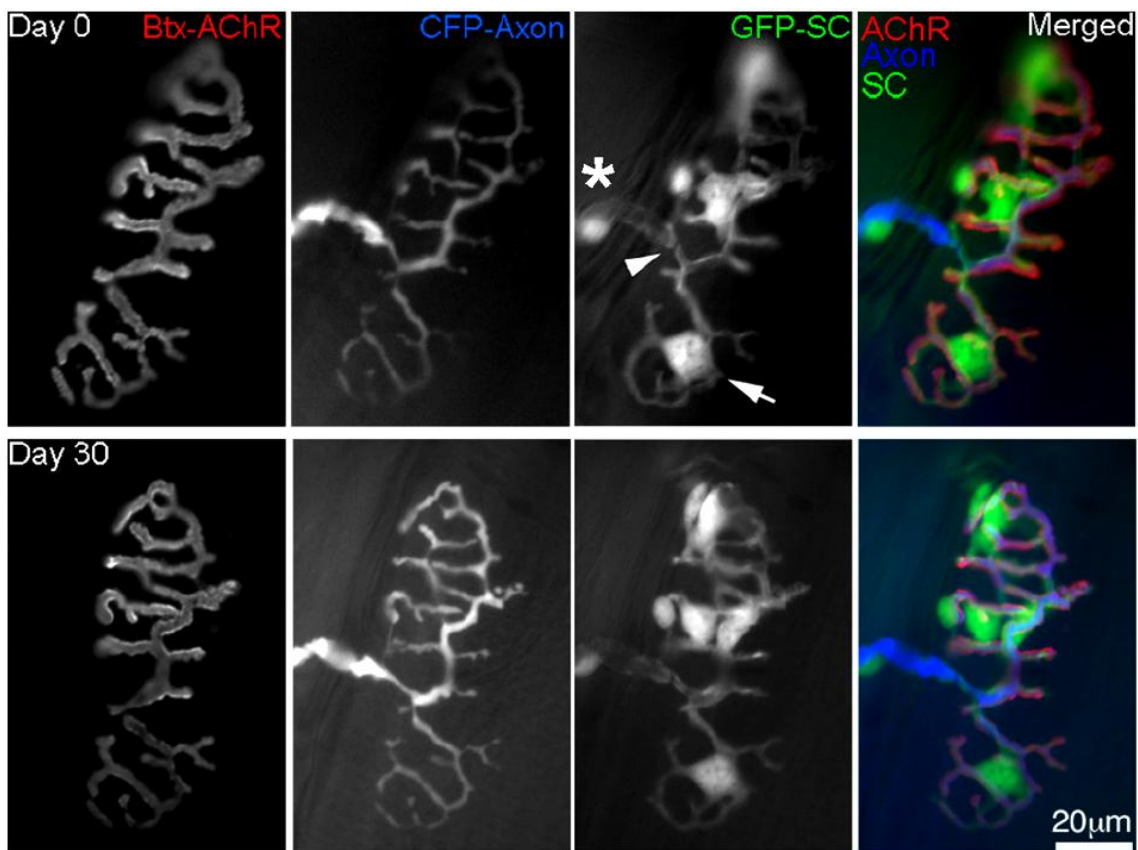


Figura I-6. Imatges representatives d'unes NMJs del múscul esternocleidomastoidal de ratolí just abans d'induir un dany al nervi (imatges superiors) i al cap de 30 dies d'aquest dany (imatges inferiors) marcades amb bungarotoxina α (en anglès, α bungarotoxin [α -Bgtx]) (en vermell) i amb doble tinció amb proteïna fluorescent cian (en anglès, cyan fluorescent protein [CFP]) (en blau) per marcar els axons motors i amb proteïna fluorescent verda (en anglès, green fluorescent protein [GFP]) (en verd) per marcar les cèl·lules de Schwann. Es pot observar com l'axó entra a l'NMJ pel costat esquerre (assenyalat amb la punta de fletxa) i s'estén al llarg de tota la superfície de l'NMJ; hi ha diverses cèl·lules de Schwann (una d'elles assenyalada amb una fletxa) que cobreixen el terminal nerviós. Imatge obtinguda de Kang et al., 2014.

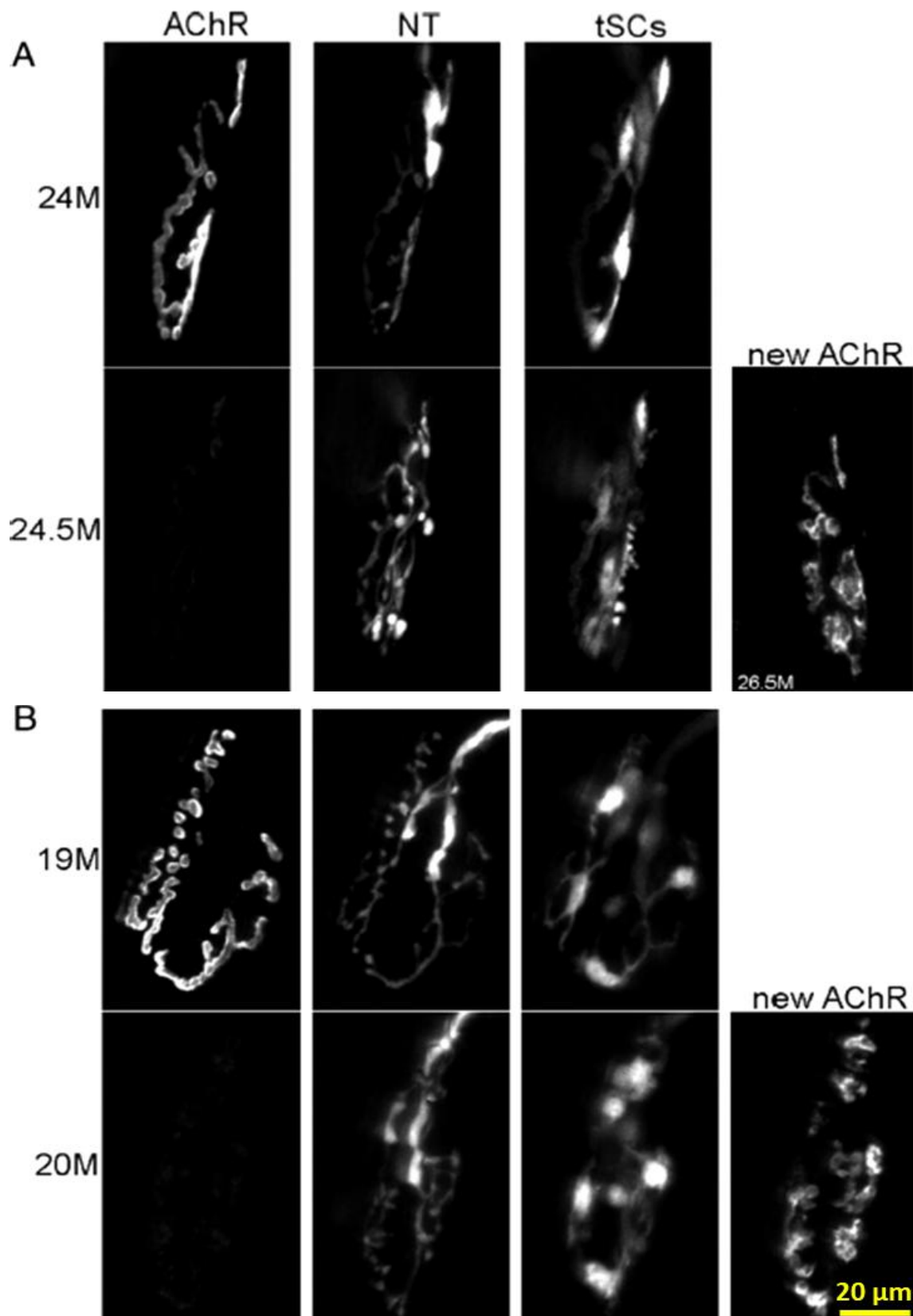


Figura I-7. Imatges representatives d'unes NMJs del múscul esternocleidomastoidal de ratolí on es mostra el marcatge de l'AChR conjugat amb α -Bgtx, i el terminal nerviós motor (NT) i les SCs amb CFP i GFP, respectivament. A) Es pot veure com algunes NMJs mantenen una aparença jove, amb una pèrdua del primer marcatge de l'AChR, inserció

de nous receptors i una fragmentació dels AChRs, que es fa més aparent amb el temps a mesura que la fibra creix i s'expandeix (imatge de la dreta); en aquest cas, l'NT es torna varicos. B) Altres NMJs tenen una aparença envellida, fragmentada, amb una pèrdua del primer marcatge de l'AChR, amb una inserció d'un nombre significatiu de nous receptors i una fragmentació addicional dels AChRs. Imatge adaptada de Kang et al., 2014.

4.1. Factor de creixement transformant β (TGF- β)

Altres factors com la inflamació, factors solubles en sèrum o alguns factors de creixement, que canvien durant l'envelliment, influeixen en les funcions de les SCs i provoquen un empitjorament o un retard relacionats amb l'envelliment en els processos de reparació i regeneració en resposta al dany en el múscul esquelètic (Almada and Wagers, 2016; Brack and Muñoz-Cánoves, 2016). La neutralització de les vies de senyalització de Wnt (de l'anglès, *wingless*, que vol dir "sense ales") o del factor de creixement transformant (en anglès, *transforming growth factor* [TGF]- β), que bloquegen la via de senyalització de Notch (essencial per a l'activació de les SCs), millora els mecanismes de reparació muscular en edats avançades (Brack and Muñoz-Cánoves, 2016). A més, l'augment dels nivells de TGF- β durant l'envelliment té un efecte negatiu sobre les SCs a través de l'activació de cèl·lules mare profibròtiques residents al múscul, que s'interconnecten amb les SCs (Brack and Muñoz-Cánoves, 2016).

La superfamília TGF- β comprèn més de 30 lligands secretables amb una selectivitat específica per a diferents subtipus de receptors. Per sota d'aquests lligands, s'activen dues vies de senyalització que incideixen en dues classes de factors de transcripció que pertanyen a la família *Smad*. Les activines, alguns factors de creixement i de diferenciació, i les proteïnes TGF- β promouen l'activitat d'Smad 2 i 3 i la pèrdua muscular. Per altra banda, altres factors de creixement i de diferenciació i la miostatina o proteïna morfogenètica òssia (en anglès, *bone morphogenetic protein* [BMP]) actuen sobre Smad 1, 5 i 8 per tal de regular certs gens que controlen el creixement muscular. La retenció dels complexos Smad2/3-Smad4 a l'interior dels nuclis facilita la seva interacció amb altres factors de transcripció, coactivadors o repressors que modulen la transcripció de certs gens diana que controlen l'atròfia o bloquegen la hipertròfia (Sartori et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009).

D'altra banda, s'ha observat una supressió de BMP5 en individus d'edat avançada (Welle *et al.*, 2003), el que indica que aquesta via de senyalització podria tenir un paper important en el control de la massa muscular durant l'envelliment. A més, ha estat descrit que els nivells de MUSA1, que es troba regulat a la baixa a través d'aquesta via, estan augmentats en rates durant l'envelliment (Ibebunjo *et al.*, 2013).

4.2. Factor de creixement dels fibroblasts 1 (FGFBP1)

Un altre dels factors importants per al desenvolupament i manteniment de les NMJs és la proteïna d'unió al factor de creixement dels fibroblasts 1 (en anglès, *fibroblast growth factor binding protein 1* [FGFBP1]). Aquesta, és secretada als músculs i es concentra a les NMJs (Figura I-8); la seva expressió augmenta durant el desenvolupament, però disminueix abans de la degeneració tant durant l'envelliment (Taetzsch *et al.*, 2017) com en diversos models de malalties neurodegeneratives com ara en els ratolins SOD1^{G93A}, un model per a l'estudi de l'esclerosi lateral amiotròfica (en anglès, *amyotrophic lateral sclerosis* [ALS]) (Moloney *et al.*, 2014; Valdez *et al.*, 2014; Filézac De L'Etang *et al.*, 2015), en ratolins SMA Δ 7, un model per a l'estudi de l'SMA (Valsecchi *et al.*, 2015), o en *Drosophila* (Bayat *et al.*, 2011).

L'FGFBP1 acompanya els lligands del factor de creixement dels fibroblasts (en anglès, *fibroblast growth factor* [FGF]) des de la MEC fins als seus receptors (Wu *et al.*, 1991; Tassi *et al.*, 2001; Abuharbeid *et al.*, 2006) i, d'aquesta manera, millora l'activitat biològica d'aquests lligands.

Així doncs, en absència d'FGFBP1, les NMJs dels ratolins en desenvolupament i de mitjana edat mostren diverses anormalitats, com ara un retard en la maduració o un augment de la poliinnervació i de la fragmentació; en el cas dels ratolins SOD1^{G93A}, aquesta deleció provoca una acceleració de la degeneració i de la mort de les NMJs amb un augment del percentatge de les que estan parcialment o completa denervades, a més de causar una mort accelerada d'aquests ratolins (Taetzsch *et al.*, 2017).

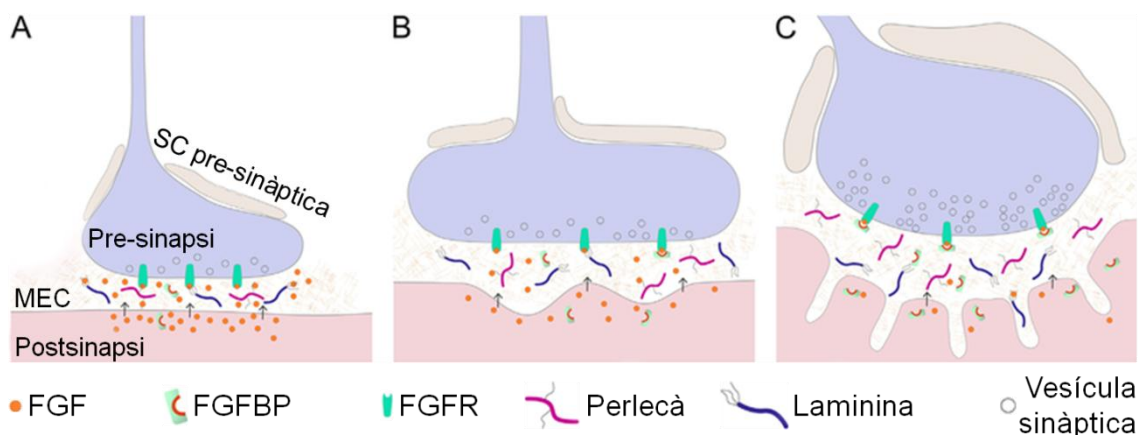


Figura I-8. Funcions de l'FGFBP1 a l'NMJ. A) Durant la formació de l'NMJ, els alts nivells d'FGF promouen la formació del terminal de l'axó motor i l'agrupació de vesícules sinàptiques. La fenedura sinàptica és relativament estreta durant el desenvolupament, el que permet que l'FGF secretat pel múscul es pugui unir al seu receptor (en anglès, *FGF receptor* [FGFR]) al compartiment pre-sinàptic ja sigui de forma directa o a través dels proteoglicans de sulfat d'heparan (en anglès, *heparan sulfate proteoglycans* [HSPG]) implicats en la formació de les sinapsis, com ho són el perlecà i la laminina. Durant aquest període del desenvolupament, els nivells d'FGFBP1 són baixos, de manera que té una capacitat limitada per mediar l'activitat de l'FGF. B) A mesura que l'NMJ madura, els nivells d'FGF disminueixen i els d'FGFBP1 augmenten; el fet que la fenedura sinàptica sigui més gran fa que l'FGF necessiti l'FGFBP1 per unir-se als FGFRs i activar-los. C) En les NMJs adultes, la fenedura sinàptica és relativament ampla, amb una MEC amb una composició complexa. Als músculs esquelètics adults, els nivells d'FGF són més baixos i els d'FGFBP1 són molt més alts que als músculs en desenvolupament. La senyalització d'FGF és necessària per al manteniment de l'NMJ i pot dependre completament de l'activitat com a xaperona de l'FGFBP1 per atravesar la distància augmentada des del lloc postsinàptic fins al pre-sinàptic. Imatge adaptada de Tassi et al., 2001.

L'augment de l'acumulació de TGF- β 1 als músculs esquelètics i a les seves NMJs inhibeix l'expressió d'FGFBP1. De fet, s'han trobat altes concentracions de TGF- β 1 tant a les NMJs dels ratolins pre-simptomàtics SOD1^{G93A} com a les dels ratolins vells en comparació amb els ratolins adults (Taetzsch *et al.*, 2017), el que indica que podria estar afectant directament els nivells d'FGFBP1 a l'NMJ, que es troben reduïts en aquest model murí. Així doncs, modificant les expressions de TGF- β 1 i/o d'FGFBP1 es podria disminuir la degeneració de les NMJs relacionada amb l'envelliment i amb les malalties neurodegeneratives.

4.3. Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP)

El pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (en anglès, *calcitonin gene-related peptide* [CGRP]) és un pèptid de 37 aminoàcids resultant del processament alternatiu específic de teixit del gen de la calcitonina (Amara *et al.*, 1982; Rosenfeld *et al.*, 1983).

S'ha detectat immunoreactivitat al CGRP tant en àrees sensorials com motores del sistema nerviós central (Skofitsch and Jacobowitz, 1985) així com al sistema nerviós autònom (Rodrigo, Polak, Terenghi, *et al.*, 1985; Gulbenkian *et al.*, 1986). Es tracta d'un pèptid que té una gran varietat d'efectes sobre teixits tant neuronals com no neuronals, incloent el múscul, i pot actuar com a factor neurotròfic a l'NMJ (Fontaine *et al.*, 1986; Changeux *et al.*, 1992); té un gran efecte sobre la contracció de les cèl·lules del múscul llis dels tractes gastrointestinals i urogenitals (Samuelson *et al.*, 1985; Barthó *et al.*, 1987) i té un potent efecte vasodilatador (McCulloch *et al.*, 1986). A més, potencia la transmissió neuromuscular i els mecanismes d'excitació i contracció als músculs estriats (Kenji Takami *et al.*, 1985; Ohhashi and Jacobowitz, 1988) i té efectes a curt i llarg termini sobre l'AChR com ara un augment del seu rati de des-sensibilització (Mulle *et al.*, 1988) i un augment tant de la síntesi de la subunitat alfa de l'mRNA de l'AChR (Fontaine *et al.*, 1986) com de la inserció del receptor al plasmalema (Fontaine *et al.*, 1986; New and Mudge, 1986). Aquests efectes atribuïts al CGRP indiquen que aquest pèptid pot tenir un paper important en la maduració dels músculs esquelètics i de les interaccions entre els nervis i els músculs.

S'han trobat alts nivells de CGRP a les NMJs de les granotes (Matteoli *et al.*, 1988) i a les MNs del tronc encefàlic (Takami *et al.*, 1985) i a la medul·la espinal (Gibson *et al.*, 1984) en mamífers, però només s'ha detectat als terminals nerviosos motors dels músculs estriats de la part superior del tracte digestiu i d'alguns músculs esquelètics somàtics (Takami *et al.*, 1985; Rodrigo *et al.*, 1985; Terenghi *et al.*, 1986; Mora *et al.*, 1989; Popper and Micevych, 1989).

El CGRP és present a les NMJs dels músculs esquelètics, així com a pràcticament totes les MNs de la regió lumbar en rates d'una setmana d'edat;

en canvi, s'ha vist que disminueix gradualment tant a les MNs com als terminals nerviosos motors a mesura que les rates creixen i desapareix de forma gairebé completa en les NMJs en rates adultes, restringint-se la seva expressió únicament als terminals nerviosos motors de les fibres intrafusals (Bööj *et al.*, 1989; Matteoli *et al.*, 1990; Li and Dahlström, 1992; Andreose *et al.*, 1994). Aquesta regulació a la baixa del CGRP es deu exclusivament a una reducció en els nivells d'mRNA a les MNs espinals. Així doncs, es pot concloure que l'expressió de CGRP es regula durant el desenvolupament a les MNs α de la medul·la espinal i que aquest pèptid pot tenir un paper important en les MNs immadures (Matteoli *et al.*, 1990). D'altra banda, s'ha vist que després de provocar dany als nervis es produeix una acumulació de CGRP als terminals nerviosos on s'està produint la reinervació i que també es troba sobreexpressat després de les axotomies (Streit *et al.*, 1989; Arvidsson *et al.*, 1990; Piehl *et al.*, 1991). Altres experiments han demostrat que una paràlisi muscular induïda amb toxina botulínica o amb tetrodotoxina, que provoquen *sprouting* neuronal (Brown, 1984) i la formació de nous contactes neuronals (Angaut-Petit *et al.*, 1990), també provoca un augment de l'expressió de CGRP i del seu contingut a les neurones motores i una acumulació als terminals nerviosos motors (Sala *et al.*, 1995; Tarabal, 1996). En canvi, l'administració exògena de CGRP és capaç de bloquejar la capacitat d'*sprouting* dels terminals nerviosos en els músculs paralitzats (Tsujiimoto and Kuno, 1988).

El CGRP és present a les MNs (Rosenfeld *et al.*, 1983; New and Mudge, 1986) i és transportat als terminals nerviosos motors (Kashihara *et al.*, 1989), on és emmagatzemat en les vesícules de gran nucli dens (en anglès, *large dense core vesicles* [LDCV]) (Matteoli *et al.*, 1988; Calderó *et al.*, 1992), que representen un petit percentatge de la població total de vesícules als terminals nerviosos motors (Brewer and Lynch, 1986), fins que és alliberat (Kashihara *et al.*, 1989; Uchida *et al.*, 1990). Ha estat descrit que hi ha llocs d'unió al CGRP al múscul (Jennings and Mudge, 1989; Roa and Changeux, 1991) i, en cultius de miotúbuls o de fibres musculars adultes, s'ha vist que el CGRP indueix l'expressió d'AChR (Fontaine *et al.*, 1986), allarga el temps d'obertura dels seus canals (Lu *et al.*, 2010) i modula les propietats d'aquests canals (Eusebi *et al.*, 1988; Mülle *et al.*, 1988). De fet, a nivell d'NMJ, ha estat descrit que el CGRP

coexisteix amb l'ACh (K. Takami *et al.*, 1985; Matteoli *et al.*, 1988), però mentre que el CGRP s'emmagatzema a les LDCV (Matteoli *et al.*, 1988) l'ACh es concentra a les vesícules sinàptiques petites (Ceccarelli and Hurlbut, 1980).

4.4. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43)

La proteïna associada al creixement (en anglès, *growth-associated protein* [GAP]-43) és una fosfoproteïna pre-sinàptica de 43 kDa que només s'expressa al sistema nerviós; s'expressa en alts nivells als cons de creixement neuronal durant el desenvolupament i durant la regeneració axonal, on és un substrat de la proteïna cinasa C (Jacobson *et al.*, 1986; Meiri *et al.*, 1986; Skene *et al.*, 1986; Karns *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1989).

En diverses espècies animals, la GAP-43 ha estat implicada en la regulació de les funcions vesiculars pre-sinàptiques i en el creixement i la plasticitat axonals a través de les seves pròpies propietats bioquímiques i de les interaccions amb altres proteïnes pre-sinàptiques. Els canvis en l'expressió de l'mRNA de GAP-43 o de la distribució de la proteïna provoquen un creixement axonal com a conseqüència del dany neuronal i de la reorganització pre-sinàptica.

Ha estat descrit que, tant en pollastre com en rata, els nivells de GAP-43 disminueixen ràpidament durant el desenvolupament a partir del punt en què es dona l'eliminació sinàptica, fins que és indetectable a partir del segon o tercer dia; el bloqueig de la transmissió neuromuscular a través de toxines pre- o postsinàptiques prevé aquesta regulació a la baixa, el que indica que es veuen afectats els nivells d'mRNA a les MNs; la contrarrestació de la disminució del factor de creixement de la insulina durant l'eliminació sinàptica és suficient per prevenir aquesta regulació a la baixa de GAP-43 a les MNs espinals (Caroni and Becker, 1992).

D'altra banda, els nivells de GAP-43 observats durant el desenvolupament i en l'edat adulta suggereixen que hi ha una possible relació entre la presència d'aquesta proteïna i els fenòmens de plasticitat (Benowitz and Routtenberg, 1987; Neve *et al.*, 1988; Neve and Bear, 1989). En relació amb aquest vincle, també ha estat descrit que la GAP-43 és fosforilada en condicions de potenciació a llarg termini, quan té lloc una intensificació de llarga durada en la transmissió dels senyals entre dues o més neurones quan succeeix una

estimulació sincrònica entre elles (Benowitz and Routtenberg, 1987; Nelson *et al.*, 1989).

Tot i la gran quantitat d'articles publicats sobre l'estudi de GAP-43, la seva funció sobre el creixement axonal encara no és del tot clara.

4.5. Agrina

L'agrina s'expressa en dues variants d'*splicing* a l'N-terminal i en diverses variants al C-terminal; l'*splicing* a l'N-terminal genera dues isoformes: la curta, que conté un domini transmembrana i que s'expressa principalment al cervell, i la llarga, que s'expressa a les MNs, als músculs i a altres teixits i que és secretada (Ruegg *et al.*, 1998). L'agrina és un proteoglicà derivat dels nervis que actua com a organitzador de la diferenciació postsinàptica; és secretada pels axons motors i promou l'agregació dels AChRs a les membranes postsinàptiques. L'agrina es concentra a les fenèdures sinàptiques mentre es desenvolupen les NMJs i s'hi manté durant l'edat adulta. La seva concentració als llocs post-sinàptics es troba considerablement reduïda després de la denervació muscular (Reist *et al.*, 1987). Els ratolins on s'ha realitzat un bloqueig de l'agrina o els ratolins KO de manera específica a les MNs són incapaços de formar les NMJs (Kummer *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2012; Darabid *et al.*, 2014; Tintignac *et al.*, 2015). D'altra banda, la supressió de l'agrina d'un subconjunt de MNs adultes provoca una pèrdua dels AChRs i d'altres components de l'aparell postsinàptic i de la fenèdura sinàptica que es troba entre el terminal nerviós i les membranes postsinàptiques; també s'observen uns terminals nerviosos atrofiats, que finalment es separen de les fibres musculars (Samuel *et al.*, 2012). En les NMJs de ratolins vells, ha estat descrit que hi ha una alteració de la distribució i l'organització de l'agrina, el que suggereix que aquests canvis podrien contribuir a la desestructuració sinàptica relacionada amb l'edat. Així doncs, es podria concloure que l'agrina, junt amb altres organitzadors tant pre- com postsinàptics, s'encarrega del manteniment de l'estructura i la funció de les NMJs adultes (Samuel *et al.*, 2012).

Les cèl·lules musculars també expressen agrina, però només les MNs produeixen una isoforma resultant de l'*splicing* alternatiu, anomenada agrina-z, que activa un complex receptor postsinàptic format per l'LRP4 (la proteïna 4 de

baixa densitat relacionada amb el receptor de lipoproteïnes; de l'anglès, *low-density lipoprotein* [LDL] *receptor-related protein 4*) i el receptor tirosina cinasa específic de múscul MuSK (de l'anglès, *muscle-specific kinase*) (DeChiara *et al.*, 1996; Glass *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). L'agrina s'uneix al seu receptor LRP4, una proteïna transmembrana que forma part de la família de receptors LDL, a les cèl·lules musculars. D'aquesta manera, forma un complex binari que, a continuació, dimeritza per formar un tetràmer, que finalment activa i transfosforila MuSK (Kim *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Zong *et al.*, 2012), el que porta a una agregació dels AChRs i a la formació de les NMJs. D'altra banda, l'agrina també promou el reciclatge dels AChRs i, així, augmenta la seva estabilitat metabòlica (Rudolf and Akaaboune, 2014). L'agrina també millora el transport vesicular dels AChRs cap a les membranes sinàptiques (Basu *et al.*, 2015). Un factor de despolimerització de l'actina o una endocitosis dels AChRs dependent de cofilina, en resposta a l'agrina, ajuda al transport aneural de les agrupacions dels AChRs i dels AChRs sintetitzats de nou cap als llocs postsinàptics (Lee *et al.*, 2009). L'LRP4 té un gran domini extracel·lular, el que suggereix que actua principalment com a receptor, i un domini intracel·lular que és fosforilat per MuSK (Zhang *et al.*, 2008), però que sembla ser dispensable per a la formació de les NMJs (Gomez and Burden, 2011) (Figura I-9 a i b). A més de la formació de les NMJs, la senyalització via agrina és necessària per a la seva estabilitat; així doncs, les NMJs es desintegren en els ratolins que han perdut l'expressió d'agrina o d'LRP4 després de la formació de les NMJs (Samuel *et al.*, 2012; Barik *et al.*, 2014); resultats similars s'han obtingut quan s'han fet KOs de MuSK (Kong *et al.*, 2004; Hesser *et al.*, 2006) i en ratolins mutants per al biglycan, que manté els nivells de MuSK a l'NMJ (Amenta *et al.*, 2012).

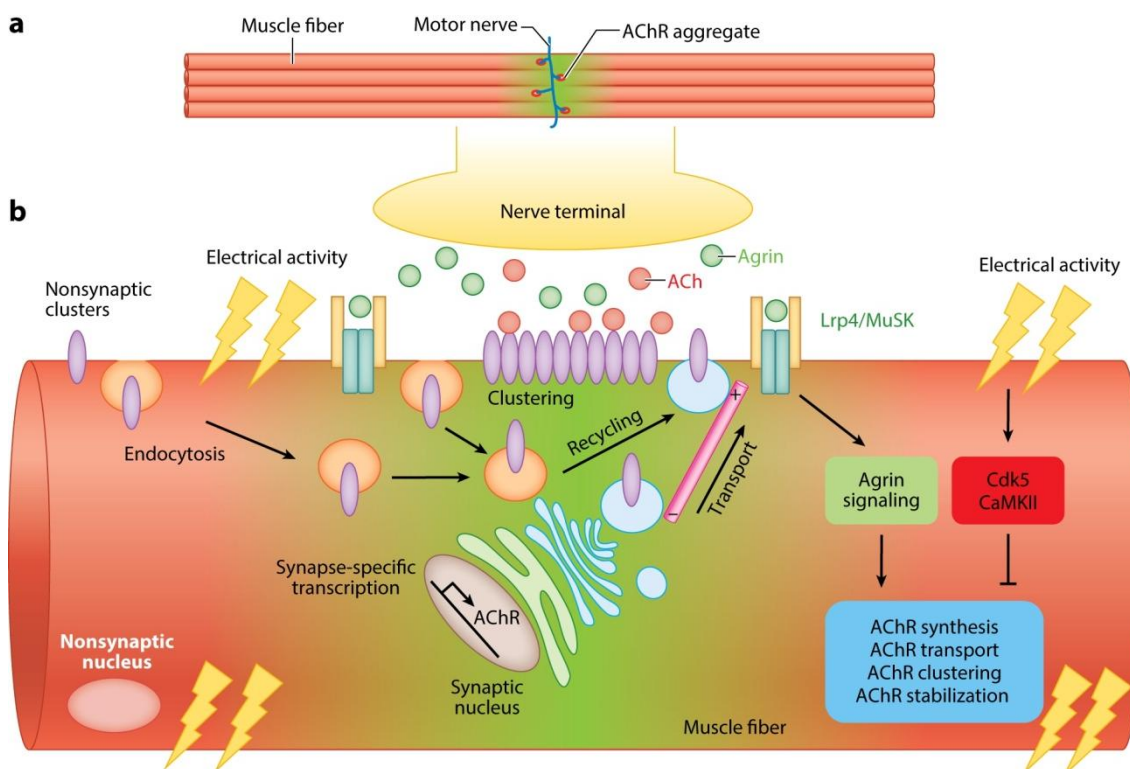


Figura I-9 Els terminals nerviosos secreten diversos factors, com ara l'agrina, que concentren els AChRs a les NMJs per tal de promoure la transcripció dels gens de les subunitats dels AChRs i altres proteïnes importants per a l'estructura i la funció de les NMJs als nuclis sinàptics, per al transport de l'AChR cap a la membrana o per a l'agrupament, l'ancoratge o l'estabilitat de l'AChR. Els terminals nerviosos també alliberen ACh, un senyal negatiu que suprimeix tota aquesta maquinària, per eliminar l'excès d'agrupacions d'AChRs de les regions extra-sinàptiques. Imatge obtinguda de Li *et al.*, 2018.

Durant les fases inicials del desenvolupament, l'agrina-z activa el complex MuSK/LRP4 per tal d'estabilitzar els cúmuls d'AChRs formats de manera aneural i per induir la formació de nous cúmuls a la membrana muscular (Lin *et al.*, 2001, 2005; Yang *et al.*, 2001; Flanagan-Steet *et al.*, 2005; Misgeld *et al.*, 2005). En absència de totes les isoformes de l'agrina o només de l'agrina-z, no es dona la diferenciació de les NMJs i els animals moren poc després de néixer degut a greus defectes neuromusculars (Gautam *et al.*, 1996; Burgess *et al.*, 1999). En ratolins que presenten mutacions en l'agrina, també s'han observat anomalies pre-sinàptiques, probablement degut al fet que la disrupció del desenvolupament postsinàptic bloqueja la senyalització retrògrada des del múscul fins al nervi. En estudis realitzats en ratolins, la deleció de l'agrina provoca una depleció dels AChRs, una dispersió dels components de la làmina

basal, distròfies en les NMJs tal i com s'ha observat en les NMJs de ratolins vells i, en alguns casos, retracció nerviosa (Samuel *et al.*, 2012). Així doncs, es pot concloure que per al manteniment de les NMJs és necessària la presència continuada de certs organitzadors sinàptics, com ho són l'agrina i la laminina, i que les seves alteracions poden contribuir a una desorganització sinàptica relacionada amb l'envelliment. De 5 a 6 mesos després de la deleció de l'agrina, gairebé tots els terminals nerviosos pre-sinàptics en forma de *prezzel* desapareixen i les estructures terminals que s'han mantingut mostren una morfologia marcadament desestructurada amb una arborització simplificada i poca expressió d'AChR a les regions adjacents a les fibres musculars (Samuel *et al.*, 2012). D'altra banda, ha estat descrit que la distribució tant de l'agrina com de les laminines es troba alterada durant l'envelliment: mentre que totes elles es troben localitzades en regions amb una alta densitat d'AChR en els animals adults, algunes d'aquestes regions es troben desproveïdes d'aquestes proteïnes en els animals vells i la immunoreactivitat s'esté a les zones pre-sinàptiques (Samuel *et al.*, 2012).

S'han descrit alteracions en l'agrina en diverses malalties. En la miastènia gravis, una malaltia autoimmune adquirida que afecta les NMJs, el diagnòstic es fa a través dels anticossos que els pacients generen contra AChR i MuSK (Vincent, 2002; Phillips and Vincent, 2016); més recentment, també s'hi han trobat anticossos contra agrina i LRP4 (Sanders *et al.*, 2003; Pevzner *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012, 2014; Gasperi *et al.*, 2014; Bacchi *et al.*, 2018), els quals podrien interrompre la senyalització de l'agrina (Pevzner *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012, 2014; Shen *et al.*, 2013; Phillips and Vincent, 2016). Tot això posa de manifest la importància de l'agrina en el manteniment de les NMJs. En el cas de la síndrome de la miastènia congènita, menys comú que la miastènia gravis i normalment amb un inici primerenc (Engel *et al.*, 2015), també s'han descrit mutacions en els gens de l'agrina, l'LRP4 i la MuSK (Engel *et al.*, 2015).

D'altra banda, ha estat descrit que la sobreexpressió d'agrina o de MuSK és beneficiosa per als models murins d'SMA, ALS, distròfia muscular d'Emery-Dreifuss i miastènia gravis (Pérez-García and Burden, 2012; Arimura *et al.*, 2014; Ghazanfari *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017). A més, l'administració d'agrina

soluble ajuda a revertir els fenotips semblants a la sarcopènia en els ratolins que sobreexpressen neurotripsina, implicada en el creixement axonal i el manteniment de la plasticitat neuronal (Hettwer *et al.*, 2014).

4.6. Regulació molecular de l'NMJ

Hi ha diverses molècules que estan implicades en la formació de les NMJs i la seva absència provoca alteracions pre- o postsinàptiques en els músculs envellits.

La deleció genètica en adults de l'agrina (Brown *et al.*, 1982; Samuel *et al.*, 2012) a través d'un KO condicional o del seu receptor al múscul, l'LRP4 (Balice-Gordon and Lichtman, 1994; Barik *et al.*, 2014), provoca una destrucció de les NMJs madures i indueix característiques de les sinapsis envellides com ara la fragmentació dels AChRs postsinàptics, la varicositat dels terminals axonals motors i la denervació parcial o total dels terminals motors. L'agrina s'uneix a l'LRP4, el qual activa MuSK, que està implicada en la diferenciació sinàptica; així doncs, el KO de la molècula MuSK a l'adult ha mostrat uns efectes similars als observats amb la inhibició de l'agrina (Kong *et al.*, 2004; Hesser *et al.*, 2006). A més, en un estudi de Cantor *et al.*, 2018, la sobreexpressió de la superòxid dismutasa humana en ratolins model d'ALS, on els components de la via de senyalització de l'agrina van ser manipulats, va mostrar unes NMJs amb signes de denervació i reinnervació, tal com succeeix durant l'envelliment (Valdez *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2011). D'altra banda, ha estat descrit que l'activació de la quinasa MuSK disminueix la denervació muscular i millora la transmissió sinàptica, tot i que té efectes mínims sobre l'esperança de vida dels animals (Cantor *et al.*, 2018).

A més, estudis recents suggereixen que hi ha una sèrie de molècules, conegudes com a alarmines, que són alliberades de forma col·lectiva com a conseqüència d'alguns danys cel·lulars o en certes malalties (Lehmann and Kretschmar, 1983; Brooks and Faulkner, 1994; Chernov *et al.*, 2015; Man *et al.*, 2015; Tidball, 2017); en alguns casos, algunes d'aquestes molècules són capaces d'activar les SCs (Cardasis and Padykula, 1981; Bishop *et al.*, 2004; Goethals *et al.*, 2010; Tzekova *et al.*, 2014). D'aquesta manera, les SCs poden ser reclutades en situacions com ara de denervació, inflamació, danys en les

fibres musculars o durant certes malalties per tal de produir una fragmentació a nivell de sinapsi. Amb l'envelliment, també s'hi troben associades alteracions a les neurones sensorials dels ganglis de l'arrel dorsal com ara canvis en l'expressió de diversos neuropèptids i atròfia de les poblacions neuronals tant propioceptives com nociceptives (Blasco *et al.*, 2020).

Sembla ser que tots aquests canvis en les NMJs es donen de manera constant al llarg de la vida dels individus, però es produeixen en un major grau durant l'envelliment, en gran part, com a un intent per tal de compensar la pèrdua de MNs que tindrà lloc amb l'edat a través de la reinnervació de les fibres musculars denervades.

5. Nervi ciàtic

En diversos nervis localitzats en les extremitats posteriors, també han estat descrites diferents alteracions durant l'envelliment.

Als nervis del múscul gastrocnemi, ha estat descrita una reducció de les fibres mielinitzades, així com un augment de la quantitat de teixit connectiu endoneural amb l'envelliment; a més, moltes fibres, sobretot en aquelles d'un diàmetre major, mostren irregularitats en la beina de mielina com ara desdoblaments, invaginacions o reduplicacions (Knox *et al.*, 1989; Ansved and Larsson, 1990; Hashizume and Kanda, 1995) (Figura I-10 A, B, D i E).

En les rates d'edat avançada s'ha observat una densa condensació de neurofilaments als axons de la regió proximal dels nervis ciàtics (Uchida *et al.*, 1999), el que pot fer disminuir el subministrament de neurofilaments cap als axons distals, que acaba provocant una reducció del contingut de neurofilaments i del calibre axonal. Ha estat descrit que, mentre els axons distals dels nervis ciàtics de les rates joves són relativament constants i de mida gran, en les rates velles s'observen molts axons petits; el nombre d'axons de mida gran disminueix i el dels axons petits augmenta a la regió distal dels animals vells en comparació amb els joves (Uchida *et al.*, 2004) (Figura I-10 A-C).

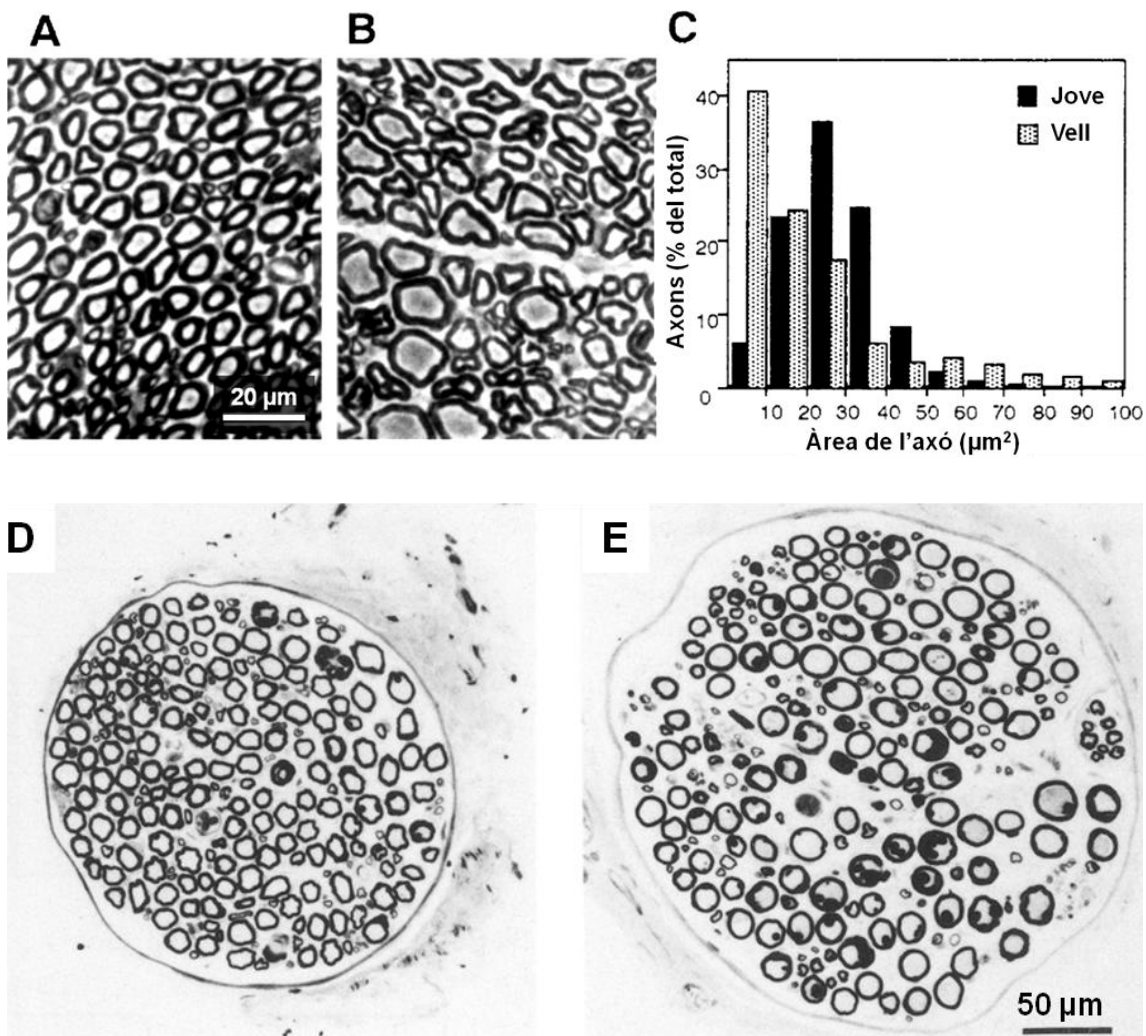


Figura I-10. Àrea transversal dels nervis ciàtics d'una rata jove (A) i d'una vella (B); el regle de calibratge (A, 10 µm) és vàlid per a les imatges A i B. C) Distribució de les àrees axonals en rates joves (de 5 setmanes d'edat, en negre) i en rates velles (de 87 setmanes d'edat, de llunetes). Imatge adaptada d'Uchida *et al.*, 1999.

Àrea transversal dels axons del nervi ciàtic del múscul gastrocnemi d'una rata de mitjana edat (D) i d'una vella (E); el regle de calibratge (E, 50 µm) és vàlid per a les imatges D i E. Imatge adaptada de Hashizume and Kanda, 1995.

6. Prevenció de la sarcopènia

Diversos estudis demostren que l'empitjorament de la funció muscular i l'activitat motora poden millorar amb canvis en l'estil de vida com ara l'exercici o algunes estratègies nutricionals (Tomlinson and Irving, 1977; Ishihara *et al.*, 1987; Jang and Van Remmen, 2011; Kang and Lichtman, 2013; Willadt *et al.*, 2018; Khosa *et al.*, 2019). S'ha descrit també que l'exercici i l'RC són capaços de disminuir la fragmentació observada en les NMJs dels animals vells (Valdez *et al.*, 2010). A més, s'ha demostrat que ambdues estratègies milloren

l'esperança de vida i atenuen l'inici de les malalties relacionades amb l'envelliment i el deteriorament de les funcions dels òrgans.

Tot i que tant l'RC com l'exercici milloren l'homeòstasi de la glucosa al múscul, la funció i la biogènesi mitocondrials i promouen la proteòstasi (Larsson *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2016), recentment ha estat descrit que hi ha diferències entre els efectes induïts per l'exercici i els de l'RC. Ambdues estratègies milloren l'absorció de la glucosa, però només l'exercici millora el contingut mitocondrial, el transport mitocondrial d'electrons i l'oxidació d'àcids grassos (Menshikova *et al.*, 2018). L'RC no indueix canvis en la biogènesi mitocondrial, però redueix el dany oxidatiu al DNA i a les proteïnes a través de la disminució de l'emissió oxidant (Lanza *et al.*, 2012). El fet que no s'observi un efecte sinèrgic entre l'exercici i l'RC podria ser degut als canvis de comportament que indueix l'RC crònica que causa una activitat física intensa en poc temps. Aquesta activitat física d'alta intensitat pot explicar els efectes beneficiosos de la dieta sobre la força muscular i el rendiment, de manera que explica per què l'RC no potencia l'efecte provocat per l'exercici (van Norren *et al.*, 2015). Una altra possible explicació ve donada pel fet que l'RC crònica no millora els ritmes circadians dependents dels nutrients i de la insulina/IGF1, el que ha estat demostrat que són fonamentals per contrarrestar la sarcopènia i l'envelliment (Patel *et al.*, 2016). El dejú intermitent és molt més efectiu que l'RC crònica pel que fa a l'augment de la insulina i l'oscil·lació dels nutrients i, en conseqüència, de l'activitat de FoxO i d'mTOR, els quals modulen els gens d'expressió de l'autofàgia. D'aquesta manera, l'organisme s'adapta als canvis metabòlics diaris a través de la prevenció dels desequilibris energètics relacionats amb l'envelliment, la dislipidèmia i la intolerància a la glucosa (Martinez-Lopez *et al.*, 2016).

Així doncs, l'exercici i el dejú intermitent són més efectius en la preservació de les funcions del múscul i evitant la sarcopènia, actuant com un estímul de l'estrès agut. Els efectes beneficiosos de l'activitat física recauen sobre el sistema de control de qualitat mitocondrial i l'energètica mitocondrial (Zane *et al.*, 2017; Campo *et al.*, 2018; Distefano *et al.*, 2018); de fet, l'energètica mitocondrial està altament relacionada amb la força muscular i l'acció de caminar (Zane *et al.*, 2017; Distefano *et al.*, 2018), de manera que la disfunció

mitocondrial és considerada un predictor de la sarcopènia (Tezze *et al.*, 2017; Campo *et al.*, 2018). Per exemple, s'ha vist que la sensibilitat de l'ADP mitocondrial es troba alterada durant l'envelliment, el que provoca un augment de l'emissió de ROS mitocondrial i de l'estrès oxidatiu (Holloway *et al.*, 2018).

En gent que pateix sarcopènia, els gens i les proteïnes que controlen la fusió i fissió mitocondrials es troben suprimits (Ibebunjo *et al.*, 2013; Tezze *et al.*, 2017; Campo *et al.*, 2018), de la mateixa manera com passa amb els que controlen l'autofàgia (Carnio *et al.*, 2014), el que porta a una disfunció mitocondrial i a un augment de l'estrès oxidatiu. La inhibició de la proteïna de fusió OPA1 o de l'autofàgia són suficients per induir sarcopènia i una senescència prematura en ratolins adults (Carnio *et al.*, 2014; Tezze *et al.*, 2017). L'exercici contraresta molts d'aquests canvis en el control de qualitat mitocondrial relacionats amb l'envelliment a través de la reactivació dels gens de transcripció i traducció de fusió i fissió. L'exercici físic també millora la sensibilitat de l'ADP i la bioenergètica mitocondrial, el que regula l'alliberament de ROS i l'estrès oxidatiu (Holloway *et al.*, 2018), promou la fusió mitocondrial i optimitza la respiració mitocondrial. Aquests processos estan mitjançats pel coactivador transcripcional PGC-1 α , que és un sensor de l'activitat física i es troba regulat a l'alça per l'exercici i, d'altra banda, es troba suprimit pel sedentarisme, per les dianes de PGC-1 α per sota la via de senyalització com ara PPAR, i pel factor de transcripció TFEB; aquest factor de transcripció és activat per les vies del calci o de la calcineurina, i controla l'expressió de PGC-1 α , l'homeòstasi de la glucosa i la flexibilitat metabòlica durant l'exercici (Mansueto *et al.*, 2017). D'aquesta manera, l'expressió de PGC-1 α al múscul en ratolins vells és suficient tant per millorar la funció mitocondrial i la resistència muscular com per mantenir el balanç i la coordinació motora (Gill *et al.*, 2018). A més, l'exercici també prevé l'activació de la proteïna cinasa dependent de DNA (en anglès, *DNA-dependent protein kinase* [DNA-PK]), una proteïna cinasa que detecta trencaments en la doble cadena. Durant l'envelliment, la DNA-PK es troba més activa al múscul i inhibeix les funcions d'AMPK a través del bloqueig de la xaperona HSP90 α (Park *et al.*, 2017); així doncs, la inhibició de la DNA-PK fa augmentar els nivells d'AMPK, prevé el deteriorament de les funcions mitocondrials i de l'activitat física en ratolins de

mitjana edat i protegeix contra la diabetis de tipus 2 (Park *et al.*, 2017). No obstant això, els diferents tipus d'exercici influeixen en diferents bases moleculars: tot i que tant els exercicis aeròbics, els de resistència i els combinats indueixen adaptacions transcripcionals i augmenten la sensibilitat a la insulina i la massa magra en gent d'avançada edat, només els aeròbics i els combinats milloren la funció mitocondrial i la capacitat aeròbica i només els de resistència i els combinats augmenten la força muscular (Phillips *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2017); només l'exercici aeròbic indueix els majors canvis sobre l'expressió gènica independentment de l'edat, mentre que tant l'exercici aeròbic com el de resistència fan augmentar les proteïnes implicades en el procés de transcripció de manera independent a l'edat.

Com que l'exercici i els nutrients afecten la mateixa via de senyalització (encara que a través de mecanismes diferents), es potencien l'un a l'altre a través d'un efecte sinèrgic. La combinació d'una suplementació proteica amb exercicis de resistència redueix la pèrdua de musculatura relacionada amb l'envelliment, ja que ambdues estratègies activen mTOR i els mecanismes de traducció (Bradlee *et al.*, 2017; Englund *et al.*, 2018).

6.1. Exercici

Tot i els efectes beneficiosos de l'RC, cal tenir en compte que moltes vegades és difícil seguir aquest tipus de dietes durant llargs períodes de temps, així que s'han buscat altres estratègies per tal de prevenir el procés d'envelliment, com per exemple a través de l'exercici físic.

Diversos estudis han demostrat que, de manera similar al que s'ha observat amb l'RC, tot i que en menor grau, el fet de sotmetre ratolins de 22 mesos d'edat a realitzar la prova de la roda d'exercici durant un mes reverteix els canvis relacionats amb l'envelliment observats en les NMJs (Valdez *et al.*, 2010).

Gràcies a la capacitat adaptativa del múscul a les diferents demandes funcionals, els estímuls repetits de sobrecàrrega (com per exemple els entrenaments de resistència o les teràpies d'estimulació electrònica crònica) hi provoquen una hipertròfia, un augment de la força muscular i un augment de la capacitat aeròbica i de la resistència a la fatiga per part del múscul (Salmons

and Henriksson, 1981). Així doncs, de menera contrària, l'ús reduït dels músculs esquelètics, com passa durant les paràlisis, les hospitalitzacions o el repòs en llit, provoca atròfia muscular, debilitat i una reducció de la capacitat oxidativa i de la resistència a la fatiga per part del múscul (Degens and Alway, 2006). El fet de reduir l'ús dels músculs esquelètics provoca uns efectes similars als observats durant l'envelliment (Degens and Alway, 2006) i sembla indicar que els baixos nivells d'activitat física junt amb un augment del sedentarisme són la causa de la pèrdua de massa muscular i força relacionades amb l'envelliment (Ingram, 2000; Mcphee *et al.*, 2016; Wullems *et al.*, 2016). Així doncs, s'ha estudiat l'efecte que pot tenir l'exercici sobre la millora de la qualitat de vida de les persones i la seva capacitat de continuar essent independents amb el pas dels anys; de fet, diversos estudis han descrit que l'exercici provoca una hipertròfia muscular i un increment de la força tant en homes com en dones d'edat avançada (Larsson, 1982b; Frontera *et al.*, 1988; Fiatarone *et al.*, 1990; Bassey *et al.*, 1992; Evans, 1993, 1995).

L'exercici físic fa augmentar la taxa de síntesi proteica, el que provoca una hipertròfia muscular (Goldspink *et al.*, 1991); els entrenaments de força progressiva provoquen una millora en les habilitats per realitzar les activitats de la vida diària: milloren la velocitat de la marxa, la potència a l'hora de pujar escales i els nivells d'activitat espontània tant en homes com en dones d'edat avançada (Bassey *et al.*, 1992). Aquests efectes estan relacionats amb un augment en l'expressió de les proteïnes de resposta a estrès, estructurals, contràctils i metabòliques (Mouchiroud *et al.*, 2014). D'altra banda, en situacions d'inactivitat, s'ha observat una disminució en la taxa de síntesi proteica que, combinada amb un augment en la taxa de degradació proteica, condueix a una debilitat i atròfia musculars.

Ha estat descrit que, durant l'envelliment, es produeix una disminució de l'àrea transversal del múscul i de la densitat dels músculs de les extremitats posteriors en humans, el que indica que hi ha tant una pèrdua de massa muscular com una substitució del material contràctil per teixit gras i connectiu (Imamura *et al.*, 1983) de manera similar a com s'ha observat en rates.

S'ha vist que el nombre d'unitats motores es preserva en major grau als

músculs de la part superior del cos que en els de la part inferior tant en humans (Galea, 1996) com en rosegadors (Valdez *et al.*, 2012). Ja que tant l'activitat com la massa dels músculs locomotors de les extremitats inferiors disminueixen més que les dels braços durant l'envelliment (Janssen *et al.*, 2000), sembla ser que l'activitat física prevé la pèrdua d'unitats motores als músculs dels braços. Una prova n'és que els atletes màsters tenen un major nombre d'unitats motores que els controls de la seva mateixa edat (Power *et al.*, 2010), amb una millor reinnervació (donat el fet que presenten unes unitats motores més grans) (Piasecki *et al.*, 2016), un menor nombre de fibres denervades i un major percentatge d'agrupaments per tipologia de fibres (Mosole *et al.*, 2014); no obstant això, respecte la reducció en el nombre d'unitats motores que es produeix durant l'envelliment (Drey *et al.*, 2014), no s'observa una millora en els atletes màster (Piasecki *et al.*, 2016). De la mateixa manera, als músculs dels rosegadors tampoc s'ha observat una millora en la supervivència de les unitats motores a través de l'activitat física (Aagaard *et al.*, 2010). Així doncs, no hi ha evidències que demostrin que el fet de realitzar exercici de manera regular previngui la pèrdua d'unitats motores o la mort de les MNs. El que sí sembla ser és que gran part del desgast i la debilitat musculars relacionats amb l'envelliment estan paral·lelament relacionats amb uns nivells reduïts d'activitat física. El fet de realitzar exercici de manera regular exerceix uns efectes beneficiosos per a la força muscular i la resistència en edats avançades.

La plasticitat muscular es manté en edats avançades, de manera que es poden aconseguir guanys de fins a un 30 % en la massa muscular o de la capacitat aeròbica en qualsevol edat. No obstant això, l'augment total disminueix a mesura que augmenta l'edat, així que un centenari mai no podrà tenir la mateixa massa muscular que quan era jove. De fet, tant en humans (Welle *et al.*, 1996; Petrella *et al.*, 2006) com en rosegadors (Blough and Linderman, 2000; Ballak *et al.*, 2015, 2016) la capacitat hipertrofica del múscul es veu reduïda i fins i tot el fet de realitzar exercici pot resultar en un deteriorament enlloc d'una millora de la força (Degens and Alway, 2003). A més, s'ha vist que, en rates que comencen a realitzar exercici de manera permanent a partir d'edats avançades, el resultat és una reducció enlloc d'un augment de

l'esperança de vida (Edington *et al.*, 1972); de la mateixa manera, en humans ha estat descrit que les milliores en l'esperança de vida són negligibles o, fins i tot, nul·les a partir dels 100 anys d'edat (Dong *et al.*, 2016). Això posa de manifest que l'efecte rejuvenidor de l'exercici disminueix a mesura que augmenta l'edat.

Totes aquestes intervencions, combinades amb un estil de vida menys sedentari i uns bons hàbits alimentaris, tenen la capacitat de millorar la funció muscular amb efectes significativament positius en la mobilitat, reduint així el risc d'accidents relacionats amb les caigudes i millorant la qualitat de vida, tot i que no s'ha pogut demostrar que tinguin un gran efecte sobre la millora de l'esperança de vida.

6.2. Restricció calòrica (RC)

S'ha vist que l'RC, basada en una dieta baixa en calories, atenua la sarcopènia lligada a l'envelliment en diverses espècies; és un mitjà efectiu per augmentar l'esperança de vida en una gran varietat d'organismes, des dels llevats fins als primats i, fins i tot, probablement en humans (Heininger, 2002; Dirks and Leeuwenburgh, 2006; Vermeij *et al.*, 2016). En ratolins progèrics, l'RC és capaç de triplicar la seva esperança de vida (Vermeij *et al.*, 2016). Això és degut al fet que els recursos són redirigits cap a un manteniment, enlloc del creixement i la reproducció (Vermeij *et al.*, 2016), per tal de superar els períodes de baixa ingesta alimentària, el que redueix les probabilitats de supervivència de la descendència (Kirkwood, 2002).

D'altra banda, s'ha demostrat que una reducció en la ingesta calòrica, sola o combinada amb exercici, és capaç de millorar el sistema de reparació endogen de les miofibres, contrarestar l'augment dels senyals proapoptòtics observats en els músculs dels animals vells, pal·liar les alteracions mitocondrials, la pèrdua de mitocondris i la producció de ROS, així com modular l'autofàgia (Hashizume and Kanda, 1990; Doherty *et al.*, 1995; Jacob, 1998; Heininger, 2002; Power *et al.*, 2010; McKinnon *et al.*, 2017); a més, millora els canvis en les NMJs relacionats amb l'envelliment i prevé la degeneració de les MNs i dels axons motors que es dona durant l'envelliment (Chopek and Gardiner, 2010; Valdez *et al.*, 2010). Aquesta disminució de la producció de ROS que provoca

l'RC podria venir donada per la reducció del potencial de membrana mitocondrial provocada per un augment de l'activitat de la translocassa del nucleòtid d'adenina (Ash and Merry, 2011). La reducció de l'estrés oxidatiu fa que no hi hagi un augment relacionat amb l'envelliment en l'expressió de gens implicats en la resposta a estrès, sinó que hi ha un canvi en els gens d'expressió cap a un augment del recanvi proteic i una disminució del dany macromolecular durant l'RC (Lee *et al.*, 1999).

La reducció del dany al DNA provocada per l'RC en ratolins amb deficiències en els gens de reparació del DNA triplica la seva esperança de vida i, a més, millora el manteniment de les MNs i la funció motora (Vermeij *et al.*, 2016). Fins i tot en ratolins sans, l'RC atenua la pèrdua de MNs i disminueix la gran quantitat d'anormalitats pre- i postsinàptiques que s'observen en ratolins de 24 mesos d'edat (Valdez *et al.*, 2010); la reducció en la pèrdua de MNs té lloc com a conseqüència, en part, de la reducció de l'apoptosi dependent de caspasa (Chopek and Gardiner, 2010). D'aquesta manera, la reducció en la pèrdua de MNs induïda per l'RC explica la prevenció de la pèrdua muscular durant l'envelliment en rates sotmeses a una RC del 40 % a partir dels 4 mesos d'edat (McKiernan *et al.*, 2004).

A més de reduir la disminució en el nombre de MNs i les alteracions en les NMJs, l'RC també té un efecte positiu sobre el múscul esquelètic a través de la reducció dels nivells d'inflamació sistèmics, tal com s'ha observat en rates; alhora, la reducció de la inflamació sistèmica provoca una disminució de l'apoptosi als músculs (Phillips and Leeuwenburgh, 2005).

No obstant això, cal anar amb compte a l'hora d'aplicar un tractament d'RC, ja que hi ha un cert risc de provocar una baixada en la pressió arterial, problemes en el procés de cicatrització i perill de malnutrició (Dirks and Leeuwenburgh, 2006). A més, quan s'aplica aquest tractament en persones amb obesitat sarcopènica, s'ha observat que es produeix una pèrdua de massa muscular, pel que la pèrdua de pes mitjançant aquesta estratègia estaria contraindicada en aquests casos (Miller and Wolfe, 2008). En general, però, l'RC representa una eina per prevenir alguns dels canvis relacionats amb l'envelliment que es produeixen al múscul esquelètic i alhora deixa veure els efectes perjudicials

que representen les dietes riques en calories als països desenvolupats, les quals poden provocar un envelliment prematur del múscul esquelètic, donat el fet que les persones amb obesitat o amb sobrepès presenten unes majors taxes d'envelliment al múscul (Tomlinson *et al.*, 2016).

6.3. Dietes

De la mateixa manera com s'ha vist amb l'RC, ha estat descrit que alguns suplementos són capaços de contrarestar els canvis relacionats amb l'envelliment que promouen la disfunció neuromuscular (Jang and Van Remmen, 2011); les suplementacions amb àcids grassos omega-3, creatina, vitamina D, àcid β -hidroxi- β -metilbutíric o fosfolípids dietètics promouen un envelliment neuromuscular saludable mitjançant efectes miotrófics, neurotròfics i antiinflamatoris, inhibeixen la proteòlisi muscular, regulen les vies implicades en la funció mitocondrial i en la producció de ROS i milloren la bioenergètica cel·lular.

Els flavonoides vegetals són utilitzats per mantenir un bon estat de salut i prevenir diverses malalties, en especial els desordres cardíacs i el càncer (Chai *et al.*, 2011). S'ha descrit que els suplementos rics en flavonoides polifenòlics disminueixen els nivells d'estrès oxidatiu i el dany muscular, en especial després de realitzar exercici intensiu de força i resistència (Beyer *et al.*, 1999; Arent *et al.*, 2010; Bowtell *et al.*, 2011; Trombold *et al.*, 2011; Machin *et al.*, 2014; Herrlinger *et al.*, 2015).

6.3.1. Te verd

Diversos estudis han demostrat que els polifenols presents en el te verd i en els seus extractes prevenen l'empitjorament muscular que pateixen els pacients amb distròfia muscular de Duchenne (Davoodi *et al.*, 2012) i els models animals d'aquesta malaltia (Buetler *et al.*, 2002; Dorchies *et al.*, 2006; Call *et al.*, 2008) així com en l'envelliment (Murase *et al.*, 2008; Meador *et al.*, 2015) o en la pèrdua muscular com a conseqüència de la immobilització (Alway *et al.*, 2014, 2015).

L'extracte de te verd és ric en un tipus de flavonoides coneguts com a catequines, que inclouen la catequina, l'epicatequina, la gal·locatequina, l'epigal·locatequina, el gal·lat d'epicatequina i el gal·lat d'epigal·locatequina (en

anglès, *epigallocatechin gallate* [EGCg]) i que tenen grans propietats antioxidants i antiinflamatòries (Valcic *et al.*, 2000; Meador *et al.*, 2015).

6.3.2. Cacao

Un altre tipus de flavonoide, conegut com a flavanol, es troba present en els grans de cacao i en els seus derivats. D'aquesta manera, els productes elaborats amb cacao són rics en monòmers no esterificats de la catequina dels flavanols, de l'epicatequina i de les proantocianidines (Wollgast and Anklam, 2000). L'epicatequina representa un 35 % del contingut total en polifenols dels grans de cacao i és la responsable dels efectes beneficiosos del cacao. Ha estat demostrat que aquests polifenols actuen com a antioxidants, immunomoduladors, protectors cardiovasculars, agents antiinflamatoris i protectors tumorals (Lamuella-Raventós *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2011; Magrone *et al.*, 2017; Marika *et al.*, 2019; Munguia *et al.*, 2019). S'ha descrit que l'epicatequina és capaç de promoure neuroprotecció *in vitro* contra l'estrès oxidatiu (Ramiro-Puig *et al.*, 2009). A més, estudis *in vivo* han demostrat que una dieta suplementada amb epicatequina millora la capacitat oxidativa del múscul esquelètic, augmenta la taxa de supervivència dels animals i millora el deteriorament físic que es dona amb l'envelliment (Nogueira *et al.*, 2011; Si *et al.*, 2019).

Malgrat el conjunt d'efectes beneficiosos descrits d'una dieta rica en polifenols sobre l'activitat física i l'exercici, encara no s'ha aprofundit en l'anàlisi dels efectes d'aquests compostos en el sistema neuromuscular. La majoria dels estudis realitzats prèviament s'han centrat en els efectes dels flavonoides segons diversos paràmetres del múscul esquelètic, sense focalitzar-se en els seus efectes sobre els elements neurals del sistema neuromuscular.

7. Models experimentals de l'envelliment

7.1. Humans

La llarga durada del procés d'envelliment dificulta l'estudi de la sarcopènia en humans; a més, hi ha una gran variabilitat entre els diferents individus i cal tenir en compte que els músculs es veuen afectats per molts altres factors a banda de l'envelliment.

Al llarg de la història, s'han fet estudis d'envelliment tant transversals, en els

quals es mesura la prevalença en una mostra poblacional en un moment donat, com longitudinals, on s'analitza una mostra poblacional durant un període de temps. Molts dels factors que afecten els músculs esquelètics durant l'envelliment com ara l'activitat física o els hàbits nutricionals han canviat de manera significativa durant els darrers anys, fet que dificulta la interpretació dels resultats quan es tracta d'estudis transversals quan es realitzen en individus longeus, com és el cas dels humans. A més, d'una banda, és difícil reunir un gran nombre d'individus en les franges d'edat més avançades; d'altra banda, aquests individus que tenen una esperança de vida considerablement superior a la mitjana presenten unes qualitats que han estat descrites com a un fenomen d'envelliment revertit, que també s'ha observat en els rosegadors envellits. Pel que fa als estudis longitudinals, aquests no presenten els desavantatges descrits anteriorment, però són estudis que s'han de realitzar durant períodes de temps molt llargs si es fan amb espècies amb una llarga esperança de vida, com és el cas dels humans o fins i tot dels rosegadors, ja que es necessita una mida mostral gran degut al fet que les mostres de teixit s'han de recollir a diferents punts d'edat. A més, aquests tipus d'estudis es veuen afectats pels canvis nutricionals que es van produint al llarg dels anys.

7.2. Rosegadors (ratolins i rates)

El fet d'utilitzar rosegadors en els estudis de sarcopènia en permet una reducció dels costos. Per tal de solucionar el problema relacionat amb la mida mostral, es poden utilitzar algunes soques de ratolins endogàmics idèntics recombinats genèticament sacrificats a diferents punts d'edat, de manera que s'obté un estudi longitudinal amb un disseny transversal (Lionikas et al., 2004, 2005; Lionikas et al., 2006). Una alternativa als models mencionats anteriorment són els que es basen en un envelliment prematur, tot i que l'envelliment és un procés biològicament tan complex que és molt difícil de reproduir en aquests models.

Pel que fa als estudis d'envelliment i de malalties musculars, la rata podria representar un model més adient per la seva semblança als humans (Ballak *et al.*, 2014); a més, aquest model permet realitzar una gran variabilitat de manipulacions genètiques.

8. Proves motores

8.1. *Grid stepping*

El test del *grid stepping* és una prova altament específica, ja que pretén mesurar un sol aspecte del comportament. El test es pot realitzar de tres maneres diferents: mesurant l'habilitat dels animals per mantenir-se aferrats en una superfície invertida o inclinada com ara una reixa o la tapa d'una gàbia (Cabe *et al.*, 1978; Barnéoud *et al.*, 1997) durant un període de temps, normalment un minut; mesurant l'habilitat de l'animal per mantenir-se agafat a una reixa amb les seves potes posteriors durant una durada determinada o fins que cau (Joseph *et al.*, 1986); o fent mesures específiques de la força requerida per separar l'animal d'una barra estreta a la qual està agafat (Riezen and Boersma, 1969; Cabe *et al.*, 1978; Glynn *et al.*, 2005).

Aquest test ha estat utilitzat en ratolins per mesurar la seva tolerància a certes drogues com ara l'etanol (EtOH), que indueix mio-relaxació, i per avaluar la progressió de diferents malalties que afecten la musculatura.

8.2. *Open-field*

El test de l'*open-field* és el test més senzill per avaluar l'activitat locomotora, ja que consisteix a observar i enregistrar els moviments dels animals dins d'una àrea oberta. Quan es deixa el ratolí al centre d'un camp, aquest normalment correrà cap a una de les parets i després explorarà tota la resta de l'àrea, mantenint-se a prop de la paret; amb el temps, a mesura que l'animal s'habitua al nou entorn i la seva ansietat disminueix, s'atansarà cada vegada més a les parts centrals i trigarà més estona a tornar cap a una de les parets. Aquest test es pot realitzar en camps circulars (Ma *et al.*, 2001; Visser and Bos, 2006) o quadrats (Grüsser and Grüsser-Cornehls, 1998; Menalled *et al.*, 2002; Leonibus *et al.*, 2007), dividits en segments o quadrats, i normalment es fa un recompte del nombre d'entrades a les zones perifèriques i a les centrals, del nombre de *rearings* (quan l'animal es planta sobre les dues potes posteriors), de *groomings* (quan l'animal es frega el morro amb les potes) i de defecacions. Aquest recompte es pot fer de forma manual, però també es pot fer un enregistrament automatitzat dels moviments dels ratolins, normalment mitjançant un seguiment per vídeo, feixos de fotocèl·lules o amb tecnologia de detecció electromagnètica (Brooks *et al.*, 1996; Grüsser and Grüsser-Cornehls,

1998; Drai *et al.*, 2001; Thifault *et al.*, 2001); fins i tot, aquests sistemes es poden muntar a les mateixes gàbies, evitant així l'ansietat que pot crear moure els animals a un nou entorn a l'hora de realitzar el test.

8.3. Rotarod

La finalitat del test del *rotarod* és la de realitzar mesures automatitzades de dèficits neurològics en rosegadors (Dunham and Miya, 1957) i és una de les proves de funció motora més utilitzades en ratolins. Els primers dissenys consten d'una vareta giratòria d'uns 3 cm de diàmetre sobre la qual es situa el ratolí, que ha de mantenir l'equilibri; a la part inferior, hi ha un polsador configurat per tal d'enregistrar la latència fins que el ratolí cau de la vareta giratòria. Els ratolins es posen a prova realitzant el test diverses vegades, que es pot dur a terme amb una sèrie de velocitats fixes o incorporant un augment de la velocitat mitjançant una versió d'acceleració al test (Jones and Roberts, 1968). En aquestes versions amb acceleració, el rang de velocitats pot variar entre els diferents estudis, però normalment la vareta giratòria pot anar de 0 a 40 rpm durant un període de 5 min. El test d'acceleració és més ràpid i més eficient, però s'hi confon la coordinació motora a diferents velocitats amb la fatiga, mentre que el test de velocitat fixa proporciona dades separades sobre cada rang de velocitats en la rotació i, probablement, és més sensible (Monville *et al.*, 2006). No obstant això, els dèficits diferencials que es motren amb les velocitats de rotació més elevades en una sèrie de tests a velocitat fixa (Carter *et al.*, 1999) es poden utilitzar per assegurar que una caiguda més ràpida es troba atribuïda a problemes en la coordinació motora més que a una major susceptibilitat a la fatiga.

Els resultats del test del *rotarod*, però, es poden veure esbiaixats degut al fet que, com que certs models tenen una vareta giratòria rugosa per facilitar-hi l'adherència, alguns animals poden aferrar-s'hi amb les urpes i girar amb ella enlloc de caure quan perden l'equilibri; una possible solució a aquest problema és cobrir la vareta amb una capa de cautxú gruixut. Un altre biaix es dona quan, de manera contrària, certs animals rebutgen realitzar la prova i es deixen caure en quant es col·loquen sobre la vareta; aquest problema té lloc sobretot en estudis longitudinals, durant els quals els animals poden aprendre, després de realitzar el test diverses vegades, que les conseqüències de les caigudes

són innòcues. En aquests casos, aquests animals han de ser exclosos a l'hora de realitzar l'anàlisi estadística, fet que alhora suposa un problema addicional, ja que es veu reduïda la mida mostral. Un altre problema que pot sorgir és el relacionat amb el pes dels ratolins, ja que els que tenen un major pes presenten més dificultats per realitzar les proves que aquells que són més lleugers; així doncs, la pèrdua de pes genètica o induïda per lesions o per la dieta pot compensar la discapacitat motora i fer variar de nou els resultats. Per descartar que canvis en la realització de la prova puguin ser deguts a diferències en el pes dels animals, és convenient fer un seguiment del pes corporal dels ratolins en els diferents punts en què es realitzen els tests.

Malgrat tots aquests inconvenients, el test del *rotarod* continua sent una de les proves principals a l'hora d'avaluar la funció motora dels ratolins a causa de la seva fàcil utilització i la seva sensibilitat.

8.4. Pen test

El *pen test*, també conegut com al test de la barra d'equilibri, tal com indica el seu nom, avalua l'habilitat dels animals per mantenir l'equilibri mentre atravessen una barra fins que arriben a una plataforma segura. En aquest test, l'animal es col·loca en un extrem de la barra (que sol ser d'1,5 cm de diàmetre i 30 cm de llarg), que es situa a certa alçada del terra, i s'enregistra el temps que l'animal triga a arribar a una plataforma situada a l'altre extrem sense caure; el test es dona per finalitzat després d'un temps arbitrari de 15 segons. El test es sol realitzar 3 vegades, amb una recuperació de 15 min entre elles, i s'utilitza com a puntuació final el valor obtingut en el millor dels 3 intents. A banda del temps necessari per creuar la biga, també es poden enregistrar el nombre de falliments de les potes. Algunes versions utilitzen un rang de talls transversals i diferents diàmetres per tal de variar la dificultat del test (Carter *et al.*, 1999).

Originàriament, aquest test va ser dissenyat per avaluar els dèficits motors en rates velles (Wallace *et al.*, 1980) i ha estat demostrat que també és útil per avaluar la coordinació motora i l'equilibri en ratolins joves, lesionats o alterats genèticament (Carter *et al.*, 1999; Kiernan *et al.*, 1999). D'altres, utilitzen una barra que es torna cada vegada més estreta a mesura que s'aproxima a la plataforma segura. En les primeres versions, que utilitzen seccions quadrades i

rodones senzilles, els ratolins poden caure ocasionalment i la freqüència de les caigudes es converteix en una variable independent addicional.

9. Proves electrofisiològiques

Les proves electrofisiològiques són fonamentals per al diagnòstic i el seguiment de la progressió dels pacients que pateixen malalties de la MN (Mitsumoto *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Wijesekera and Leigh, 2009; Krarup, 2011). Aquestes proves han estat utilitzades per diversos autors en el model SOD1^{G93A} per tal de realitzar una anàlisi de la funció de les MNs (Kennel *et al.*, 1996; Azzouz *et al.*, 1997; Shefner *et al.*, 2006; Hegedus *et al.*, 2007, 2008), amb les quals s'obté una detecció precoç i una avaluació de la malaltia en aquest model animal. D'altra banda, aquests tipus de tests també han servit per avaluar la funció dels nervis perifèrics en diverses malalties neuropàtiques (Verdú *et al.*, 1999; Bruna *et al.*, 2010) o després d'un traumatisme nerviós (Navarro *et al.*, 1994; Udina *et al.*, 2003), el que indica que aquestes proves poden ajudar en la detecció precoç i en la quantificació de la pèrdua o la recuperació de les funcions motores i sensorials (Navarro and Udina, 2009).

En estudis electrofisiològics anteriors realitzats en models animals d'ALS, s'ha descrit que aquests animals mostren una pèrdua funcional progressiva, amb un patró lleugerament diferent segons el múscul analitzat, així com una reducció en l'amplitud de l'ona M, tant al múscul TA com al plantar, en comparació amb els controls, el que indica un deteriorament de la innervació neuromuscular funcional. A més, aquests tests han revelat que aquests animals mostren un alentiment de la conducció de les fibres nervioses motores i una desacceleració en el temps de conducció de les fibres motores més grans (reflectit en la latència a l'inici de l'ona M) en ambdòs músculs i de les fibres motores petites (reflectit en un augment de la durada de l'ona M) al múscul plantar distal a mesura que progressa la malaltia. Pel que fa als reflexes motors de la medulla espinal, també es veuen alterats en ambdòs músculs en el model d'ALS (reflectit en un augment de la relació H/M respecte els controls). D'altra banda, també s'ha descrit que aquests ratolins tenen una menor supervivència de les MNs espinals en comparació amb els controls, reflectit en una disminució en ambdòs músculs en l'estimació numèrica de la unitat motora (en anglès, *motor unit number estimation* [MUNE]), així com una menor amplitud mitjana de les

unitats motores i del potencial d'acció muscular compost (en anglès, *compound muscle action potential* [CMAP]) (Mancuso *et al.*, 2011).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. Hipòtesi

Tot i que s'han fet avenços notables en la comprensió dels factors causals que condueixen a la sarcopènia durant l'envelliment, els mecanismes cel·lulars i moleculars exactes responsables d'aquest procés encara es desconeixen. A més, hi ha una divergència notable en els resultats descrits sobre els canvis relacionats amb l'edat observats en els diferents components del sistema neuromuscular i la seva contribució al desgast muscular progressiu en la gent gran. Aquestes diferències es noten especialment quan es comparen dades de diferents models animals d'envelliment i, encara més, si es comparen amb els canvis neuromusculars observats en estudis humans. Aquestes discrepàncies podrien ser degudes al fet que molts estudis es centren en components específics del sistema neuromuscular enlloc de realitzar una anàlisi del sistema neuromuscular en la seva totalitat.

Per tant, la nostra hipòtesi és que:

Examinant en conjunt els diferents components cel·lulars que configuren el sistema neuromuscular i que són essencials per a una funció motora adequada, s'obtindrà una caracterització detallada dels canvis fisiopatològics que es produeixen al sistema neuromuscular del ratolí al llarg de l'envelliment, descrivint així els mecanismes que condueixen a les alteracions neuromusculars associades a l'edat.

Així doncs, tenint en compte la nostra hipòtesi, es vol fer una anàlisi simultània dels canvis estructurals i moleculars que es produeixen amb l'edat a les NMJ i els músculs esquelètics de ratolins C57BL/6JRj. Per avaluar si els canvis musculars relacionats amb l'edat depenen de la seva ubicació regional (distal o proximal) i la funció específica, es volen estudiar diferents músculs de les extremitats posteriors amb una posició i composició de tipus de miofibra diferents. A més, per tal d'examinar *in vivo* els possibles canvis relacionats amb l'edat en la innervació muscular, es vol realitzar una anàlisi electrofisiològica mitjançant electromiografia quantitativa.

En conjunt, es pretén assolir una millor comprensió dels canvis neuromusculars que es produeixen amb l'envelliment i dels mecanismes patogènics que

conduïxen a la sarcopènia, el que és crucial per al desenvolupament d'intervencions efectives dirigides a la prevenció i el tractament.

Donat antecedents de millores amb dieta, es vol realitzar un estudi amb extracte del te verd i cacau per comprovar si indueixen modificacions sobre els canvis descrits relacionats amb l'envelliment tant a l'NMJ com al múscul esquelètic.

2. Objectius

Els objectius principals d'aquest projecte són:

1. Estudiar les alteracions que es donen, en conjunt, a l'NMJ i al múscul esquelètic durant envelliment i la relació que hi ha entre aquests canvis.
2. Analitzar si les alteracions estructurals i funcionals en les NMJs i el múscul esquelètic relacionades amb l'envelliment poden ser pal·liades amb una suplementació alimentària oral amb extracte de te verd o cacau en un model murí, comparant els efectes amb els d'una dieta control.

La informació resultant d'aquests estudis contribuirà a una millor comprensió del paper de la dieta en el control dels canvis estructurals i funcionals de les sinapsis i del manteniment de la funció neuromuscular, i podria ser rellevant per al futur desenvolupament d'estratègies centrades en el tractament de les disfuncions de les sinapsis i en la pèrdua neuronal que es donen en l'envelliment i en malalties neurodegeneratives, en particular en aquelles implicades en el sistema neuromuscular.

MATERIAL I MÈTODES

1. Animals i dietes

La manipulació dels animals i tots els processos d'experimentació es van realitzar seguint els estàndards d'ètica establerts en la declaració de Hèlsinki del 1964, la directiva del consell de les comunitats europees 2010/63/EU per a la cura i l'ús dels animals de laboratori i les normes establertes per la Generalitat de Catalunya (publicades al "Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya [DOGC] 2073", 1995). Tots els experiments van ser avaluats prèviament a la seva realització per part del "Comitè per a la cura i l'ús d'Animals" de la Universitat de Lleida, que també segueix la guia descrita a Hawkins *et al.*, 2011, i el "Comitè d'Ètica en Experimentació Animal i Recerca en Humans" de la Universitat Autònoma de Barcelona. Es van prioritzar en tot moment la minimització del patiment i la utilització del nombre mínim d'animals d'acord amb la directiva del consell de les comunitats europees (24 de novembre del 1986, 86/609/EEC). Tal i com ha estat descrit anteriorment (Miller, 2006; Burkholder *et al.*, 2012), els animals que van mostrar tumors, anormalitats físiques i/o signes patològics evidents van ser exclosos de l'estudi i van ser sotmesos a eutanàsia mitjançant una sobredosi (30 mg) intraperitoneal de pentobarbital.

Es van utilitzar ratolins C57BL/6JRj mascles, procedents dels laboratoris Janvier (Saint Berthevin, França). Només es van utilitzar mascles per tal d'evitar el biaix de gènere i per minimitzar el nombre d'animals necessaris per a la realització de l'estudi.

Els ratolins van ser allotjats a l'estabulari de la Universitat de Lleida amb cicles de 12 h de llum/fosc, i amb una temperatura ambient i humitat controlades a 20 ± 2 °C i al 50 %, respectivament. Es van distribuir els ratolins en gàbies (3 animals per gàbia) que contenien una *nest box* (Smart-House, ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Alemanya), on tenien accés *ad libitum* al menjar i l'aigua.

Per a la "Caracterització dels processos de maduració i envelliment a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj", es van utilitzar 45 animals de 3 grups d'edat (15 animals per grup), considerats com a joves, adults i vells

segons els criteris descrits a Flurkey et al., 2007: els animals joves tenien 1-2 mesos, els adults, 4-10 mesos i els vells, ~19 mesos o més.

Per a la descripció de l'”Efecte de dietes suplementades amb cacau o amb te verd sobre els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment”, es van utilitzar 45 animals de 21 mesos d'edat distribuïts de manera aleatòria en 3 grups (15 animals per grup) i alimentats cadascun d'ells amb la dieta estàndard AIN-93M (grup control), una dieta AIN-93M suplementada amb te verd al 0,5 % (Suphenon 90D, Taiyo, grup del te verd), o una dieta AIN-93M suplementada amb un 0,133 % de cacau en pols alt en flavanol (Acticoa, Barry Callebaut, grup del cacau). D'aquesta manera, els animals del grup del te verd van rebre una dosi mitjana de ~200 mg d'EGCg/kg de pes corporal/dia; els animals del grup del cacau, van rebre una dosi mitjana de ~13,33 mg de flavanols/kg de pes corporal/dia. El període de dietes es va iniciar a P651 (equivalent a 93 setmanes o a 21 mesos) i va finalitzar a P805 (equivalent a 116 setmanes o a 27 mesos). Es va fer un control setmanal del consum de pinso de cada animal: en un punt inicial, es van posar 100 g de pinso per gàbia; cada 7 dies, es retirava el pinso restant per saber-ne el consumit i es reposaven uns altres 100 g.

Es va fer un registre de la data de la mort de cada animal per tal de calcular les supervivències mitjanes de cada grup.

1.1. Proves d'habilitat motora i determinació del pes dels animals

Per tal de determinar l'impacte de la progressió de l'envelliment primer i el de diferents dietes suplementades després, sobre les habilitats motores, els animals van ser pesats, examinats i sotmesos a diferents proves d'habilitat motora cada 4 setmanes segons ha estat descrit a Brooks & Dunnett, 2009. Les proves es van fer sempre al matí.

Per a la “Caracterització dels processos de maduració i envelliment a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj”, es van realitzar els tests *grid stepping* i *rotarod* (per avaluar la coordinació motora i l'equilibri) i l'*open-field* (per analitzar l'activitat locomotora) en 45 animals (15 de cada grup: joves, adults i vells).

Després de veure que els tests *grid stepping* i *rotarod* no eren adients per descriure el procés d'envelliment, a l'apartat de descripció de l'"Efecte de dietes suplementades amb cacau o amb te verd sobre els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment" no es van realitzar aquests dos tests, sinó que es van sotmetre els animals al *pen test*, a més de l'*open-field*. Les proves es van realitzar a 45 animals (15 de cada grup: dieta control, cacau i te verd).

Els tests *grid stepping*, *rotarod* i *pen test* es van repetir un màxim de 3 vegades (sempre que en cap de les vegades anteriors el ratolí hagués assolit uns temps d'1 minut per al *grid stepping* i per al *pen test* i de 3 minuts per al *rotarod*, considerats com a la superació amb èxit de les proves), amb un descans de 15 minuts entre repeticions; es va enregistrar el valor màxim de temps dels 3 intents.

1.1.1. *Grid stepping*

Aquest test valora la força muscular exercida per les potes dels ratolins i detecta les disfuncions motores.

La prova consisteix a col·locar l'animal a sobre d'una reixa en posició horitzontal, donar una volta de 180° en l'eix horitzontal a la reixa, de manera que el ratolí hi queda a la part inferior, i cronometrar el temps que l'animal és capaç de restar-hi agafat sense caure. A la part inferior, es posa un llençol estès laxament a uns 50 cm de la reixa, de manera que amorteix la caiguda dels ratolins (Figura MiM-1).



Figura MiM-1. Prova del *grid stepping*, on es mostra un ratolí jove realitzant el test.

1.1.2. *Open-field*

Aquest test avalua l'activitat motora, així com els nivells d'ansietat i les habilitats exploratòries dels animals.

Es tracta d'un recinte de base quadrada que disposa d'una càmera a la part superior connectada al programa Smart Video Tracking (v2.5.21, Panlab Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA); el programa divideix de manera virtual la base del recinte en 16 zones quadrades (4 x 4) (Figura MiM-2). S'utilitzen recintes de diferents mides segons l'animal a estudiar; en el cas dels ratolins, al nostre laboratori se n'utilitza un de quadrat de 45,5 cm de costat de base i de 40 cm d'alçada.

L'animal es situa dins el recinte durant 5 minuts; durant aquest temps, el programa enregistra diferents paràmetres com ara la distància recorreguda, el nombre d'entrades a les diferents zones, el temps i el nombre d'entrades a les 4 zones centrals i les velocitats mitjana i màxima (Figura MiM-2 A).

A banda dels paràmetres analitzats per part del software, es van comptar el nombre de *rearings* i de *groomings* que l'animal feia durant els 5 minuts. El nombre de *rearings* que fa l'animal serveix com a mesura dels seus nivells d'ansietat i es donen quan aquest es planta únicament sobre les dues potes posteriors, mentre que les anteriors romanen enlaire o recolzades a la paret (Figura MiM-2 B), (Crusio, 2001; Sturman *et al.*, 2018); els *groomings* són un tipus de comportament anomenat de manteniment, que serveixen per mantenir l'estasi psicològica, el confort i l'aparença de l'animal, i es donen quan aquest es frega el morro amb les potes davanteres (Figura MiM-2 C).

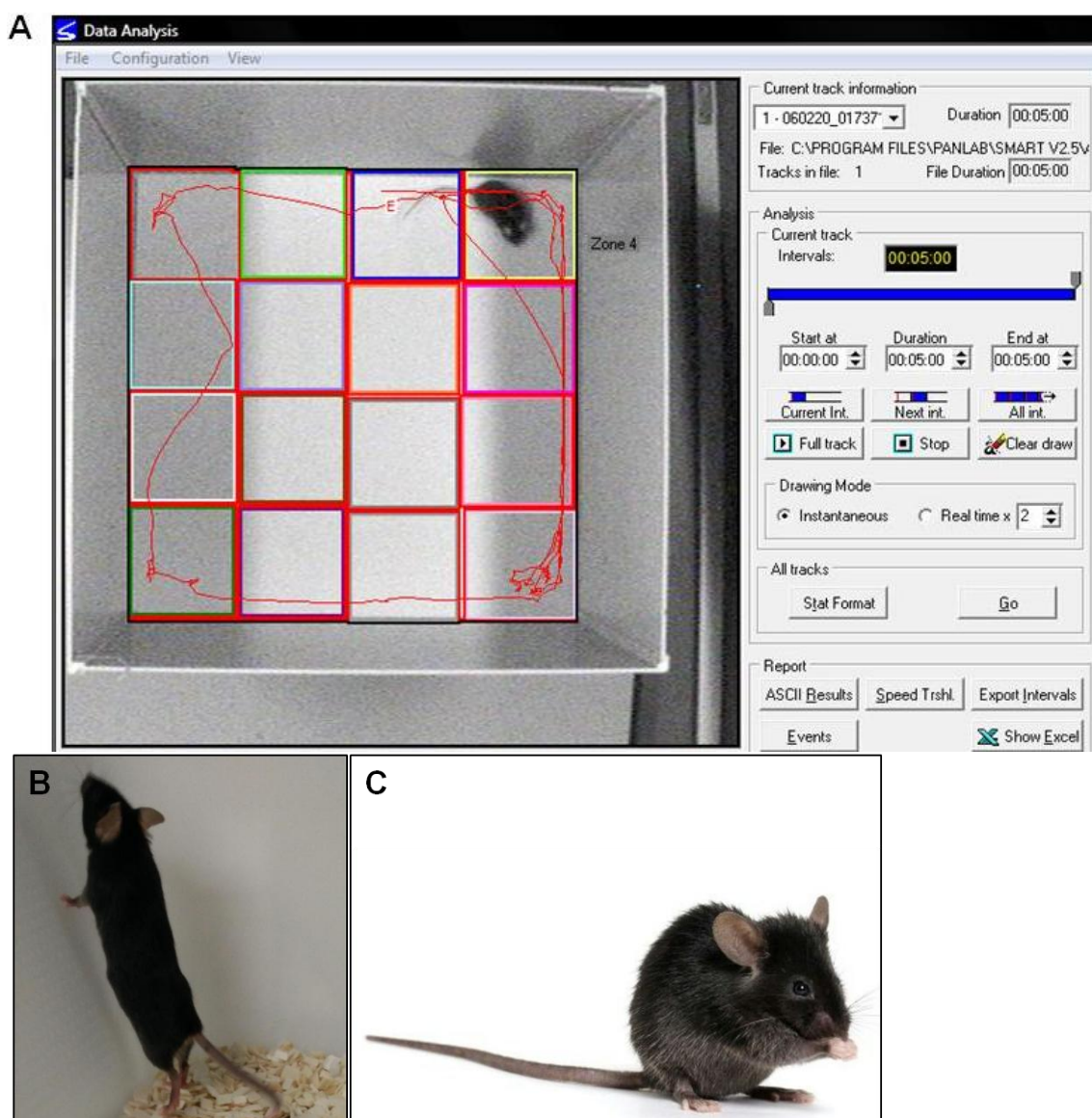


Figura MiM-2. Prova de l'*open-field* on es mostra un ratolí jove que acaba de realitzar el test i es pot veure el recorregut que ha realitzat durant els 5 minuts que dura el test (A); en les imatges B i C es poden veure uns ratolins fent un *rearing* i un *grooming*, respectivament.

1.1.3. Rotarod

Aquesta prova analitza la coordinació motora, l'equilibri i la fatiga dels ratolins. El test consisteix en un corró giratori, sobre el qual es disposen els animals, i un cronòmetre que enregistra el temps que són capaços de mantenir-s'hi caminant. L'aparell disposa de 5 carrils, separats entre ells per uns discs, en cadascun dels quals pot realitzar la prova un animal diferent; a la part inferior, hi ha unes plataformes que aturen el cronòmetre quan hi cau l'animal (Figura MiM-3 A).

L'aparell disposa a la part inferior d'un panell de control. Amb els diferents botons, es pot iniciar/aturar el corró (Figura MiM-3 A1), es pot seleccionar l'opció d'aplicar una velocitat amb o sense acceleració (Figura MiM-3 A2) i es pot triar la velocitat (entre 1 i 40 rpm [Figura MiM-3 A3]). En aquest estudi es va realitzar el test a velocitats constants, una primera vegada a 4 rpm i una segona vegada a 7 rpm (3 repeticions per a cada velocitat).

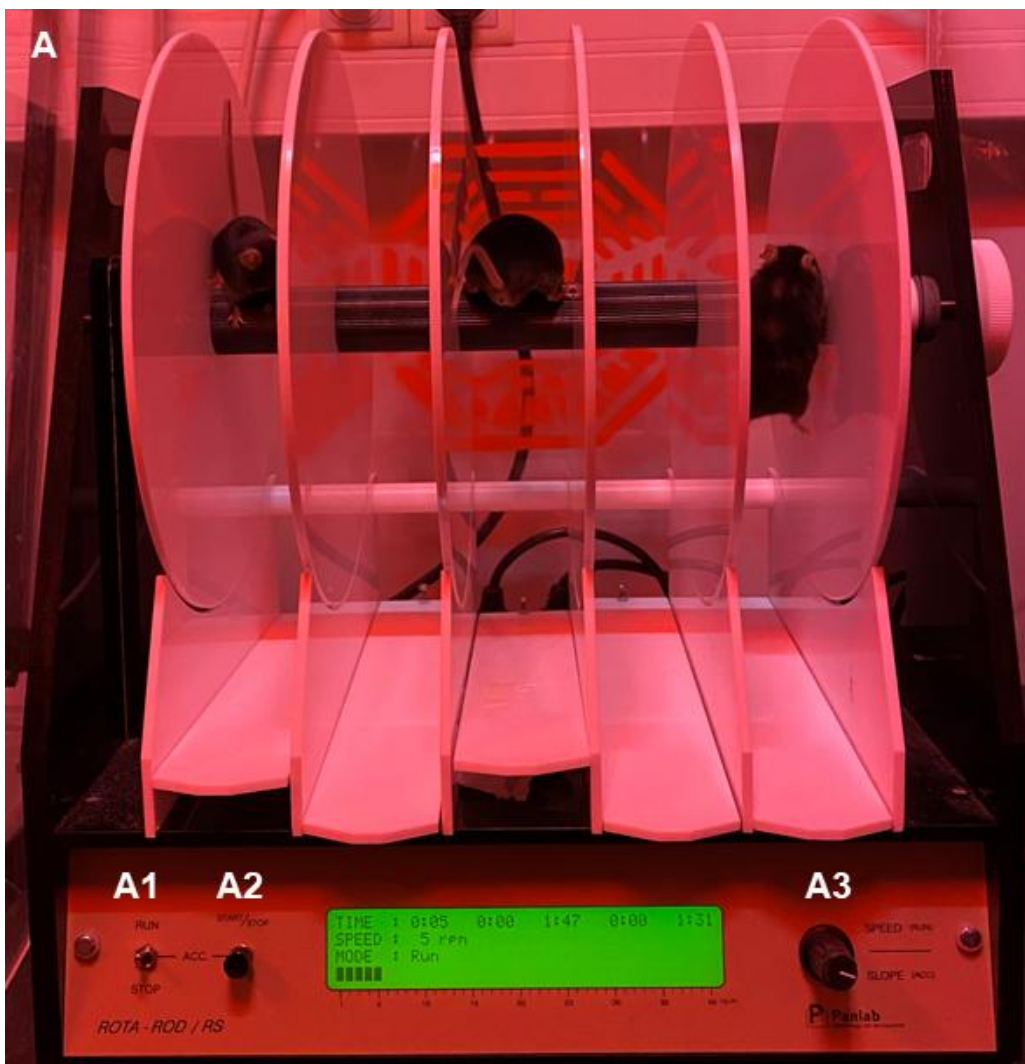


Figura MiM-3. Prova del rotarod on es mostren, d'esquerra a dreta, un ratolí jove, un d'adult i un de vell (a punt de caure) realitzant el test (A). Al panell de control, es mostren els botons per iniciar o aturar la prova (A1) i per seleccionar l'acceleració (A2) i la velocitat (A3).

1.1.4. *Pen test*

Amb aquesta prova, s'avalua la coordinació dels animals a través de la seva latència de caiguda des d'una corda tibant o des d'un element cilíndric d'un diàmetre suficientment petit com perquè l'animal només s'hi pugui aferrar amb les potes, sense poder-hi pujar a sobre; al nostre laboratori, es va utilitzar un penjador de 40 cm de llarg i de 2 mm de diàmetre. Els ratolins es van agafar per la cua i es van atansar al penjador; un cop hi estaven ben agafats, es deixava anar la cua de l'animal i es cronometrava el temps que era capaç de mantenir-s'hi agafat sense caure. Durant la realització d'aquest test, com amb el *grid stepping*, es posa un llençol estès laxament a la part inferior, a uns 50 cm del penjador, per tal d'amortir la caiguda dels ratolins (Figura MiM-4).

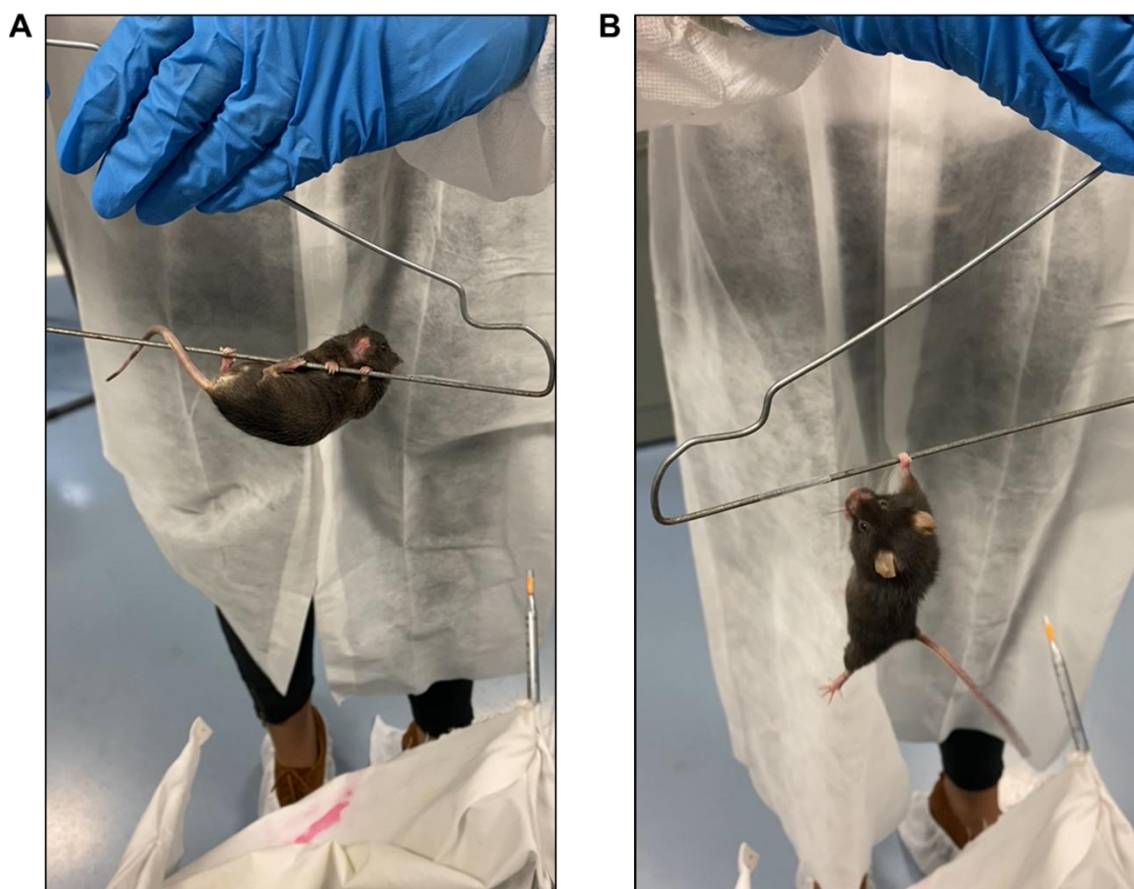


Figura MiM-4. Prova del *pen test* on es mostren un animal adult (A) i un de vell (B, a punt de caure), realitzant el test.

2. Tests electrofisiològics

L'estudi electrofisiològic es va realitzar al grup de neuroplasticitat i regeneració de l'Institut de Neurociències, al departament de biologia cel·lular, fisiologia i immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERNED.

Al capítol de la "Caracterització dels processos de maduració i envelliment a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj", es van realitzar els tests de conducció nerviosa a 10 ratolins adults i a 8 de vells, abans de ser sacrificats per a l'obtenció de les mostres; al de l'anàlisi de l'"Efecte de dietes suplementades amb cacau o amb te verd sobre els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment", es va realitzar a 7 animals del grup control, a 5 del grup del te verd i a 5 del grup del cacau, al finalitzar el període de dietes, també just abans de ser sacrificats per a l'obtenció de mostres.

Per a la realització del test de conducció motora, es va estimular el nervi ciàtic, de manera percutània, mitjançant polsos individuals d'una durada de 25 ms a través d'un parell d'elèctrodes d'agulla situats a nivell ciàtic. Es van enregistrar el CMAP i el reflex de Hoffmann, conegut com reflex H, als músculs TA i plantar interossi (PL) a través dels elèctrodes de microagulla (Navarro *et al.*, 2001; Udina *et al.*, 2003; Navarro and Udina, 2009). També es va calcular la ràtio H/M mitjançant el quocient de les amplituds màximes de les ones H i M enregistrades per a cada múscul per a l'avaluació de la funció del reflex espinal (Valero-Cabré and Navarro, 1993).

En canvi, per a la realització del test de conducció sensorial, els elèctrodes d'enregistrament es van situar a prop dels nervis digitals del quart dit del peu per tal d'enregistrar el potencial d'acció del nervi sensorial compost (en anglès, *compound sensory nerve action potential* [CNAP]) després de realitzar l'estimulació del nervi ciàtic.

També es va realitzar el test de la MUNE al TA, seguint el mateix procediment que per al test de conducció nerviosa motora; es va seguir un protocol basat en la tècnica incremental (Shefner *et al.*, 2002; Lago *et al.*, 2007; Mancuso *et al.*, 2011): començant amb una intensitat per sota del llindar, el nervi ciàtic va ser estimulat amb polsos individuals d'intensitat gradualment augmentada fins a

arribar a la primera resposta CMAP, el que va representar el reclutament de la primera unitat motora; amb els següents estímuls, es van enregistrar els increments quàntics en la resposta i es va considerar com al reclutament d'una unitat motora addicional aquells increments que eren superiors a 50 μ V. L'amplitud d'una sola unitat motora (en anglès, *single motor unit amplitude* [SMUA]) va ser calculada com la mitjana de més de 15 augments consecutius.

La MUNE es va calcular a través de l'equació:
$$MUNE = \frac{\text{amplitud màxima del CMAP}}{\text{amplitud mitjana de l'SMUA}}$$

Tots els potencials van ser amplificats i processats en un oscil·loscopi digital (Tektronix 450S, Tektronix, Beaverton, OR, USA) a la configuració adequada per tal de mesurar l'amplitud des de la línia base fins al pic negatiu màxim i la latència de l'estimulació fins al l'inici de la primera deflexió negativa, fins al pic negatiu màxim i fins al final de l'ona.

Per tal d'assegurar la reproductibilitat entre els diferents animals, les agulles d'enregistrament van ser inserides seguint les referències anatòmiques sota un microscopi per tal de ser ubicades al mateix lloc en tots els animals. Durant l'execució dels tests, els ratolins van ser mantinguts a una temperatura constant entre 34 i 36 °C a través d'un coixinet calefactat mitjançant un termòstat.

3. Tècniques de microscòpia òptica i de fluorescència

3.1. Obtenció i processament de les mostres

Arribat el moment del sacrifici dels animals i l'obtenció de les mostres, els ratolins van ser anestesiats amb una injecció intraperitoneal (10 μ l/g de pes corporal de l'animal) de solució salina (0,9 % NaCl) amb ketamina al 10 % i xilacina al 2 %. Per a la "Caracterització dels processos de maduració i envelliment a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj", es van utilitzar 4 ratolins joves, 5 d'adults i 5 de vells; per al de l'anàlisi de l'"Efecte de dietes suplementades amb cacau o amb te verd sobre els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment", es van utilitzar 3 animals del grup control, 4 del grup del cacau i 5 del grup del te verd.

Després de comprovar els paràmetres d'anestèsia i analgèsia i assegurar que els animals estaven totalment anestesiats (absència de moviments, de resposta a estímuls externs i de reflexes com ara al pessigar una pota o al tocar un ull

per comprovar els reflexes corneal i palpebral), es va procedir a fer una perfusió transcardíaca. Es van fixar els animals per les 4 extremitats, panxa amunt, per tal de realitzar una incisió sobre la línia mitjana, des de l'estèrnum fins al nivell dels intestins. Primer es va fer un tall per sota la pell i, després, per sota el peritoneu, de manera que les vísceres van quedar exposades; després de retirar-les, es va seccionar el diafragma i es va deixar el cor exposat. A continuació, es va procedir a fer la perfusió transcardíaca: es va fer un tall a l'aurícula dreta i, immediatament després, es va introduir una agulla de microperfusió (Butterfly-27, Venisystems) al ventricle esquerre en un angle de 45°. Primer s'hi va fer passar una solució salina al 0,9 % de NaCl per tal d'expulsar la sang, fent-la recórrer tot el sistema circulatori fins a fer-la sortir pel tall realitzat a l'aurícula dreta; després, quan el flux de sortida era transparent (indicatiu que ja no queda sang en el sistema circulatori), s'hi va fer passar una solució fixadora formada per un 4 % de paraformaldehid (PFA) en tampó fosfat (TF) al 0,1 M ajustat a un pH de 7,4 fins que l'animal va quedar totalment rígid (indicatiu que ha estat correctament fixat).

Degut a l'alta toxicitat del fixador, tot el procediment es va realitzar sota la campana d'extracció de gasos i amb mascareta, per tal d'evitar-ne la inhalació, i amb guants.

Després de la perfusió, els músculs sencers van ser ràpidament disseccionats; els músculs que es van extreure van ser: el TA, un múscul de contracció ràpida que ajuda en la dorsiflexió i en la inversió del peu; el soli, un múscul de contracció lenta als ratolins que juga un paper important en el manteniment de la postura dreta sobre les dues potes posteriors i que també intervé en la flexió plantar durant la marxa; l'EDL, un múscul de contracció ràpida implicat en la dorsiflexió del peu i l'extensió dels dits del peu durant la locomoció; i el gràcil, un múscul de contracció ràpida, més proximal, localitzat al costat medial de la cuixa i que està implicat principalment en l'adducció de les extremitats i també en la flexió del genoll (Hebel and Stromberg, 1977).

Un cop disseccionats, els músculs es van netejar, es va retirar l'excés de teixit connectiu, es van assecar i van ser pesats. A continuació, es van postfixar en PFA al 4 % en TF al 0,1 M ajustat a un pH de 7,4 durant 2 h; transcorregut

aquest temps, les mostres van ser crioprotegides amb sucrosa al 30 % en TF al 0,1 M amb un 0,02 % d'azida (per tal d'evitar la contaminació per fongs) durant un mínim de 72 h i, posteriorment, abans d'haver-los de tallar, van ser inclosos en un medi de congelació per a teixits (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA) i congelats unes 2 h a -80 °C.

A l'hora de fer les crioseccions, es va utilitzar el criòstat CM1900 de Leica Microsystems (Wetzlar, Alemanya); es van fer seccions transversals seriadades dels músculs de les potes dretes (per a l'estudi de les fibres musculars) i seccions longitudinals seriadades dels músculs de les potes esquerres (per a l'estudi de l'NMJ), de 16 µm de gruix. Les seccions de cada múscul van ser recollides de 3 en 3 al llarg de diferents portaobjectes esmerilats; cada grup de 3 talls es va anar recollint del primer a l'últim portaobjectes i així consecutivament fins a tenir tot el múscul tallat; d'aquesta manera, es va disposar de talls al llarg de tot el múscul en cadascun dels portaobjectes. Els talls transversals es van repartir en 20, 20, 15 i 25 portaobjectes i els talls longitudinals es van recollir en 15, 10, 15 i 20 portaobjectes en el cas dels músculs TA, soli, EDL i gràcil, respectivament. Després de deixar-les assecar durant 24 h, les mostres es van congelar a -80 °C fins al moment d'haver-les d'utilitzar.

3.2. Tinció amb hematoxilina-eosina (HE)

L'HE és una de les tècniques més emprades en histologia, àmpliament utilitzada per realitzar diferents diagnòstics. Amb la combinació de l'hematoxilina i l'eosina, la mostra adquireix uns tons blaus, vermells i violetes que permeten distingir les diferents parts del teixit; els nuclis, estructures àcides, es tenyeixen de blau amb l'hematoxilina, mentre que les estructures bàsiques es tenyeixen de vermell amb l'eosina.

En aquest estudi, aquesta tècnica va ser utilitzada per estudiar les fibres musculars en talls realitzats de manera transversal al criòstat; amb aquesta tinció, es va poder determinar el gruix total dels músculs, així com el percentatge de teixit connectiu i de miofibres o la seva densitat. Per fer aquestes mesures, es van utilitzar les seccions procedents de la part més gruixuda de cada múscul. Es van analitzar 200 miofibres per animal i múscul.

L'hematoxilina i l'eosina són colorants solubles en aigua. Per això, el primer que va caldre fer va ser rehidratar les mostres: es van fer rentats a concentracions decreixents d'EtOH (100, 96 i 60°) i es va fer un últim rentat amb aigua destil·lada (H₂Od). A continuació, es va procedir a fer la tinció: es van submergir les mostres en hematoxilina de Harris durant 25 s (GurrTM) i se'n va treure l'excés deixant les mostres sota aigua corrent de l'aixeta. Després, es van fer 10 immersions ràpides en una solució d'alcohol àcid (1 % d'àcid clorhídric en EtOH) per accentuar el contrast del colorant. Seguidament, les mostres van ser submergides en eosina durant 20 s i es va procedir a la deshidratació de les mostres mitjançant concentracions creixents d'EtOH (70, 2 x 96 i 100°) per tal d'anar eliminant l'aigua progressivament. Finalment, es van aclarir les mostres primer amb xilè, que és un agent de neteja, i després amb xilè-eucaliptol. Per acabar, les mostres es van cobrir amb un agent segellant per tal d'aïllar i protegir les mostres de possibles contaminacions i de la seva descomposició; al nostre laboratori, es va utilitzar el DPX (Panreac) i s'hi va posar un cobreobjectes a sobre procurant que no hi quedessin bombolles, que podrien malmetre els teixits (Figura MiM-5).

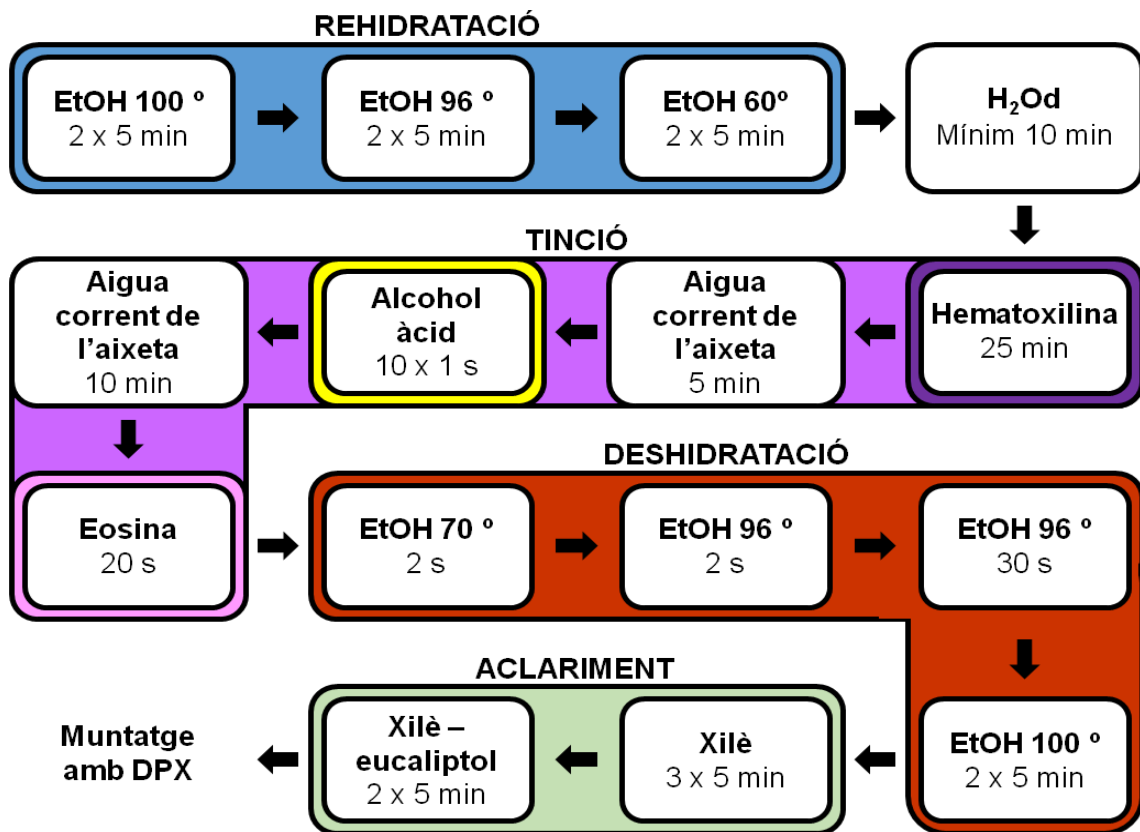


Figura MiM-5. Procés de tinció amb HE.

Per a la preparació de l'hematoxilina de Harris, es van dissoldre 2,5 g d'hematoxilina en 25 mL d'alcohol absolut aplicant-hi una mica de calor. Per una altra banda, es van dissoldre 50 g d'alum potàssic en 500 mL d'H₂O, escalfada lleugerament, en un vas de precipitats. A continuació, es van barrejar les dues solucions anteriors aplicant-hi calor de nou; un cop ben dissoltes, es va deixar refredar la solució resultant i s'hi van afegir, a poc a poc, 1,25 g d'òxid de mercuri i es va tornar a escalfar la barreja fins que va adquirir un color púrpura fosc; arribat aquest punt, es va retirar ràpidament de la calor i es va submergir el recipient en gel picat o en aigua freda. Finalment, es van afegir 15 mL d'àcid acètic per millorar la tinció dels medis cel·lulars i es va filtrar la solució abans d'emmagatzemar-la en una ampolla, reservada a temperatura ambient, fins al moment de la seva utilització (Taula MiM-1).

Reactiu	Quantitat
Cristalls d'hematoxilina	2,5 g
EtOH absolut	25 mL
Alum potàssic	50 g
Òxid de mercuri	1,25 g
Àcid acètic	15 mL
Aigua destil·lada	500 mL

Taula MiM-1. Reactius necessaris per a la preparació de l'hematoxilina de Harris.

3.3. Tincions immunocitoquímiques. Immunofluorescència

En aquest estudi, aquesta tècnica es va realitzar per estudiar tant les fibres musculars com les NMJs de músculs tallats al criòstat de manera transversal o longitudinal, respectivament.

Les mostres, que estaven emmagatzemades a -80 °C, es van deixar descongelar a temperatura ambient durant 10 min; transcorregut aquest temps, es van submergir en una cubeta amb una solució salina de TF (en anglès, *phosphate-buffered saline*, [PBS]) amb tritó X-100 al 0,1 % durant 30 min sobre un agitador orbital per tal de permeabilitzar-les. A continuació, es van bloquejar amb sèrum de cabra (en anglès, *normal goat serum*, [NGS]) al 10 % en PBS durant 1 h a temperatura ambient, es van incubar amb els anticossos primaris escollits, a les dilucions corresponents (Taula MiM-2), durant 16-24 h (*overnight* [ON]) en una cambra humida a 4 °C. Seguidament, es va treure l'excés

d'anticòs mitjançant 3 rentats de 10 min amb PBS a l'1X en agitació i es van incubar les mostres amb els anticossos secundaris corresponents a una dilució 1:500 durant 1 h a temperatura ambient en una cambra humida i fosca; els anticossos que es van utilitzar estaven conjugats amb un dels fluorocroms següents: Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), Cy3, o Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA). Seguidament, es van fer 3 rentats amb PBS a l'1X en agitació i protegint les mostres de la llum. Finalment, les mostres es van cobrir amb el medi de muntatge Mowiol-Dabco (Calbiochem, San Diego, EUA) i s'hi va posar un cobreobjectes a sobre, evitant la formació de bombolles entre el medi. Les mostres es van deixar assecar i es van guardar a 4 °C durant un mínim de 24 h fins al moment de la captura d'imatges.

Anticòs	Espècie	Dilució	Casa comercial
Agrina	Ratolí, monoclonal	1:100	Millipore (Temecula, CA) / MAB5204
ATP5A	Ratolí, monoclonal	1:100	Abcam (Cambridge, UK) / ab14748
CGRP	Conill, policlonal	1:1000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) / C8198
FGFBP1	Conill, policlonal	1:80	Bioss Antibodies (Boston, MA) / bs-1768R
GAP-43	Conill, policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) / sc-10786
Laminina	Conill, policlonal	1:1000	Abcam / ab30320
Laminina 2	Rata, monoclonal	1:100	Sigma-Aldrich / L0663
MyHCI	Ratolí, monoclonal	1:5	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) (Iowa City, IA, EUA) / A4-840
MyHCIIA	Ratolí, monoclonal	1:20	DSHB / SC-71
MyHCIIIB	Ratolí, monoclonal	1:20	DSHB / BF-F3
NF-68	Pollastre, policlonal	1:1000	Abcam / ab72997
Pax7	Ratolí, monoclonal	1:50	R&D Systems / MAB1675
PGC-1 α	Conill, policlonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-13067
SV2	Ratolí, monoclonal	1:1000	DSHB / SV2
TGF- β 1	Conill, policlonal	1:100	Abcam / ab92486
VACHT	Conill d'índies, policlonal	1:500	Synaptic Systems (Göttingen, Alemanya) / #139105

Taula MiM-2. Anticossos primaris utilitzats en les tincions imunocitoquímiques. ATP5A: cadena α de l'adenosina trifosfat (en anglès, *adenosin triphosphate* [ATP]) sintasa. CGRP: pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (en anglès, *calcitonin gene-related*

peptide). FGFBP1: proteïna d'unió al factor de creixement de fibroblasts (en anglès, *fibroblast growth factor binding protein*) 1. GAP-43: proteïna associada al creixement (en anglès, *growth-associated protein*)-43. MyHCl, IIA i IIB: isoformes de la cadena pesada de la miosina (en anglès, *myosin heavy chain*) I, IIA i IIB, respectivament. NF-68: neurofilament de 68 KDa. Pax7: de l'anglès, *paired box 7*. PGC-1 α : coactivador del receptor activat per proliferadors peroxisomals γ (en anglès, *peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator*) 1 α . SV2: proteïna de les vesícules sinàptiques (en anglès, *synaptic vesicle protein*) 2. TGF- β 1: factor de creixement transformant (en anglès, *transforming growth factor*) β 1. VAcHT: transportador vesicular de l'acetilcolina (en anglès, *vesicular acetylcholine transporter*).

Les seccions longitudinals dels músculs sempre es van incubar amb α -Bgtx conjugada a Alexa Fluor 555 (1:500; Molecular Probes), junt amb els anticossos secundaris, per tal d'identificar els AChRs; les seccions transversals sempre es van incubar amb diclorhidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol (en anglès, *4',6-diamidino-2-phenylindole* [DAPI], 50 ng / mL; Molecular Probes), junt amb els anticossos secundaris, per a la tinció del DNA.

Per tal d'assegurar les mateixes condicions en les diferents mostres a comparar, les mostres provinents de diferents animals i de diferents condicions experimentals van ser processades en paral·lel.

3.4. Anàlisi dels resultats. Obtenció i processament de les imatges

Un cop muntades, les mostres van ser examinades amb un microscopi d'epifluorescència Olympus BX51 (Olympus, Hamburg, Alemanya) equipat amb una càmera DP30BW o amb els microscopis confocals Olympus d'escaneig làser FluoView 500 o FluoView 1000.

Per tal d'assegurar les mateixes condicions en les diferents mostres a comparar; es van utilitzar els mateixos paràmetres a l'hora de capturar les imatges dels diferents grups experimentals.

Les imatges van ser analitzades amb el programa ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

3.4.1. NMJs; anàlisi en talls longitudinals dels músculs

La citoarquitectura de les NMJs va ser examinada a través de la captura de seccions òptiques en *Z-stack* (captura d'imatges de cada NMJ a diferent

profunditat amb una diferència d'1 μm de gruix) i de la seva projecció per a la reconstrucció de les plaques motores.

L'àrea i el perímetre de les NMJs van ser determinats mitjançant la delineació manual dels llocs postsinàptics, marcats amb α -Bgtx. Es va comptabilitzar el nombre de fragments positius per α -Bgtx que formaven cada placa motora i aquestes van ser considerades com a fragmentades quan el seu lloc postsinàptic presentava una aparença discontinua, amb més de 5 illes d'AChRs marcats amb α -Bgtx.

Per tal d'avaluar la maduresa de les plaques motores, aquestes van ser classificades, de més immadures a més madures, com a plaques, en plecs, amb perforacions o *pretzel-like* (secundària) (Figura MiM-6 A, B, C i D, respectivament), segons els criteris descrits prèviament a Cerveró *et al.*, 2016.

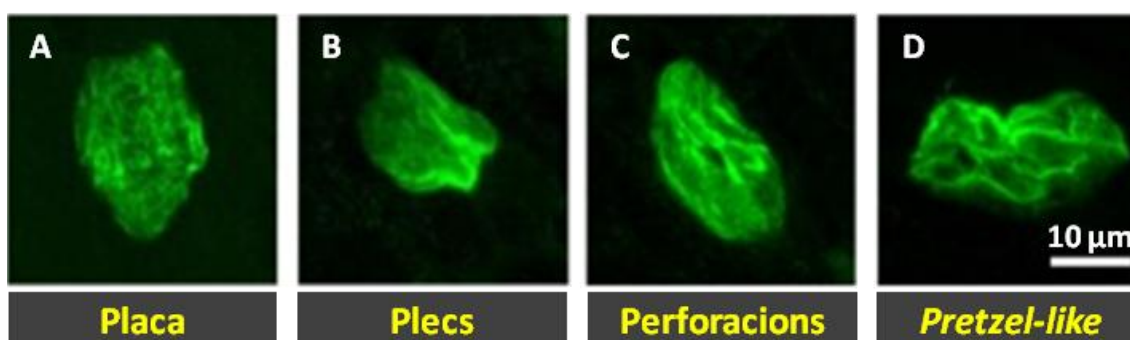


Figura MiM-6 Classificació de les NMJs segons el seu grau de maduresa. Imatges representatives d'unes plaques motores en placa (A), en plecs (B), amb perforacions (C) o *pretzel-like* (D); el regle de calibratge (D, 10 μm) és vàlid per a les imatges A-D. Imatge adaptada de Cerveró *et al.*, 2016.

A més, es va analitzar el grau de complexitat de les plaques motores. Per a aquesta anàlisi, es van utilitzar les mateixes imatges mencionades en l'apartat anterior. A través del programa ImageJ, les imatges digitals van ser transformades a una escala de grisos de 8 bits i, després, aquestes van ser sotmeses a un procés de binarització, essent ajustades sempre amb els mateixos paràmetres, per tal d'obtenir unes noves imatges en blanc i negre. A continuació, es va aplicar un filtre (*median*) a 2 píxels (2 vegades) per tal de suavitzar les imatges. A partir d'aquestes darreres imatges obtingudes, es va procedir a fer-ne l'esqueletització (AnalyzeSkeleton [2D/3D] d'[http:// imageJ.net/](http://imagej.net/)

AnalyzeSkeleton). Un cop obtingudes les imatges de les plaques motores en forma d'esquelet (una forma simplificada on només es mostren les seves ramificacions), se'n va fer l'anàlisi; el programa genera un informe on s'indiquen el nombre de branques, el nombre d'unions totals, triples i quàdruples (punts on s'entrecreuen 3 i 4 branques, respectivament), el nombre d'extrems i les longituds màxima i mitjana de cadascuna de les branques. L'anàlisi es va realitzar segons els criteris prèviament descrits a Young and Morrison, 2018.

Per analitzar el grau d'innervació de les plaques motores, es van realitzar immunotincions amb α -Bgtx (per localitzar les NMJs) junt amb una combinació de l'anticòs contra l'NF amb l'anticòs contra les proteïnes de les vesícules sinàptiques (en anglès, *synaptic vesicle protein* [SV]) 2. Les plaques motores van ser considerades com denervades quan el percentatge de l'àrea de les NMJs cobert per SV2 (marcador pre-sinàptic) era inferior al 15 % de l'àrea tenyida amb α -Bgtx. Per quantificar els percentatges de cobertura per a cada anticòs, les imatges van ser sotmeses a un procés de binarització mitjançant el programa ImageJ. Per tal de determinar si les plaques estaven monoinnervades o poliinnervades, es van comptar el nombre d'axons preterminals, marcats amb l'anticòs contra l'NF, que arribaven a cada terminal postsinàptic; d'aquesta manera, les plaques motores van ser considerades com monoinnervades quan hi arribava un sol axó, mentre que es van considerar com poliinnervades quan n'hi arribaven 2 o més.

L'*sprouting* terminal es va quantificar mitjançant el comptatge del nombre de processos axonals marcats amb anticòs anti-NF provinents d'un terminal nerviós que sobresortien de l'àrea postsinàptica delimitada amb α -Bgtx; el nombre d'*sprouts* comptabilitzat va ser expressat com el percentatge del nombre total d'NMJs examinades per a cada múscul.

Les acumulacions extra-sinàptiques d'AChR van ser quantificades mitjançant el comptatge del nombre de fragments marcats amb α -Bgtx (excloent la zona de la sinapsi). Es van analitzar una mitjana de 35 seccions de cada múscul, provinents d'entre 3 i 5 animals per a cada condició.

Les anàlisis de les immunotincions per al CGRP, la GAP-43, l'agrina, l'FGFBP1 i el TGF β 1 es van realitzar localitzant i delimitant l'àrea de les NMJs segons el

seu marcatge amb α -Bgtx i quantificant la intensitat dels píxels per a cada proteïna després d'haver eliminat el marcatge de fons.

Per a cadascuna d'aquestes mesures, es van examinar 100-200 NMJs per animal i múscul seleccionades de manera aleatòria provinents d'entre 3 i 5 seccions per a cada múscul, excloent de l'anàlisi qualsevol NMJ que fos difícil d'analitzar degut a la seva localització i/o orientació.

3.4.2. Fibres musculars; anàlisi en talls transversals dels músculs

La proporció de miofibres amb nuclis localitzats centralment es va comptabilitzar en imatges procedents de seccions tenyides amb DAPI (per a la visualització dels nuclis) i amb laminina (per a la localització de les fibres mitjançant les tincions de les làmines basals).

El nombre de nuclis positius per al marcatge amb DAPI mostrant també un marcatge positiu per a Pax-7, utilitzat com a un marcador d'SCs, també es va comptabilitzar en imatges capturades al microscopi confocal dels músculs.

Per tal d'analitzar la tipologia de fibres dels diferents músculs, es van utilitzar seccions immunotenyides amb diferents anticossos (per a les miofibres de tipus 1, 2A i 2B) contra l'MyHC I, IIA i IIB, respectivament, específics per a cadascuna de les isoformes, junt amb la laminina (per visualitzar el perímetre de les fibres). Les imatges van ser capturades amb una càmera digital (Olympus DP30BW); es va comptar el nombre de fibres de tipus 1 (de contracció lenta), de tipus 2A (de contracció ràpida, resistents a la fatiga) i de tipus 2B (de contracció ràpida, ràpidament fatigables) i es va expressar com al percentatge del nombre total de fibres.

El percentatge de miofibres amb agregats de lipofuscina, el nombre d'aquests agregats en cada fibra i la seva àrea, i l'àrea i la intensitat de la immunotinció amb ATP5A i PGC1 α , utilitzats com a marcadors mitocondrials, es van mesurar amb el programa ImageJ; aquests anticossos es van combinar amb la laminina per visualitzar el perímetre de les fibres.

Per a cadascuna d'aquestes mesures, es van examinar: 3000 miofibres per a la quantificació de nuclis centrals i d'SCs, 400-700 per a la tipologia de fibres i 100

per als marcadors mitocondrials per a cada animal i múscul, seleccionades de manera aleatòria, provinents d'entre 3 i 5 seccions de cada múscul.

4. *Western blot*

4.1. Obtenció i preparació de les mostres

Per als experiments de *western blot* es necessita material no fixat, així que les mostres van provenir de ratolins sacrificats per decapitació. Un cop sacrificats els animals, es va extreure el material el més ràpid possible (músculs TA, soli, EDL i gràcil), i cada múscul de cada animal va ser introduït ràpidament en un tub d'1,5 mL (*Eppendorf*, Hamburg, Alemanya) i submergit en nitrogen líquid, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; un cop congelats, van ser emmagatzemats a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de la seva utilització.

Els músculs congelats van ser fragmentats i homogeneïtzats utilitzant un homogeneïtzador amb tampó de lisi RIPA (Tris-HCl 50 mM ajustat a un pH de 7,4, NaCl 150 mM, àcid etilendiaminotetraacètic (en anglès, *ethylenediaminetetraacetic acid* [EDTA]) 1 mM, NP-40 a l'1 %, deoxicolat sòdic a l'1 % i dodecilsulfat sòdic (en anglès, *sodium dodecyl sulfate* [SDS]) al 0,1 % escalfat prèviament a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ i suplementat amb un inhibidor de proteases (Sigma-Aldrich, cat. # P8340) i PhosSTOP (Roche, Laval, Canadà). Es van disgregar les mostres i es van escalfar durant 5 min a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuació, es van centrifugar durant 20 min a 13000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es van recollir els sobrenedants en uns nous *Eppendorfs*.

4.2. Quantificació de la concentració de les proteïnes

Les concentracions proteiques dels sobrenedants es van determinar mitjançant l'assaig colorimètric de proteïnes de Bradford (Bradford, 1976) a través del kit de BIO-RAD Micro DC (BIO-RAD, Inc., Hercules, CA, EUA): es van incubar 25 μL del reactiu A junt amb 200 μL del reactiu B durant 15 min protegint-ho de la llum i, a continuació, es va mesurar l'absorció de les mostres amb l'espectrofotòmetre (Bio-Rad) a una longitud d'ona de 595 nm. La concentració de proteïna en cada mostra es va calcular a través de la seva normalització respecte una corba estàndard preparada amb albúmina de sèrum bovi (en anglès, *bovine serum albumin* [BSA]).

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

Primer, es van preparar els gels separadors (que han de quedar a la part inferior) amb tampó Tris 1,5 M ajustat a un pH de 8,9 i SDS al 10 %. Per a l'estudi de proteïnes d'un pes superior a 120 kDa, es van utilitzar uns gels a una concentració del 7,5 % de bis-acrilamida al 30 %; per a proteïnes d'entre 40 i 120 kDa, se'n van utilitzar al 10 % i, per a proteïnes de menys de 40 kDa, se'n van utilitzar al 12 %. Un cop abocat els gels, en motlles d'1,5 mm de gruix, s'hi van afegir uns 2 mL d'isopropanol per tal d'assegurar que solidificaven de manera anivellada; un cop els gels estaven polimeritzats, es va retirar l'isopropanol i s'hi van afegir els gels empiladors (que han de quedar a la part superior) a una concentració del 5 % de bis-acrilamida al 30 % preparats amb tampó Tris 0,5 M ajustat a un pH de 6,5 i SDS al 10 %. Un cop abocats els gels empiladors, s'hi van introduir ràpidament uns pintes, per fer els pouets de càrrega, i es van deixar solidificar.

Les mostres es van suplementar amb tampó de càrrega SS 4X (20 % de sucrosa i 0,05 % de blau bromofenol, suplementat amb mercaptoetanol β al 2 %) i es van escalfar a 100 °C durant 3 min per desnaturalitzar les proteïnes i facilitar-ne la càrrega.

Un cop polimeritzats els gels, es van retirar amb compte els pintes i es van carregar 4 μ L dels marcadors de pes molecular MagicMarc XP o SeeBlue (Thermo Fisher, Waltham, EUA) al primer pouet de cada gel per tal d'identificar les proteïnes d'estudi segons el seu pes molecular. Als següents pouets, es van carregar 15-50 μ g de proteïna per pouet. Es van introduir els gels en una cambra d'electroforesi (Bio-Rad Laboratories Inc.) submergits en tampó (*running buffer* [Bio-Rad Laboratories Inc.]) i es van fer córrer a una intensitat de 20 mA fins al punt en què les mostres van arribar gairebé a l'extrem inferior dels gels separadors.

4.4. Transferència de les proteïnes a la membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF) per electrotransferència

A continuació, es van submergir unes membranes de fluorur de polivinilidè (en anglès, *polyvinylidene fluoride* [PVDF]) (ImmobilonTM-P, Millipore) en metanol (MetOH) durant 1 min i es van rentar amb tampó de transferència (25 mM Tris,

190 mM glicina, 20 % MetOH i 0,1 % SDS). Es van transferir les proteïnes a les membranes mitjançant una electrotransferència semiseca: per a cada membrana, es van submergir quatre papers secants en tampó de transferència (tris-glicina-MetOH) i se'n van apilar dos junt amb la membrana, seguida pel gel de poliacrilamida i els altres dos papers secants; es van eliminar les bombolles que poguessin quedar entremig de les diferents capes del bloc i aquest va ser transferit a un aparell Novex Semi-Dry Blotter (Invitrogen) orientat de manera que la membrana quedés al costat de l'elèctrode negatiu i el gel, al positiu. Es va fer la transferència a un amperatge constant de 0,06 mA per gel (es poden transferir dos gels alhora) durant 1 h.

4.5. Detecció immunocitoquímica

Un cop finalitzada la transferència, les membranes van ser bloquejades amb una solució de bloqueig que contenia un 5 % de llet desnatada en pols diluïda en *Tween 20* al 0,1 %, tamponada amb Tris-HCl 20 mM i ajustada a un pH de 8 (en anglès, *tris-buffered saline and Tween 20* [TBST]) durant 1 h a temperatura ambient, per tal d'evitar senyals inespecífics.

A continuació, es van rentar les membranes amb TBST i es van incubar ON a 4 °C amb els anticossos primaris d'interès (Taula MiM-3) en tampó d'incubació (0,25 % de llet desnatada en pols diluïda en TBST); l'anti-gliceraldehid 3-fosfatasa deshidrogenasa (en anglès, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* [GAPDH]) i l'anti-tubulina α van ser utilitzats com a controls de càrrega). Després de la incubació, es van fer dos rentats de 15 i 5 min amb TBST, per eliminar l'excés d'anticòs primari, i un darrer rentat de 10 min amb tampó d'incubació.

Tot seguit, les membranes es van incubar amb els anticossos secundaris corresponents conjugats a la peroxidasa (1:10,000; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Regne Unit), diluïts en tampó d'incubació, durant 1 h a temperatura ambient. Després de la incubació, es van fer cinc rentats amb TBST (un de 15 min, un de 10 min i tres de 5 min).

A partir de la transferència, tots els passos es van fer en agitació.

Anticòs	Espècie	Dilució	Casa comercial
GAP-43	Conill, policlonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) / sc-10786
GAPDH	Ratolí, monoclonal	1:10000	Abcam, cat. # ab8245
PGC-1 α	Conill, policlonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-13067
Tubulina α	Ratolí, monoclonal	1:1000	Sigma-Aldrich; cat. # T5168)

Taula MiM-3. Anticossos primaris utilitzats per als *western blots*.

4.6. Anàlisi dels resultats

Les membranes van ser revelades per quimioluminiscència amb el kit de detecció *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit) seguint les instruccions del fabricant: es van barrejar els reactius *Peroxide Solution* i *Luminol/Enhancer Solution* a parts iguals i es van cobrir les membranes durant 5 min amb la barreja resultant. Transcorregut aquest temps, es va eliminar l'excés de reactiu luminescent i es van cobrir les membranes amb paper de transparència per retroprojecció; es van revelar al ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Inc.) i les imatges van ser analitzades per densitometria amb el programa ImageLab (Bio-Rad Laboratories Inc.) per tal d'analitzar la quantitat relativa de proteïna i quantificar-ne el resultat per densitat òptica.

Per a cada proteïna analitzada, es van utilitzar mostres provinents de 3 animals per condició, de 2 *western blots* independents.

5. Talls semifins i microscòpia òptica

5.1. Obtenció i processament de les mostres

Per a l'obtenció de les mostres per al seu estudi ultraestructural, els animals van ser anestesiats i perfosos tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.1, però en aquest cas el fixador que es va utilitzar va ser el PFA a l'1 % amb glutaraldehyd a l'1 % en TF 0,1 M ajustat a un pH de 7,4.

Es van extreure els nervis ciàtics i es van postfixar submergint-los en la mateixa solució de perfusió durant 24 h. Transcorregut aquest temps, es van deshidratar submergint-les durant 2 h en tetròxid d'osmi a l'1 % (EM Sciences,

Fort Washington), que s'uneix preferentment als lípids de membrana, proporcionant així un contrast de la mostra.

Després, es van incloure en resina epoxi Embed 812 (EM Sciences) seguint les instruccions del fabricant: es van fer 3 rentats de 10 min amb TF 0,1 M i es van submergir les mostres en osmi a l'1 % durant 1 h, es van fer 2 rentats de 2 min amb acetat de sodi 0,1 M i es van submergir en acetat d'uranil aquós al 0,5 % durant 30 min, es van fer 2 rentats més de 2 min amb acetat de sodi 0,1 M i es van submergir en acetonitril al 30 % durant 30 min, en acetonitril al 70 % ON i en acetonitril al 100 % 3 vegades durant 30 min (tots aquests passos es van fer sota la campana i mantenint totes les solucions a 4 °C submergides en gel); a continuació, es van submergir les mostres en resina 1:1 (50 % de resina + 50 % d'acetonitril) durant 1,5 h, en resina 3:1 (75 % de resina + 25 % d'acetonitril) ON i en resina total 2 vegades durant 1,5 h (tots aquests passos es van fer sota la campana, en agitació i a temperatura ambient). Finalment, es van fer els blocs: es va posar resina total als motlles, s'hi van introduir els nervis i es van deixar polimeritzar a l'estufa a 60 °C durant un mínim de 48 h.

La preparació de la resina es va fer sota la campana i utilitzant doble guant (Taula MiM-4).

Reactiu	Volum
Embed 812	20 mL
Anhidrid dodecenil succínic (<i>Dodecenyl Succinic Anhydride</i> [DDSA])	16 mL
Anhidrid metil nàdic (<i>Nadic Methyl Anhydride</i> [NMA])	8 mL
2, 4, 6-Tris-(dimetilaminometil)fenol 2, 4, 6-Tris-(<i>dimethylaminomethyl</i>)phenol [DMP-30])	800 mL

Taula MiM-4. Reactius necessaris per a la preparació de la resina epoxi Embed 812.

5.2. Obtenció de les seccions i tincions

Un cop incloses les mostres en blocs, se'n van obtenir seccions semifines d'1 µm amb l'ultramicrotòtom (Reichert Ultracuts, Leica); els talls de cada nervi ciàtic es van distribuir en tres portaobjectes recollint unes 10 seccions consecutives en un mateix portaobjectes i rebutjant les 20 seccions següents abans de

recollir les 10 següents. Després de recollir cada grup de 10 seccions, els portaobjectes es van posar a sobre d'una planxa tèrmica a 140 °C per assecar les mostres, es van cobrir amb blau de metilè (Merck, Darmstadt, Alemanya) per tenyir-les i es van tornar a posar uns segons a sobre la placa per tal de facilitar-ne la penetració als teixits. Finalment, es van rentar els portaobjectes amb aigua abundant (pel costat oposat al de les mostres, per evitar que es desenganxessin) i es van tornar a deixar a sobre la placa per assecar-les.

5.3. Anàlisi dels resultats: obtenció i processament de les imatges

Les mostres van ser examinades amb un microscopi òptic Olympus BX50 (Olympus, Hamburg, Alemanya) equipat amb una càmera DXM1200. Les imatges, capturades amb l'objectiu de 100X, van ser analitzades amb el programa ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Es va quantificar el percentatge d'axons amb signes de degeneració (amb estructures electrodenses al seu interior, la beina de mielina fragmentada, engruiximents o plecs, inclusions de mielina a l'interior de l'axó o una beina de mielina en doble capa).

Es va determinar el diàmetre dels axons a través de la delineació del perfil extern de la beina de mielina.

Es va calcular la *G*-ratio dividint el diàmetre resultant de la part interna de l'axó entre el diàmetre de la part externa. D'aquesta manera, el resultat dona un valor comprès entre 0 i 1, on els valors més grans són indicadors d'uns axons envoltats per beines de mielina més fines i, al contrari, els valors més propers a 0 es troben en les *G*-ratios dels axons amb beines de mielina més gruixudes.

El càlcul es va realitzar de manera semiautomàtica amb el complement *G*-ratio del programa ImageJ amb les mesures de 100 axons per a cada animal seleccionats de manera aleatòria. Es van utilitzar nervis ciàtics provinents de 4-6 animals per a cada condició.

6. Anàlisi estadística

L'estudi estadístic i la representació de les gràfiques es va fer amb el programa *GraphPad Prism 6*. Els resultats es van mostrar com la mitjana \pm l'error estàndard (en anglès, *standard error of the mean* [SEM]). L'anàlisi estadística

es va realitzar amb el *t*-test d'Student, quan s'havien de comparar només dues condicions, o amb els tests *one-way* o *two-way* d'anàlisi de la variància (*analysis of variance* [ANOVA]), quan s'havien de comparar 3 o més condicions sense subcategories o amb dues subcategories o més, respectivament, seguits de la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni; per a la comparació de corbes de supervivència entre grups, es va utilitzar el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon. El nivell de significança es va fixar en $p < 0,05$, de manera que als gràfics es van representar amb un asterisc les significances inferiors a aquest valor, amb dos asteriscs quan aquestes eren inferiors a 0,01, amb tres asteriscs quan eren inferiors a 0,001 i amb quatre asteriscs quan eren inferiors a 0,0001.

RESULTATS. CAPÍTOL I

CARACTERITZACIÓ DELS PROCESSOS DE MADURACIÓ I ENVELLIMENT A NIVELL NERVIÓS I MUSCULAR EN EL RATOLÍ C57BL/6JRj

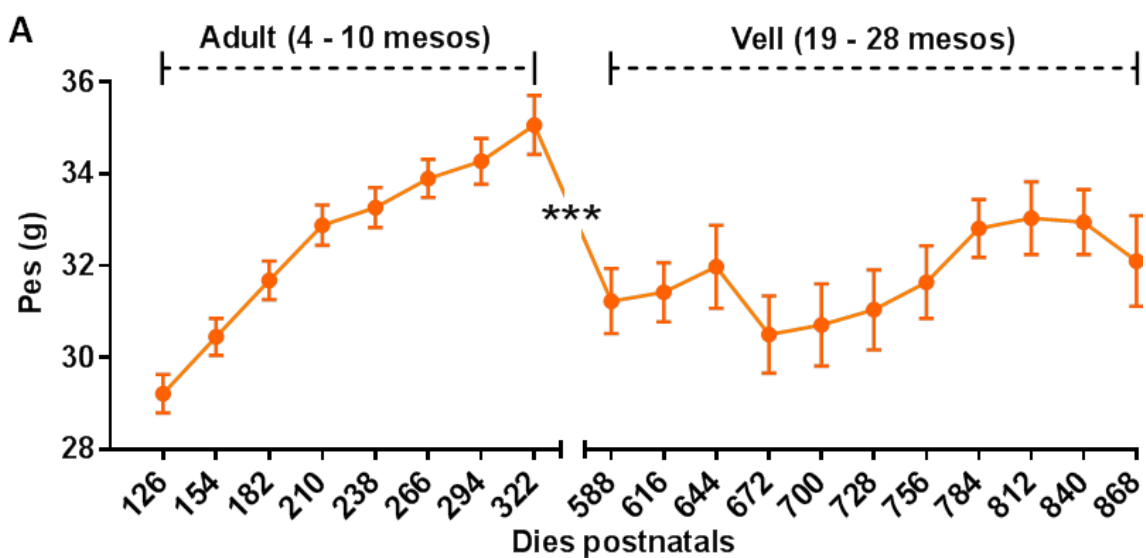
1. Canvis en el pes corporal i reducció de les habilitats motores durant l'envelliment

1.1. Pes corporal

Es va fer un seguiment mensual del pes dels ratolins a partir del dia postnatal (P) 126. Des d'aquest punt fins a P322, els animals van anar guanyant pes progressivament. En canvi, a partir d'aquesta edat, s'observa una disminució considerable del pes fins a P588, que es manté sense canvis significatius fins al punt final (P868) (Figura R-I-1 A i B-D).

1.2. Supervivència

Pel que fa a la supervivència, com era d'esperar, cap dels ratolins joves va morir des del punt inicial (P123) fins al punt final (P280); curiosament, dels 15 animals adults, 9 van morir entre els 581 i els 738 dies d'edat; en canvi, dels 9 ratolins vells, només en van morir 2 entre els 765 i els 885 dies d'edat (Figura R-I-1 E). No es van veure signes al fenotip dels ratolins que poguessin explicar l'alta mortalitat observada entre els animals adults (Figura R-I-1 B-D), però es va decidir fer un seguiment del consum setmanal del pinso en els experiments posteriors per descartar possibles mancances alimentàries.



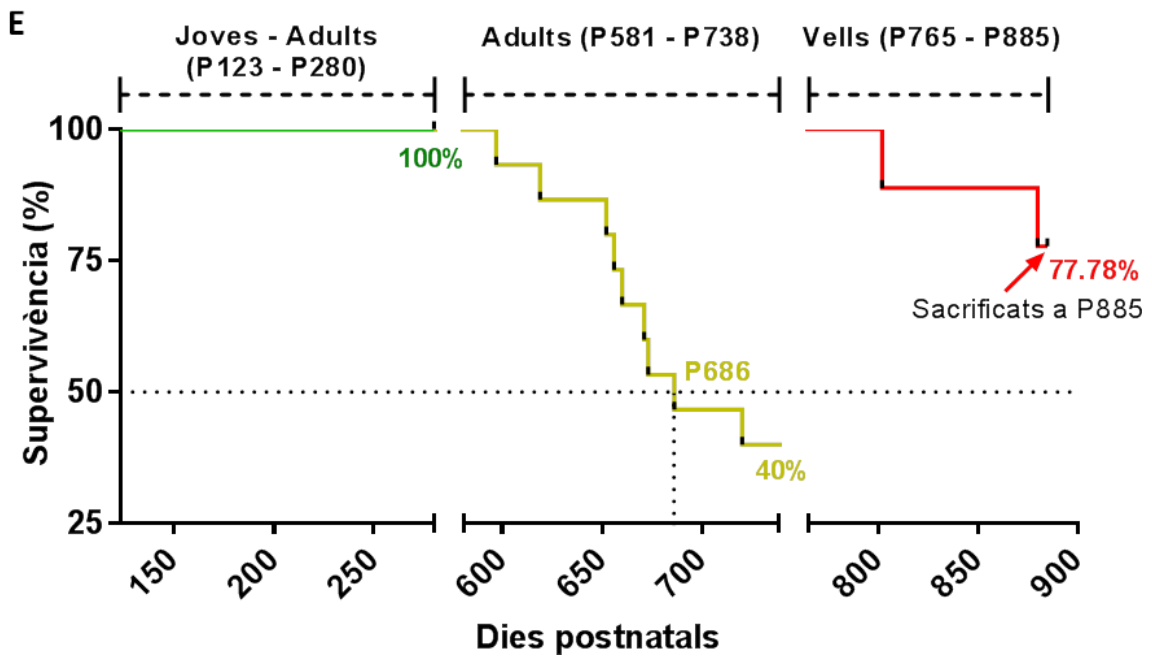
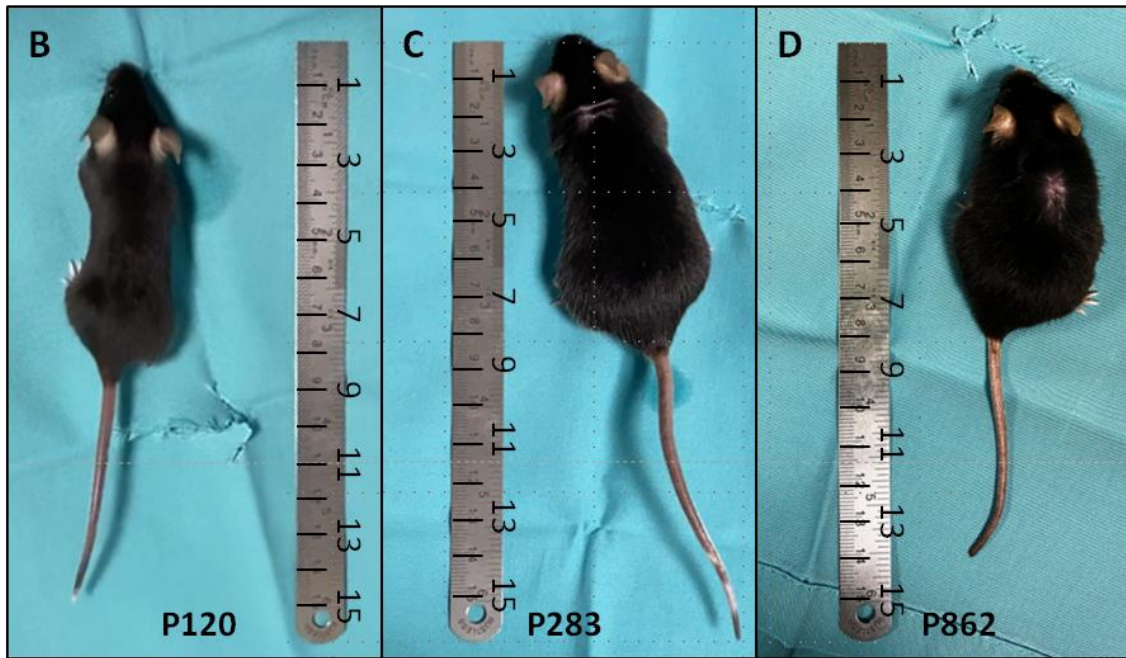


Figura R-I-1. A) Pes corporal (en g) dels animals des de P126 a P868; els punts representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $***p < 0,001$; $n = 15$ al punt inicial. Imatges representatives d'un animal jove (P120 [B]), d'un adult (P283 [C]) i d'un vell (P862 [D]). E) Supervivència dels ratolins joves (a partir de P123, en verd), adults (a partir de P581, en groc) i vells (a partir de P765, en vermell) durant 5 mesos; $n = 15$ animals joves, 15 adults i 9 vells al punt inicial.

1.3. Proves motores

Per tal d'avaluar la progressió de la debilitat muscular dels ratolins vells, es van realitzar 3 proves motores cada 4 setmanes durant 4 mesos: el *grid stepping*, l'*open-field* i el *rotarod*. Els diferents tests es van iniciar a P760 i van finalitzar a P872.

Amb el *grid stepping*, es va comprovar quant de temps els animals eren capaços de mantenir-se agafats a la part inferior d'una reixa horitzontal; la prova es va repetir 3 vegades amb un descans de 15 min entre repeticions i es va anotar el millor temps dels 3 intents amb un màxim d'1 min. En aquest cas, no es van observar diferències estadísticament significatives; només es va veure una lleugera disminució en el temps a la quarta i vuitena setmanes i, tal com es veu amb la gran desviació entre els valors, era degut a un únic animal que només realitzava el test durant 41 segons (Figura R-I-2).

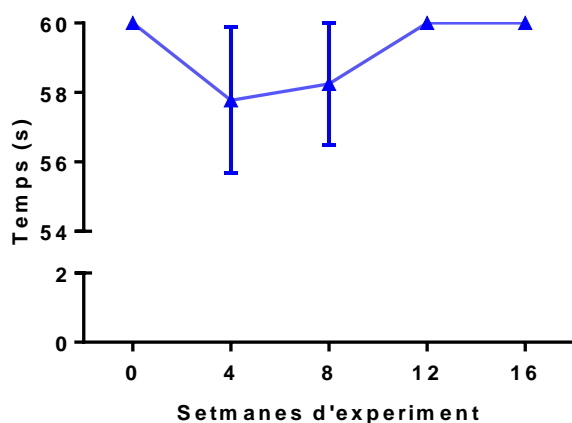
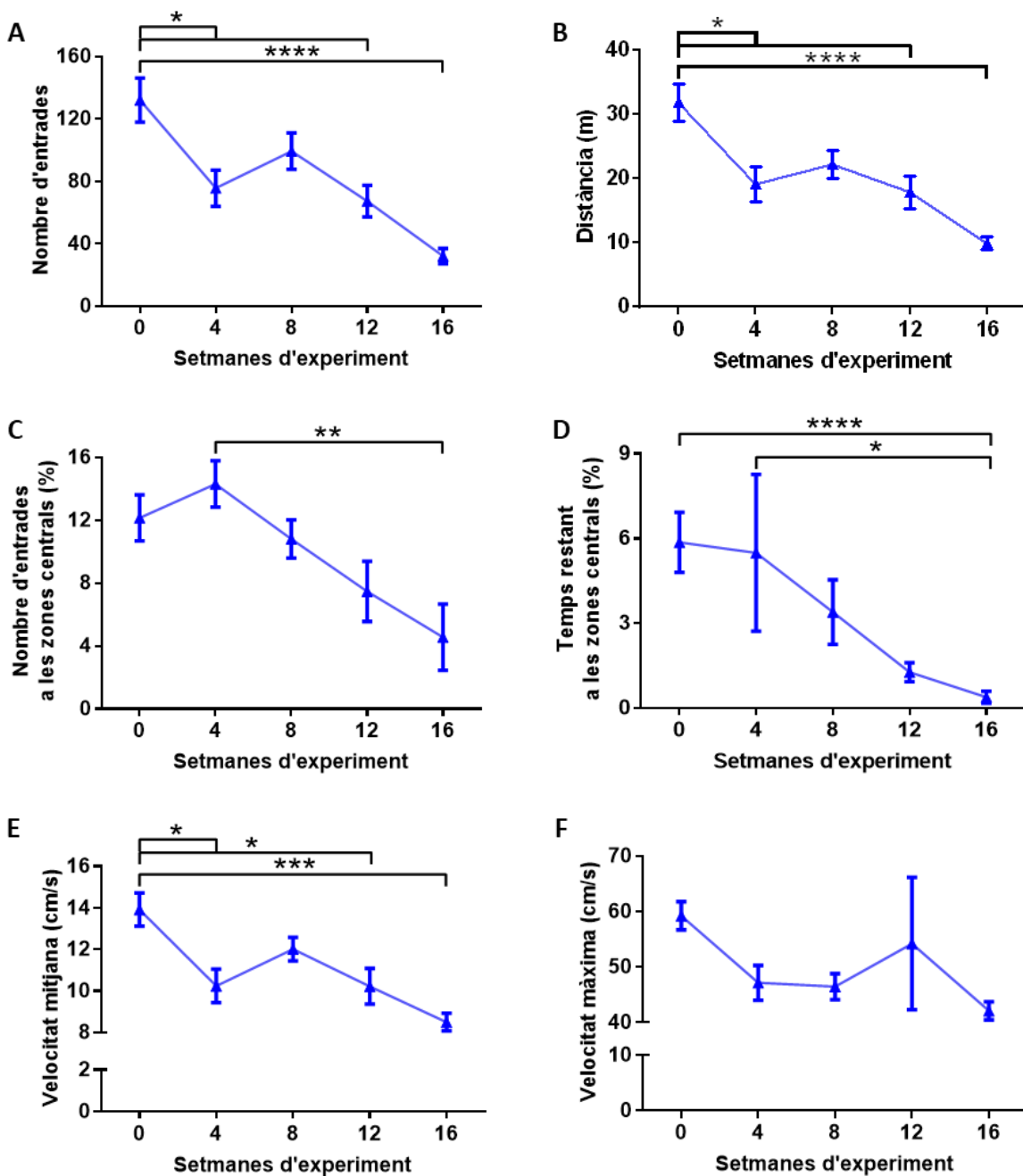
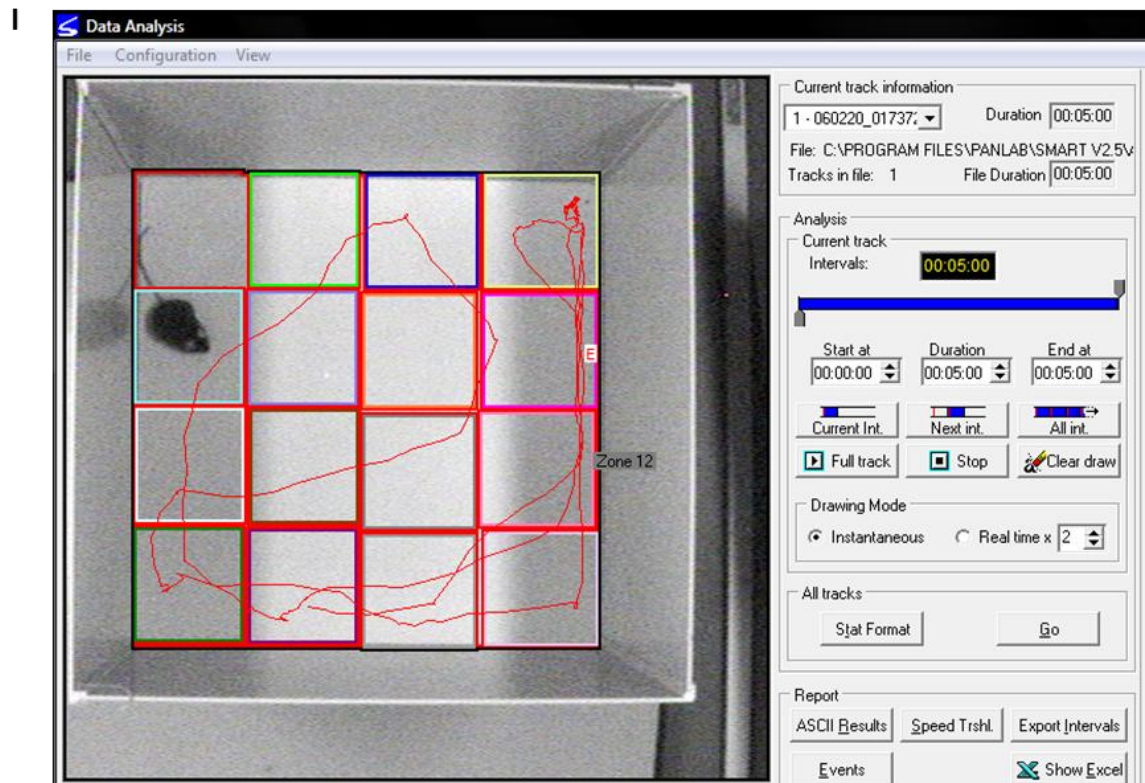
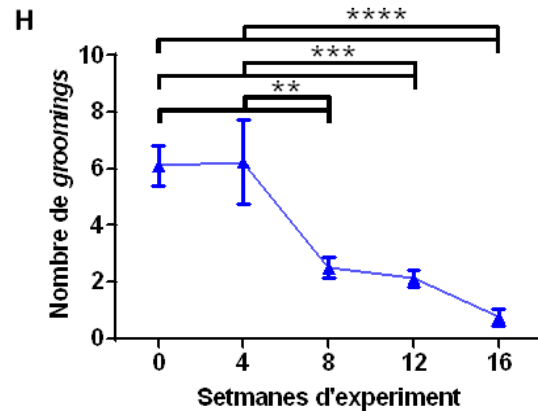
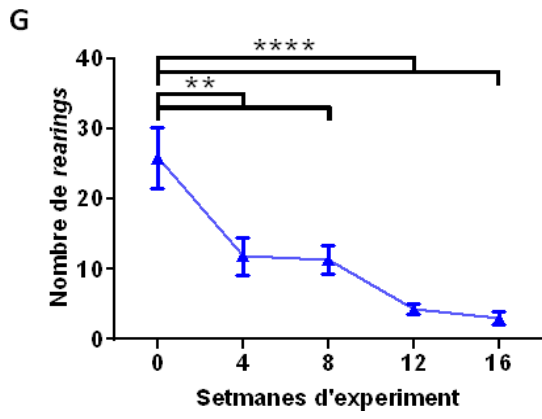


Figura R-I-2. Test del *grid stepping* en animals vells. Els punts representen les mitjanes dels temps (en s) \pm SEM del millor de tres intents; l'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el test *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni; $n = 15$ animals al punt inicial.

Pel que fa a l'*open-field*, es van mesurar la distància, la velocitat i el nombre d'entrades que els ratolins feien en les diferents àrees en què estava dividida una caixa de base quadrada, entre altres paràmetres; la prova es va realitzar durant 5 min. A més, es van comptabilitzar el nombre de *rearings* (quan l'animal es plantava sobre les dues potes posteriors) i de *groomings* (quan l'animal es fregava el morro amb les potes).

Amb aquest test, es va observar que els animals vells mostraven un empitjorament de la realització de la prova en els diferents paràmetres analitzats amb el pas del temps (Figura R-I-3): nombre d'entrades a les diferents zones (Figura R-I-3 A), distància recorreguda (Figura R-I-3 B), percentatge del nombre d'entrades (Figura R-I-3 C) i del temps (Figura R-I-3 D) a les zones centrals, velocitat mitjana (Figura R-I-3 E) i màxima (Figura R-I-3 F), nombre de *rearings* (Figura R-I-3 G) i nombre de *groomings* (Figura R-I-3 H). A la Figura R-I-3 I i J es poden observar les diferències entre la realització de la prova per part d'un animal adult i d'un vell, respectivament.





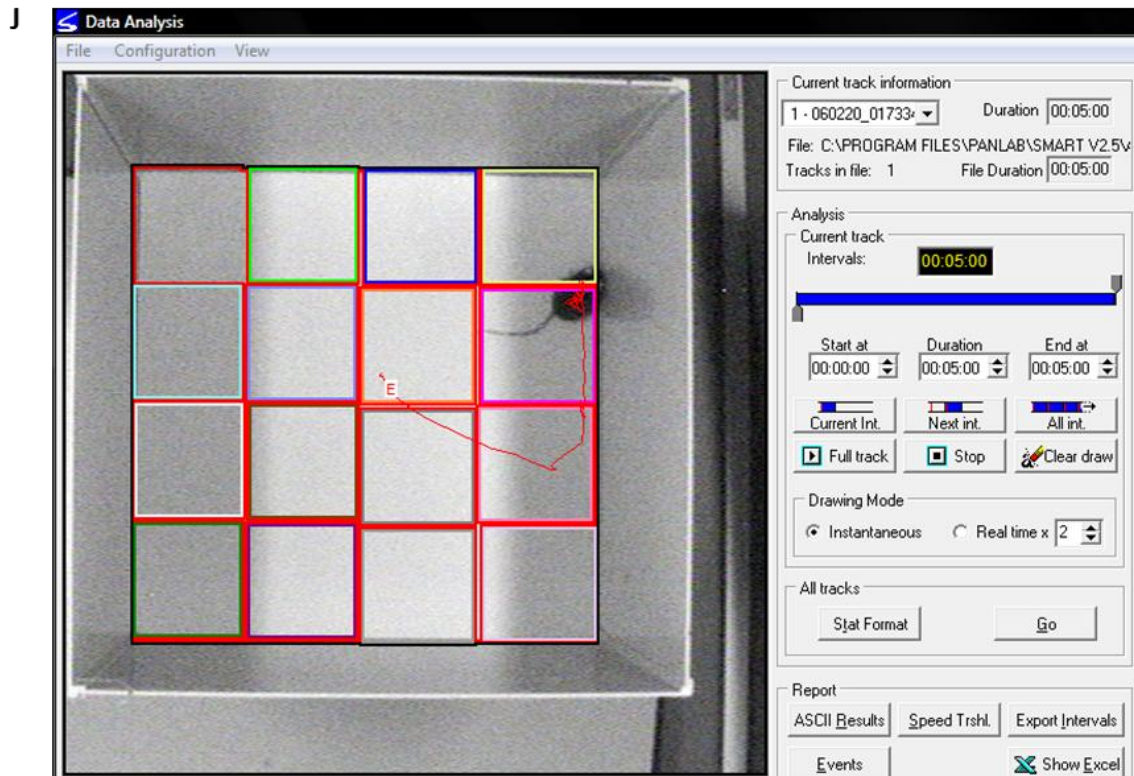


Figura R-I-3. Test de l'*open-field* en animals vells. Es van mesurar el nombre d'entrades (A), la distància (B, en cm), el percentatge del nombre d'entrades (C) i del temps (D) a les zones centrals, les velocitats mitjana (E, en cm/s) i màxima (F, en cm/s) i el nombre de *rearings* (G) i de *groomings* (H). Els punts representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 15$ animals al punt inicial. Imatges representatives capturades a través de la càmera vinculada al programa Smart Video Tracking (v2.5.21, Panlab Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) que mostren el recorregut que han realitzat un animal adult (I) i un de vell (J) al final dels 5 minuts que dura el test.

Finalment, amb el *rotarod*, es va comprovar quant de temps els animals eren capaços de mantenir-se caminant sobre un corró giratori a 4 rpm i a 7 rpm; el test es va repetir 3 vegades per a cada velocitat amb un descans de 15 min entre repeticions i es va anotar el millor temps dels 3 intents amb un màxim de 3 min. En aquesta ocasió, només es va observar una disminució del temps a la vuitena setmana tant quan es realitzava el test a 4 rpm (Figura R-I-4 A), com quan es realitzava a 7 rpm (Figura R-I-4 B).

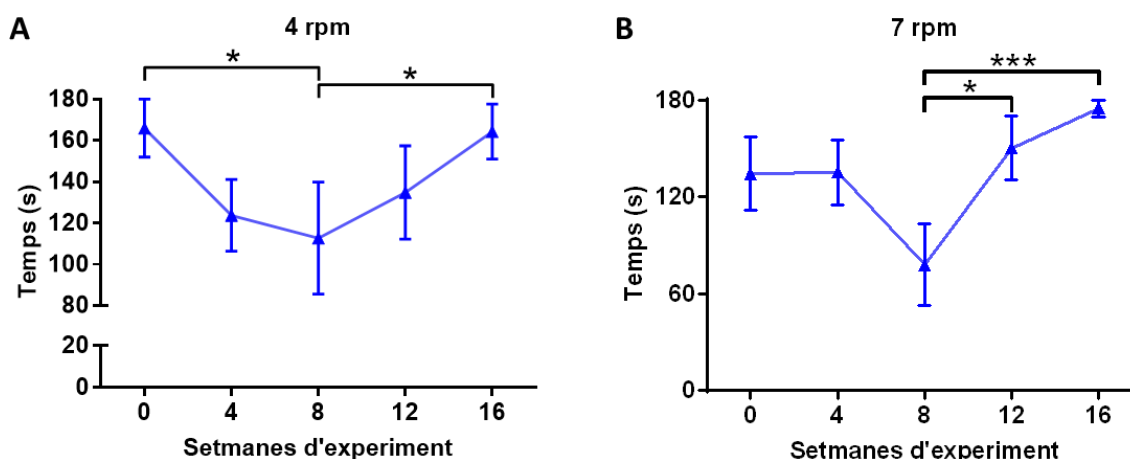


Figura R-I-4. Test del rotarod a 4 (A) i 7 (B) rpm en animals vells. Els punts representen les mitjanes \pm SEM del millor de tres intents; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $***p < 0,001$; $n = 15$ animals al punt inicial.

Cal remarcar que els resultats dels tests *grid stepping* i *rotarod* són difícils d'interpretar, ja que alguns animals no mostraven predisposició a fer-los. D'altres, tal i com s'ha vist amb els tests repetitius (Brooks and Dunnett, 2009), s'acostumaven a fer-la i, veient que no es feien mal al caure, es deixaven anar abans d'arribar realment a un punt de cansament. En conjunt, això fa que hi hagi grans desviacions en les mitjanes i que els resultats puguin venir donats per altres factors no relacionats amb l'envelliment. Això fa pensar que aquestes diferències estan més relacionades amb el fet que els animals s'acostumaven a fer el test que no pas a un empitjorament de les habilitats motores. Per tant, considerem que, en el nostre model, els tests *grid stepping* i *rotarod* no són adients per avaluar els canvis en les habilitats motores relacionats amb l'envelliment. Per això, en el següent capítol dels resultats, no es van realitzar aquestes dues proves i es va introduir el *pen test* junt amb l'*open-field*.

2. Canvis electrofisiològics amb l'envelliment

Es va realitzar un test de conducció nerviosa per avaluar els canvis electrofisiològics que es produeixen amb l'envelliment. Les proves es van realitzar en animals de 6 mesos (adults) i de dos anys (vells) d'edat. Respecte als adults, els animals vells mostraven un augment en el temps de latència tant als nervis motors (TA Lat) com als sensors (PL Lat), el que indica una reducció de la velocitat de conducció. A més, es va observar una disminució de l'amplitud del CMAP, el que ve donada per una disminució tant en el nombre (la

MUNE) com en la mida (l'SMUA) de les unitats motores; aquests canvis són més pronunciats al múscul distal PL que al TA, que és més proximal. D'altra banda, el CNAP -que és la resposta del múscul, també coneguda com ona M- del quart nervi digital (NDg), enregistrat als dits dels peus, no va mostrar una reducció significativa en els animals vells respecte als adults; això indica que el procés degeneratiu podria venir donat, entre altres factors, a una pèrdua muscular i a les forces de compressió als peus que només es donen amb l'envelliment. Quant a l'ona H (reflex de Hoffmann o, simplement, reflex H), l'equivalent al reflex a nivell espinal, es va observar que la latència de l'ona H al múscul PL era major als animals vells que als adults, tot i que l'amplitud mitjana era similar en ambdós grups. La ràtio H/M (relació entre el reflex H i l'ona M) del PL, que reflexa el nivell d'excitabilitat de les sinapsis aferents a les MNs, era significativament superior als animals vells que als adults, degut a un mecanisme compensatori per tal de mantenir una resposta de reflex muscular adient (Taula R-I-1).

Paràmetre	Adults	Vells
Latència del TA (ms)	1,48 ± 0,06	1,54 ± 0,08
Latència del PL (ms)	1,89 ± 0,08	2,38 ± 0,17*
CMAP TA (mV)	54,6 ± 1,9	50,7 ± 2,3
CMAP PL (mV)	7,51 ± 0,50	5,24 ± 0,68*
MUNE del TA	42 ± 1,3	38 ± 1,7
SMUA (µV)	1,572 ± 39	1,240 ± 109*
CNAP del NDg (µV)	31,6 ± 2,8	29,5 ± 2,5
Latència de l'ona H al PL (ms)	5,5 ± 0,3	6,7 ± 0,3*
Ràtio H/M del PL (%)	17 ± 3,4	32 ± 4,1*
NDg Lat (ms)	1,27 ± 0,06	1,41 ± 0,05*
Pes (g)	29,1 ± 0,6	29,5 ± 0,7

Taula R-I-1. Resultats dels tests de conducció nerviosa motors i sensorials en animals adults i vells. Les dades representen les mitjanes ± SEM; l'asterisc indica la diferència significativa basada en el t-test d'Student i el mètode Sidak-Bonferroni per a les comparacions múltiples, on * $p < 0,05$; n = 10 animals adults i 8 vells. TA: múscul Tibial Anterior; PL: múscul plantar interossi; CMAP: potencial d'acció muscular compost; MUNE: estimació numèrica de la unitat motora; SMUA: amplitud d'una sola unitat motora; CNAP: potencial d'acció nerviós compost; NDg: 4t nervi digital.

3. Canvis estructurals i moleculars a les NMJs dels músculs durant els processos de maduració i envelliment

Per tal d'analitzar l'afectació de les NMJs a mesura que els ratolins van madurant i, posteriorment, envellint (Willadt *et al.*, 2018), es va realitzar un estudi amb els músculs distals TA, soli i EDL i amb el múscul gràcil, més proximal. Es van agafar mostres d'animals de tres edats diferents: P30 (joves), P103 (adults) i P882-885 (vells), se'n van fer crio-seccions de 16 µm i es van tenyir amb α-Bgtx, per detectar les NMJs, combinada amb altres marcadors segons el que es pretenia estudiar.

3.1. Àrea i perímetre de les NMJs

Es van mesurar l'àrea i el perímetre de les plaques motores. Es va observar que els animals adults mostraven unes plaques motores més grans que els joves al TA i al gràcil (Figura R-I-5 A, K vs O i N vs R), amb un perímetre major en aquests dos músculs a més del soli (Figura R-I-5 C, K vs O, L vs P i N vs R). Als animals vells però, va ser a l'EDL on es va observar una major àrea en comparació amb els adults (Figura R-I-5 B i Q vs U), essent també major el perímetre en aquest múscul (Figura R-I-5 D i Q vs U).

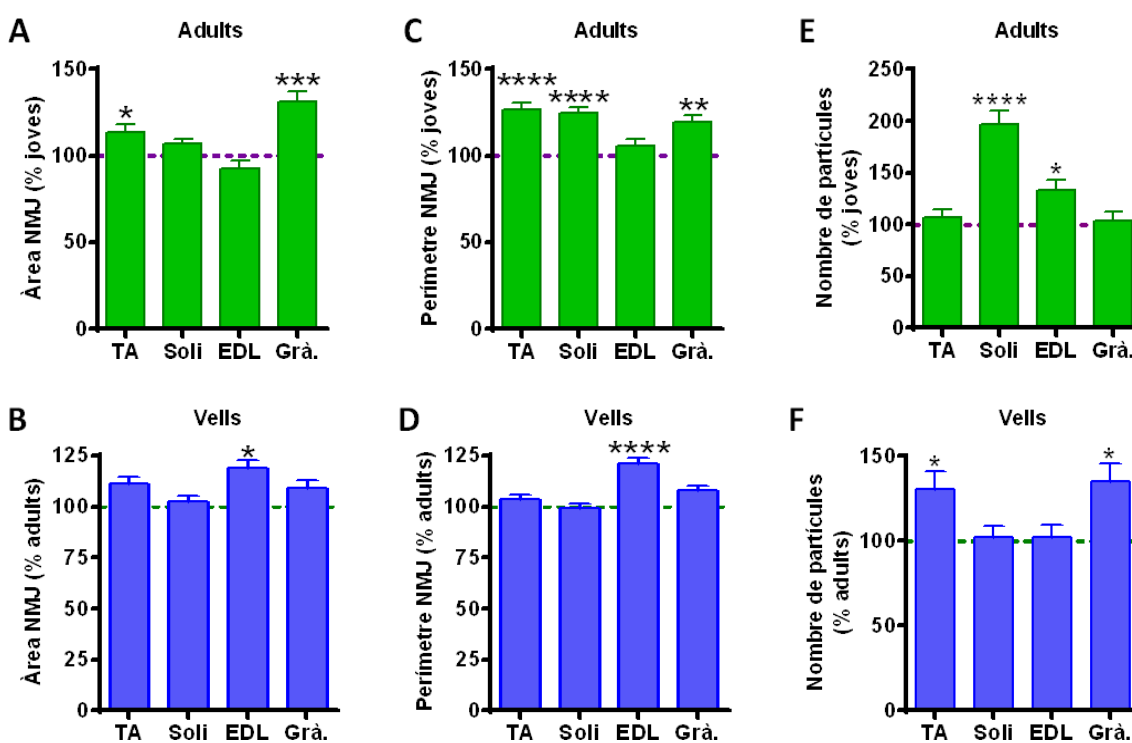
3.2. Fragmentació de les NMJs

D'altra banda, es va mesurar el grau de fragmentació de les plaques motores comptant el nombre de fragments en què es composava cadascuna d'elles (Willadt *et al.*, 2016). Es va observar que les plaques motores dels músculs soli i EDL dels animals adults mostraven més fragments que les dels joves (Figura R-I-5 E, L vs P i M vs Q); en canvi, en els animals vells, és als músculs TA i gràcil on s'observa un major nombre de fragments en comparació amb els adults (Figura R-I-5 F, O vs S i R vs V). A partir d'aquestes dades, es va fer una classificació per analitzar el grau de fragmentació, considerant les plaques motores com a fragmentades quan presentaven més de 5 fragments. Així, es va observar que els quatre músculs analitzats als animals adults presentaven un major percentatge de plaques motores fragmentades en comparació amb els joves (Figura R-I-5 G, K vs O, L vs P, M vs Q i N vs R); això és possiblement degut al fet que les plaques motores dels animals joves són més immadures, trobant-se encara en una etapa de maduració, i pràcticament totes elles mostren una forma més compacta. Alhora, els músculs TA i gràcil dels

animals vells presentaven un major percentatge de plaques motores fragmentades en comparació amb els adults (Figura R-I-5 H, O vs S i R vs V).

3.3. Maduració de les NMJs

A més, es va analitzar el grau de maduresa de les plaques motores en les diferents edats. Segons el seu marcatge amb α -Bgtx, les plaques motores es van classificar depenent de si tenien forma de placa (més immadures, amb una forma plana), en plecs, perforada o en forma de *pretzel* (en estructura secundària, amb plecs i invaginacions; la forma més madura i característica de les plaques motores sanes) (Gogliotti *et al.*, 2012). En comparació amb els animals joves, els adults mostraven un major percentatge de plaques motores en forma de *pretzel* i un menor percentatge de plaques motores perforades en tots els músculs analitzats (Figura R-I-5 I, K vs O, L vs P, M vs Q i N vs R); els animals vells mostraven un major percentatge de plaques motores perforades al soli, EDL i gràcil i un menor percentatge de plaques motores en forma de *pretzel* al soli i al gràcil a més de presentar algunes plaques motores en plecs al TA i al soli, de les quals no se'n va observar a cap dels músculs dels animals adults analitzats (Figura R-I-5 J, O vs S, P vs T, Q vs U i R vs V).



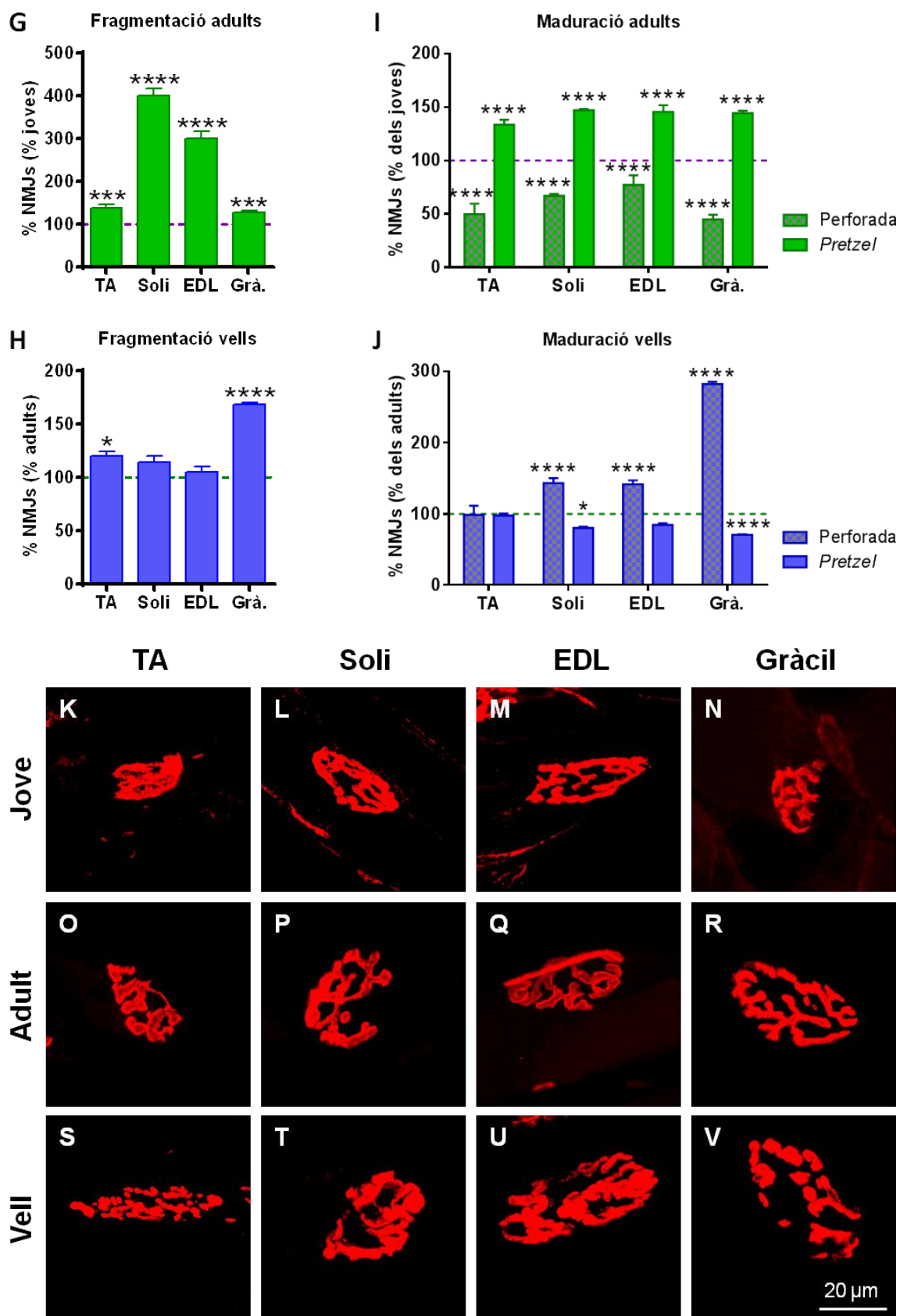


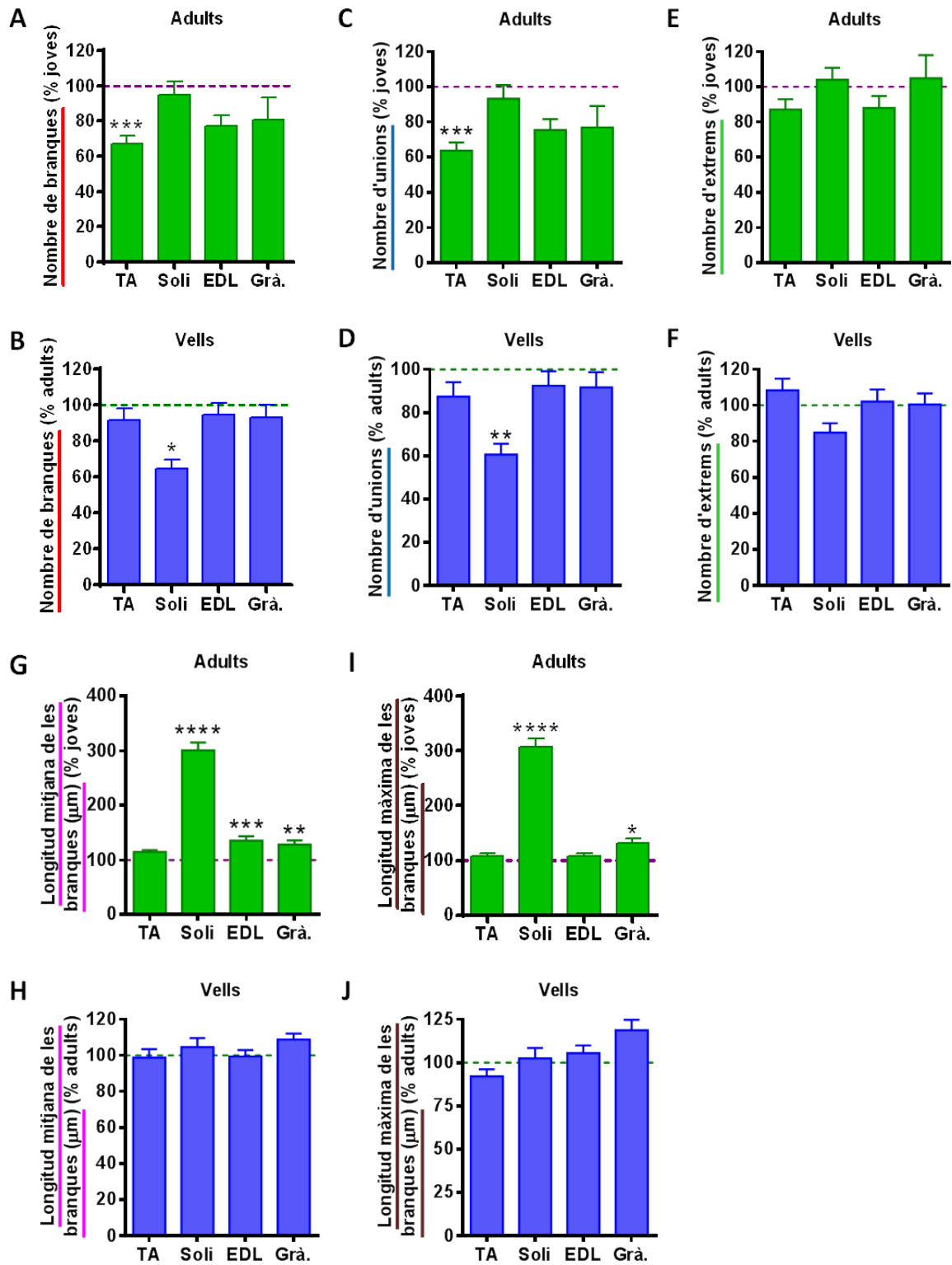
Figura R-I-5. Morfologia de les NMJs als músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells. Àrea (A i B) i perímetre (C i D) de les NMJs en els diferents músculs als 3 grups d'edat, nombre de fragments en què està formada cada NMJ (E i F), classificació

com a fragmentades o no fragmentades (G i H) i grau de maduresa de les NMJs (I i J). Les barres representen les mitjanes \pm SEM expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 100-200$ NMJs per animal i múscul en 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Les línies discontinúes verdes i morades representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs dels músculs TA, soli, EDL i gràcil a P30, P105 i P885 marcades amb α -Bgtx en vermell (K-V); el regle de calibratge (V, 20 μ m) és vàlid per a les imatges K-V.

A més a més, per tal d'avaluar el nivell de complexitat de les NMJs, les imatges capturades al microscopi confocal van ser processades amb el programa ImageJ primer mitjançant una binarització del marcatge, amb α -Bgtx, de les NMJs i després amb un sistema d'esqueletització que mostra el sistema d'arborització de les plaques motores. Amb el mateix programa es poden quantificar diferents paràmetres relacionats amb les branques que formen les NMJs com ara el nombre de branques, la seva longitud o el nombre d'unions entre elles.

En comparació amb els animals joves (Figura R-I-6 K-N), els adults (Figura R-I-6 O-R) van mostrar un menor nombre de branques (Figura R-I-6 A) i un menor nombre d'unions (Figura R-I-6 C) al múscul TA, tot i que no es van observar canvis significatius en el nombre d'extrems de les branques (Figura R-I-6 E). D'altra banda, es va observar que aquestes branques tenien una major longitud mitjana als músculs soli, EDL i gràcil (Figura R-I-6 G) i una major longitud màxima als músculs soli i gràcil (Figura R-I-6 I) quan es comparaven amb els animals joves.

Al comparar els animals vells (Figura R-I-6 S-V) amb els adults (Figura R-I-6 O-R) però, va ser al soli on es va veure un menor nombre de branques (Figura R-I-6 B) i d'unions (Figura R-I-6 D). Tampoc es van observar canvis significatius pel que fa al nombre d'extrems de les branques (Figura R-I-6 F) o a les longituds mitjana (Figura R-I-6 H) o màxima de les branques (Figura R-I-6 J).



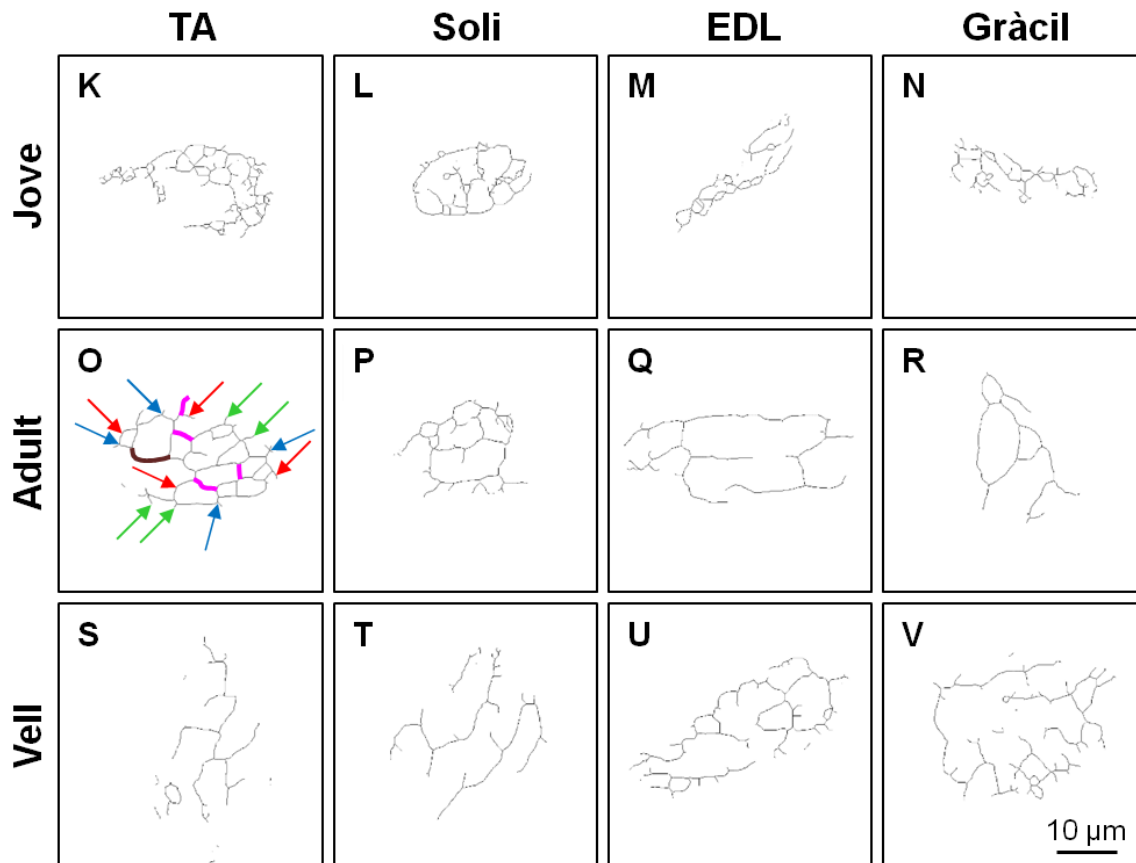


Figura R-I-6. Complexitat de les NMJs als músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells. Nombre de branques que tenen les NMJs (A i B), nombre d'unions entre elles (C i D), nombre d'extrems (G i H) i longituds mitjana (G i H) i màxima (I i J) de les branques. Les barres representen les mitjanes \pm SEM expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 10-12$ NMJs per animal i múscul en 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Les línies discontinúes verdes i morades representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs als músculs TA, soli, EDL i gràcil a P30 (K-N), P105 (O-R) i P885 (S-V) marcades amb α -Bgtx després de ser binaritzades i posteriorment, amb el programa ImageJ, sotmeses a un procés d'esqueletització; O: imatge representativa d'una NMJ del TA d'un animal adult on es mostren diverses branques marcades amb fletxes vermelles, les unions que es formen entre elles marcades amb fletxes blaves, els extrems de les branques marcats amb fletxes verdes, la longitud de diverses branques en rosa i la longitud de la branca més llarga en marró; el regle de calibratge (V, 20 μ m) és vàlid per a les imatges K-V.

3.4. Innervació de les NMJs

Donat el fet que s'han descrit fenòmens de denervació durant l'envelliment, (Chai *et al.*, 2011), també es va mesurar el grau d'innervació de les plaques motores mitjançant la tinció de talls longitudinals de 16 µm de gruix dels músculs amb α-Bgtx, per identificar les plaques motores, combinada amb una doble immunotinció amb l'anticòs contra l'NF-68 i l'anticòs contra l'SV2 per tal de detectar l'arribada dels axons a les plaques motores i els terminals nerviosos pre-sinàptics, respectivament. Es van considerar com a denervades aquelles plaques motores en què no s'hi observava l'arribada de cap axó ni el terminal nerviós pre-sinàptic (és a dir, aquelles en què no hi havia marcatge d'NF-68 ni d'SV2); en el cas de les plaques motores innervades, es va fer una discriminació diferenciant si hi arribava un sol axó o més d'un, essent considerades així com a monoinnervades o poliinnervades, respectivament. Es va observar que, en comparació amb els animals joves, els adults no presentaven canvis en el percentatge de plaques motores denervades (Figura R-I-7 A), però sí que hi havia una disminució del percentatge de les que estaven monoinnervades als músculs TA i soli (Figura R-I-7 C) i un augment de les que estaven poliinnervades al TA, al soli i al gràcil (Figura R-I-7 E). Pel que fa als animals vells, es va observar que, en comparació amb els adults, aquests presentaven un major percentatge de plaques motores denervades (Figura R-I-7 B) i un menor percentatge de les monoinnervades (Figura R-I-7 D) en tots els músculs analitzats, així com també un augment de les que estaven poliinnervades als músculs TA, soli i gràcil (Figura R-I-7 F). En la Figura R-I-7 G1-R2, es mostren imatges representatives dels canvis observats en els diferents músculs pel que fa al grau d'innervació de les NMJs entre els tres grups d'edat on les NMJs s'han tenyit amb α-Bgtx en vermell i amb anticòs anti-NF + anti-SV2 en verd; les NMJs poliinnervades (Figura R-I-7 R1 i R2) es troben assenyalades amb fletxes blanques.

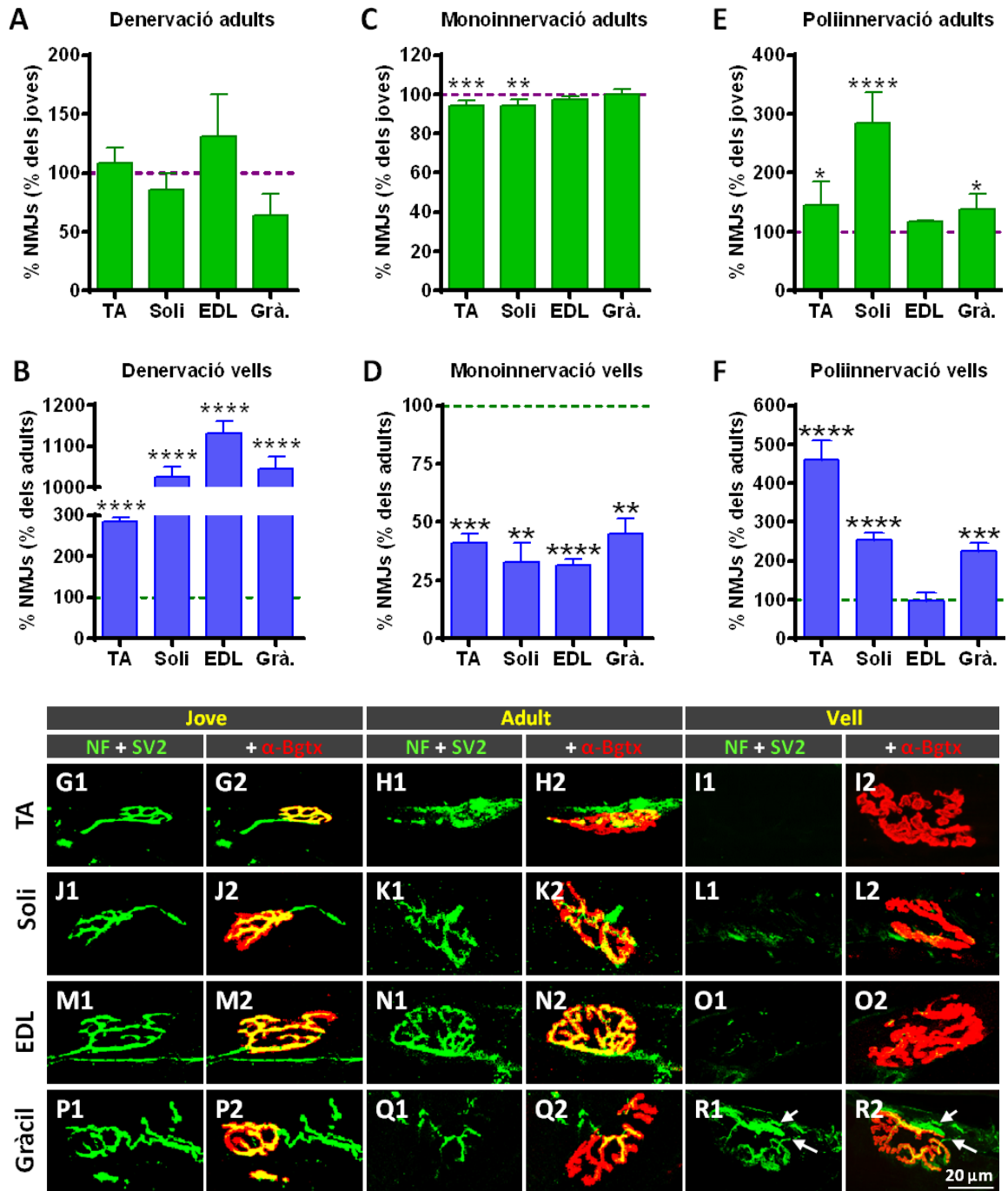
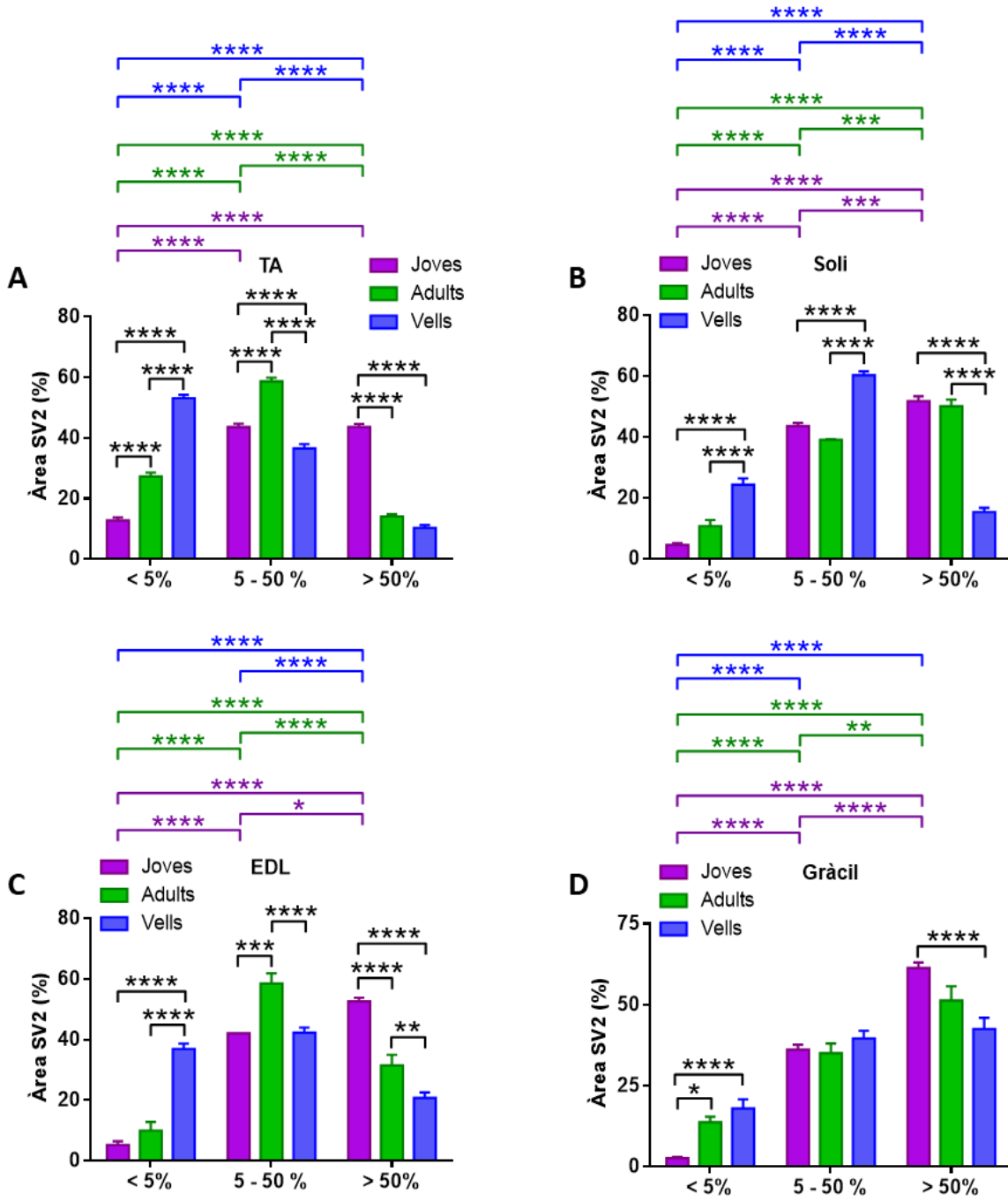


Figura R-I-7. Canvis a les NMJs en els diferents grups d'edat. Grau d'innervació de les NMJs als músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells: percentatge de plaques motores denervades (A i B), monoinnervades (C i D) i poliinnervades (E i F). Les barres representen les mitjanes \pm SEM expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 100-200$ NMJs per animal i múscul en 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Les línies discontinúes verdes i morades representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir

dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (en vermell) als músculs TA, soli, EDL i gràcil a P30, P105 i P885 mostrant els diferents graus d'innervació (G1-R2); les fletxes blanques (R1 i R2) mostren un exemple de poliinnervació; el regle de calibratge (R2, 20 μ m) és vàlid per a les imatges G1-R2.

A més, per tal de realitzar una anàlisi quantitativa, es va mesurar el percentatge de cada placa motora que estava coberta per SV2 i es van agrupar les plaques motores segons si n'estaven cobertes per menys del 5 % (considerades denervades), entre el 5 i el 50 % o més del 50 % de l'àrea total. Als quatre músculs analitzats es va observar que els animals adults presentaven un major percentatge de plaques motores amb menys del 5 % cobert per SV2 (tot i només ser estadísticament significatiu als músculs TA i gràcil) i una disminució del percentatge de les que estaven cobertes per més del 50 % (tot i només ser estadísticament significatiu als músculs TA i EDL) (Figura R-I-8 A-D i E1-O2); les que estaven cobertes per un 5-50 %, es mostraven sense canvis significatius entre joves i adults als músculs soli i gràcil (Figura R-I-8 B i D, H1 i H2 vs I1 i I2 i N1 i N2 vs O1 i O2), mentre que es va observar un augment d'aquest percentatge als adults respecte als joves als músculs TA i EDL (Figura R-I-8 A i C, E1 i E2 vs F1 i F2 i K1 i K2 vs L1 i L2). D'altra banda, amb l'envelliment, es va veure un augment progressiu del percentatge de plaques motores denervades (<5 %) als quatre músculs analitzats (no estadísticament significatiu al gràcil) i una disminució de les que estaven cobertes amb un percentatge major al 50 % (estadísticament significativa als músculs soli i EDL) (Figura R-I-8 A-D i F1 i F2 vs G1 i G2, I1 i I2 vs J1 i J2, L1 i L2 vs M1 i M2 i O1 i O2 vs P1 i P2); pel que fa a les plaques motores cobertes per un 5-50 %, es va observar una certa variabilitat entre els diferents músculs, ja que aquest percentatge disminuïa als animals vells respecte als adults al TA i a l'EDL (Figura R-I-8 A i C, F1 i F2 vs G1 i G2 i L1 i L2 vs M1 i M2), augmentava al soli (Figura R-I-8 B i I1 i I2 vs J1 i J2) i es mantenia sense canvis significatius al gràcil (Figura R-I-8 D i O1 i O2 vs P1 i P2). En la Figura R-I-8 E1-P2 es mostren imatges representatives dels canvis observats en el percentatge de les NMJs cobertes per SV2 als diferents músculs entre els tres grups d'edat, amb l' α -Bgtx a la primera columna de cada grup d'edat (imatges 1) i el NF + SV2 a la segona

columna, (imatges 2) on el perímetre de la placa motora s'ha superposat en vermell.



	Jove		Adult		Vell	
	α -Bgtx	NF + SV2	α -Bgtx	NF + SV2	α -Bgtx	NF + SV2
TA	E1 475,28 μm^2 	E2 213,22 μm^2 44,86% 	F1 285,58 μm^2 	F2 144,89 μm^2 50,74% 	G1 534,91 μm^2 	G2 17,17 μm^2 3,21%
Soli	H1 160,87 μm^2 	H2 123,24 μm^2 76,61% 	I1 383,57 μm^2 	I2 264,91 μm^2 69,06% 	J1 198,72 μm^2 	J2 30,91 μm^2 15,55%
EDL	K1 116,56 μm^2 	K2 62,3 μm^2 53,45% 	L1 423,2 μm^2 	L2 371,87 μm^2 87,87% 	M1 357,79 μm^2 	M2 135,22 μm^2 37,79%
Gràcil	N1 260,42 μm^2 	N2 199,38 μm^2 76,56% 	O1 576,26 μm^2 	O2 430,24 μm^2 74,66% 	P1 95,45 μm^2 	P2 59,18 μm^2 62,01%

Figura R-I-8. Percentatge de la placa motora cobert per SV2 als músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells; classificació en <5 % (denervades), 5-50 % i >50 % (A-D) d'SV2 sobre l'àrea total de la placa motora. Les barres representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *two-way ANOVA*, on * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; $n = 100-200$ NMJs per animal i múscul en 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges binaritzades representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx o amb NF + SV2 (amb el perímetre de la placa motora superposat en vermell) als músculs TA, soli, EDL i gràcil a P30, P105 i P885 (E1-P2); el regle de calibratge (P2, 20 μm) és vàlid per a les imatges E1-P2.

3.5. Sprouting de de les NMJs

A part de les diferències en el grau d'innervació, es va observar que el TA dels animals vells mostrava una arborització més complexa i un major percentatge d'NMJs amb *sprouts* en comparació amb els animals adults (Figura R-I-9 A i C1 i C2).

Lligat amb l'augment del percentatge de plaques motores denervades observat als animals vells, també es va observar a tots els músculs analitzats un increment del nombre de fragments dispersos de l'AChR extra-sinàptics (Figura R-I-9 B i D-G) positius per a diversos marcadors pre-sinàptics, el que és indicatiu d'un procés de creació de nous contactes sinàptics neuromusculars (Figura R-I-9 H1-H4).

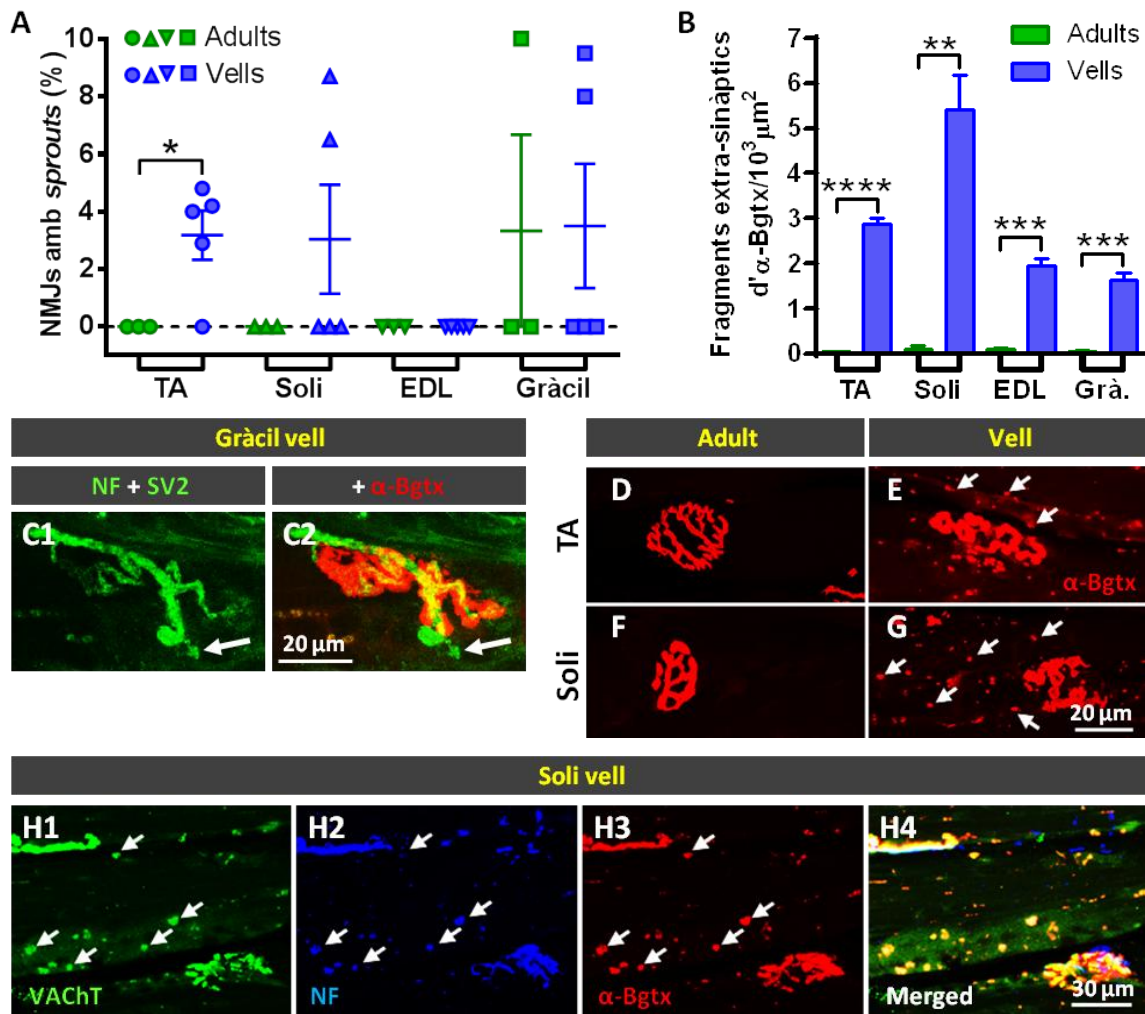


Figura R-I-9. A) Percentatge d'NMJs amb *sprouts* als músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals adults i vells; cada punt representa el percentatge d'*sprouts* observat en cada animal per als diferents músculs, indicat també amb les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$; $n = 25-30$ NMJs per animal i múscul. B) Densitat (nombre/1000 μm^2) de fragments extra-sinàptics de les plaques motores marcats amb α -Bgtx (AChR) a les fibres dels animals adults i vells; les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs* indiquen les diferències significatives basades en el t-test, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 25-30$ NMJs de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges representatives capturades al microscopi confocal d'una NMJ marcada amb α -Bgtx (vermell) i amb NF + SV2 (verd) al múscul gràcil d'un animal vell on les fletxes blanques mostren signes d'*sprouting* terminal (C1 i C2); imatges representatives d'NMJs marcades amb α -Bgtx (vermell) als músculs TA i soli d'animals adults i vells on les fletxes blanques (E i G) assenyalen els cúmuls d'AChRs dispersats al voltant de les NMJs presents als animals vells (D-G); imatges representatives d'una NMJ del soli d'un animal vell marcada amb α -Bgtx (vermell) i amb doble tinció amb el transportador vesicular de l'acetilcolina (de l'anglès *vesicular acetylcholine transporter* [VACHT]) (verd) i NF (blau) on les fletxes blanques

assenyalen els spots d'AChR marcats amb α -Bgtx, que són positius tant per VAcHT com per NF (H1-H4); els regles de calibratge (C2, 20 μ m; G, 20 μ m i H4, 30 μ m) són vàlids per a les imatges C1 i C2, D-G i H1-H4, respectivament.

3.6. Canvis en els nivells d'expressió de diferents molècules a les NMJs

3.6.1. Pètid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP)

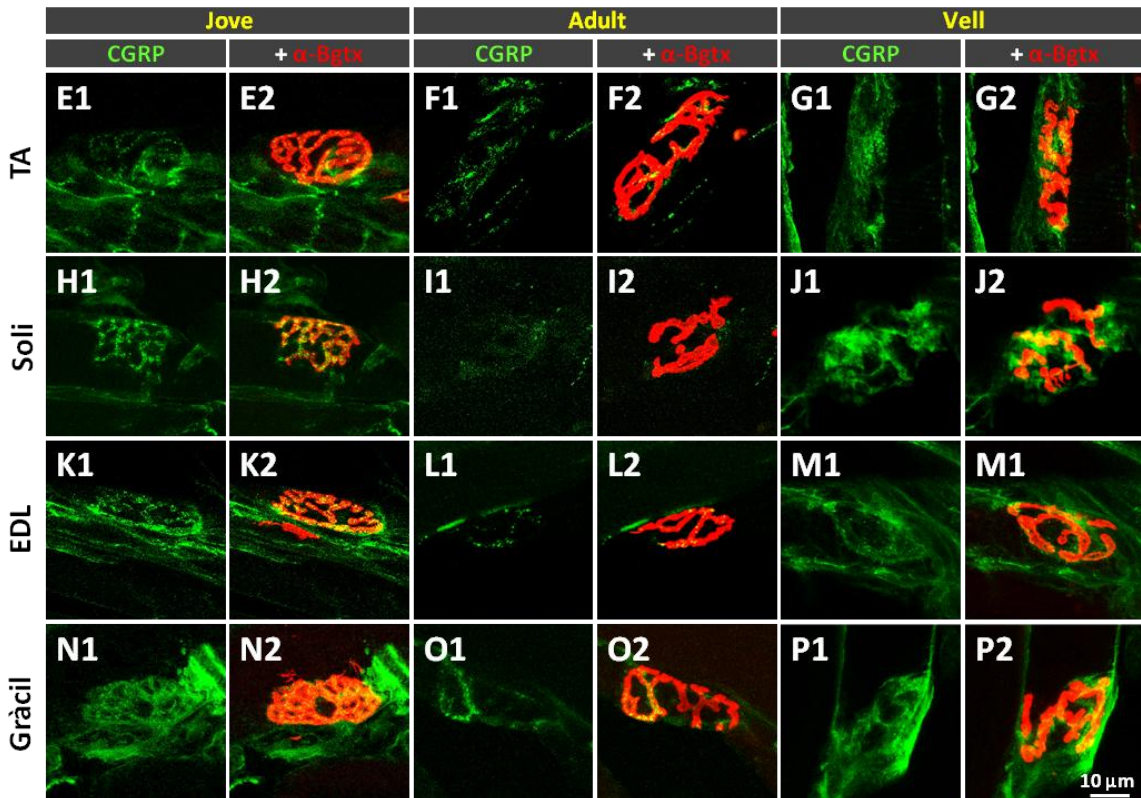
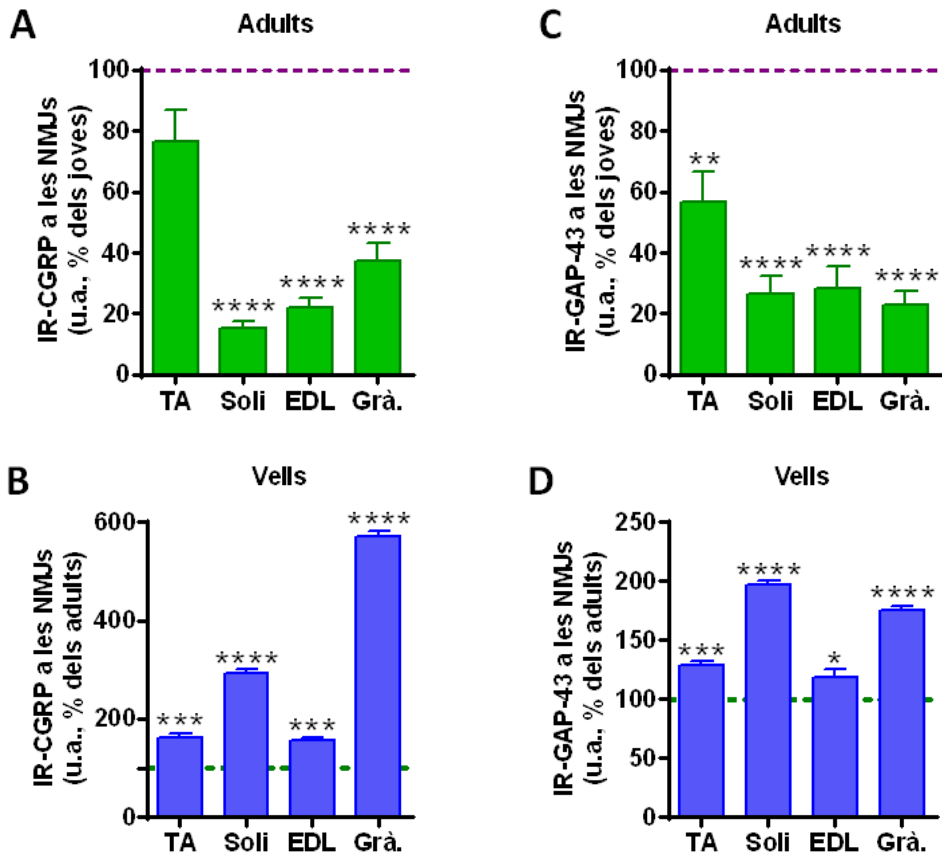
Tant per part del nostre grup com per d'altres ha estat descrit que, durant el desenvolupament de les NMJs, els terminals nerviosos motors contenen alts nivells de CGRP en un inici i que aquests disminueixen a mesura que les NMJs maduren; posteriorment, durant el procés d'envelliment, aquests nivells tornen a augmentar durant els processos de reinnervació i *sprouting* (Matteoli *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1995; Tarabal, 1996-1; Tarabal *et al.*, 1996-2). D'altra banda, degut a la seva implicació en processos d'*sprouting* i reinnervació nerviosa, el CGRP es troba sobre-expressat durant aquests processos.

En aquest estudi, es van mesurar els nivells d'expressió de CGRP als diferents grups d'edat i es va veure que, en els animals adults, tots els músculs mostraven nivells més baixos en comparació amb els joves (essent aquests valors estadísticament significatius al soli, l'EDL i el gràcil) (Figura R-I-10 A, E1 i E2 vs F1 i F2, H1 i H2 vs I1 i I2, K1 i K2 vs L1 i L2 i N1 i N2 vs O1 i O2). D'altra banda, es va veure que els animals vells mostraven nivells d'expressió superiors als dels adults a tots els músculs analitzats (Figura R-I-10 B, F1 i F2 vs G1 i G2, I1 i I2 vs J1 i J2, L1 i L2 vs M1 i M2 i O1 i O2 vs P1 i P2).

3.6.2. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43)

S'ha vist que la GAP-43 s'expressa a les neurones durant el creixement axonal, especialment als cons de creixement axonal (Holahan, 2017). S'ha observat que al sistema neuromuscular es troba a nivells baixos a les MNs a l'inici del procés d'eliminació sinàptica, el que alhora està regulat per l'activitat muscular (Caroni and Becker, 1992). D'altra banda, es troben nivells baixos de GAP-43 a les MNs madures i als seus terminals nerviosos. Els nostres resultats mostren que els quatre músculs analitzats presentaven nivells inferiors d'expressió als animals adults en comparació amb els joves (Figura R-I-10 C, Q1 i Q2 vs R1 i R2, T1 i T2 vs U1 i U2, W1 i W2 vs X1 i X2 i Z1 i Z2 vs a1 i a2), mentre que

l'expressió era superior als animals vells respecte als adults (Figura R-I-10 D, R1 i R2 vs S1 i S2, U1 i U2 vs V1 i V2, X1 i X2 vs Y1 i Y2 i a1 i a2 vs b1 i b2).



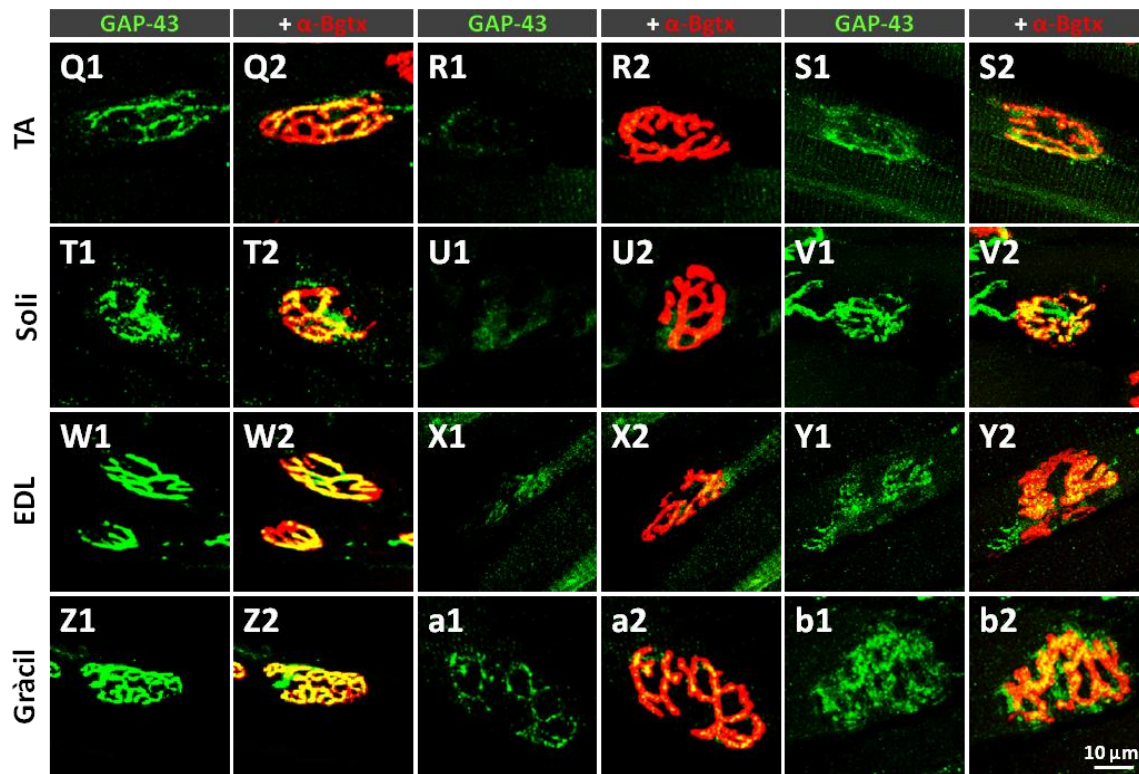


Figura R-I-10. Percentatges dels nivells d'expressió de CGRP (A i B) i de GAP-43 (C i D) a les NMJs dels músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 26-40$ NMJs de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Les línies discontinües verdes i morades representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (vermell), per identificar les plaques motores, junt amb CGRP (E1-P2) o GAP-43 (Q1-b2) (verd) als músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells; els regles de calibratge (P2, 10 μ m; b2, 10 μ m) són vàlids per a les imatges E1-P2 i Q1-b2, respectivament.

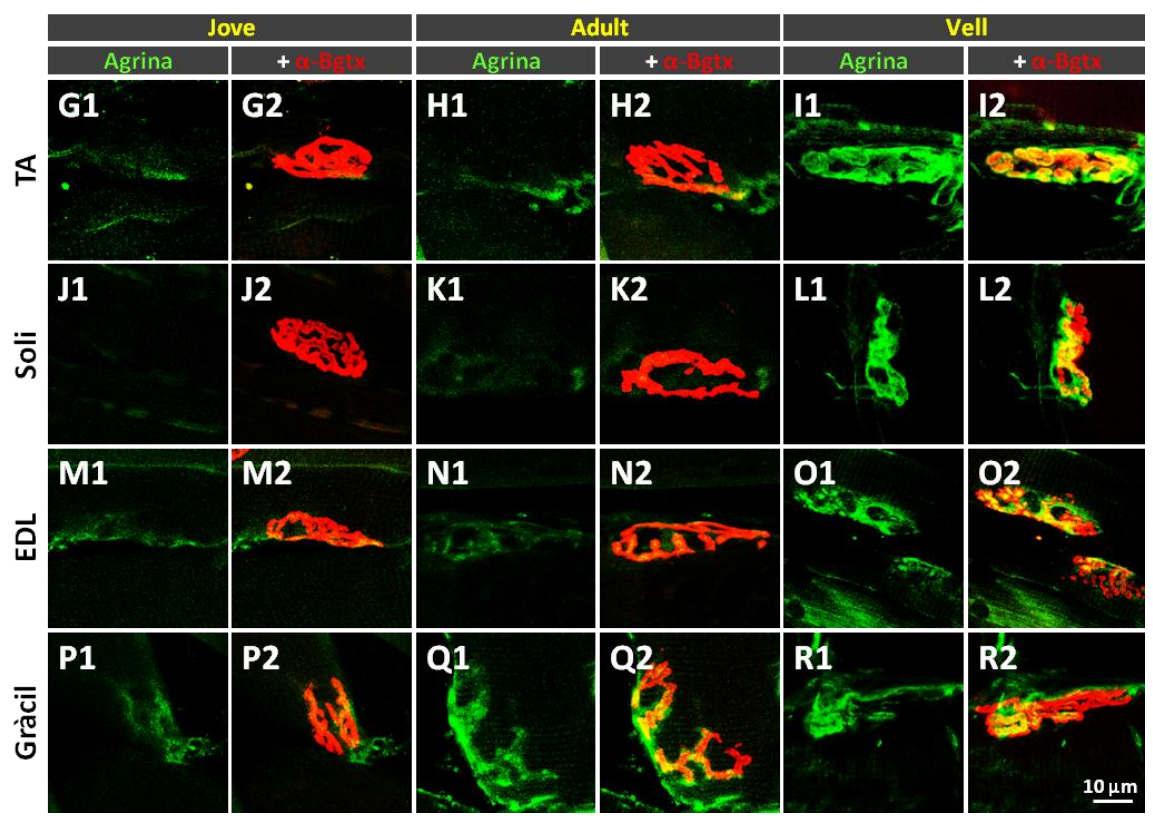
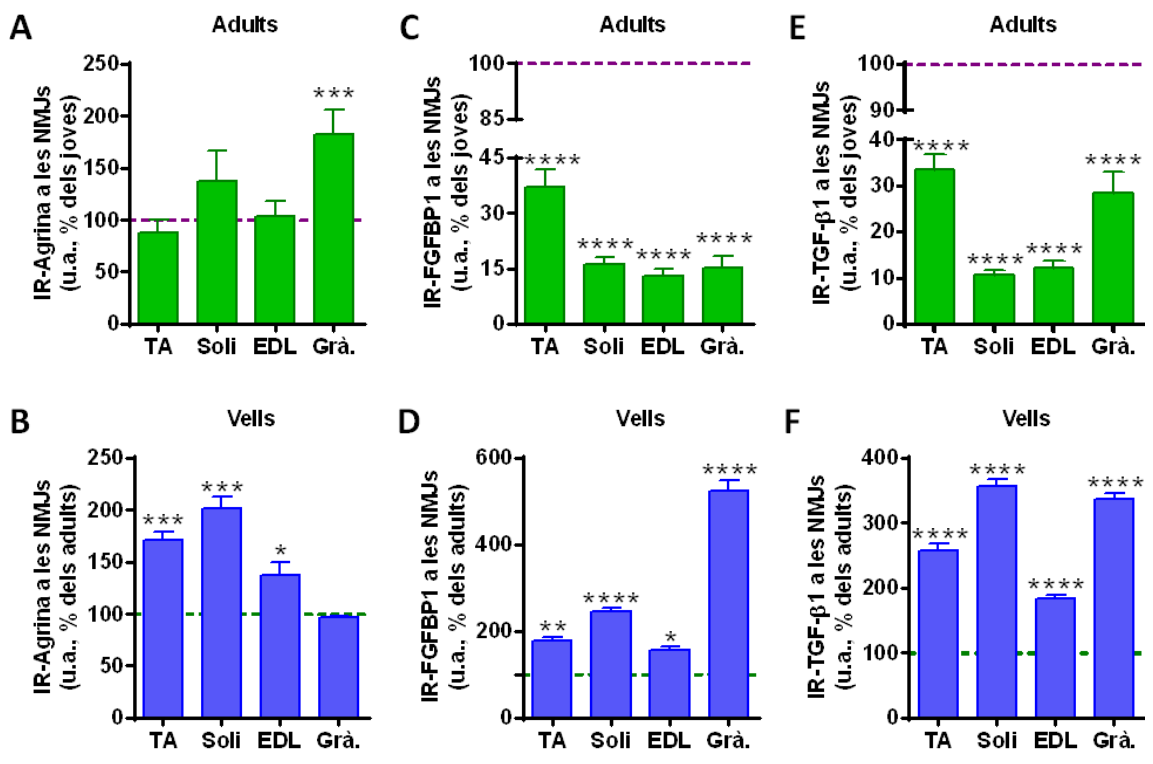
3.6.3. Agrina

També s'ha descrit que l'agrina està fortament implicada en el procés de formació i manteniment de les NMJs (Tintignac *et al.*, 2015; L. Li *et al.*, 2018). L'agrina és sintetitzada al cos de les MNs i és transportada fins al terminal nerviós, on finalment és alliberada per tal de disposar-se en la làmina basal (Reist *et al.*, 1987; Samuel *et al.*, 2012).

En aquest estudi, es van quantificar els nivells d'agrina a les NMJs en els diferents grups d'edat i es va observar que el gràcil dels animals adults mostrava uns nivells superiors de la proteïna respecte als ratolins joves (Figura R-I-11 A i P1 i P2 vs Q1 i Q2); en canvi, pel que fa als animals vells, no es van observar canvis en aquest múscul respecte als adults, però sí que hi havia un augment dels nivells d'agrina als altres tres músculs analitzats (Figura R-I-11 B i H1 i H2 vs I1 i I2, K1 i K2 vs L1 i L2 i N1 i N2 vs O1 i O2).

3.6.4. Proteïna d'unió al factor de creixement dels fibroblasts 1 (FGFBP1) i factor de creixement transformant β 1 (TGF- β 1)

L'FGFBP1 està implicada en la regeneració de les NMJs danyades; s'ha descrit que s'uneix a l'FGF present a la MEC per tal de promoure la seva activitat (Tassi *et al.*, 2001). Per la seva banda, s'ha vist que el TGF- β 1 és capaç de regular l'expressió de l'FGFBP1 dels miotubs en cultiu (Taetzsch *et al.*, 2017, 2018). En aquest estudi, es va observar que ambdues proteïnes s'expressaven en un menor grau als animals adults en comparació amb els joves (FGFBP1: Figura R-I-11 C i S1 i S2 vs T1 i T2, V1 i V2 vs W1 i W2, Y1 i Y2 vs Z1 i Z2 i b1 i b2 vs c1 i c2; TGF- β 1: Figura R-I-11 E i e1 i e2 vs f1 i f2, h1 i h2 vs i1 i i2, k1 i k2 vs l1 i l2, n1 i n2 vs o1 i o2); a mesura que els animals envellien, es va veure que aquests nivells tornaven a augmentar considerablement en les dues proteïnes als quatre músculs analitzats (FGFBP1: Figura R-I-11 D i T1 i T2 vs U1 i U2, W1 i W2 vs X1 i X2, Z1 i Z2 vs a1 i a2 i c1 i c2 vs d1 i d2; TGF- β 1: Figura R-I-11 F i f1 i f2 vs g1 i g2, i1 i i2 vs j1 i j2, l1 i l2 vs m1 i m2, o1 i o2 vs p1 i p2). Observant el patró de la immunotinció, es va veure que aquestes proteïnes es localitzen en la zona postsinàptica, marcada amb α -Bgtx, però que en algunes NMJs també s'observa marcatge fora d'aquesta àrea, en la regió situada al voltant de les plaques motores, (Figura R-I-11 H2, I2, Q2, U2, Y2, a2, f2, g2, k2...).



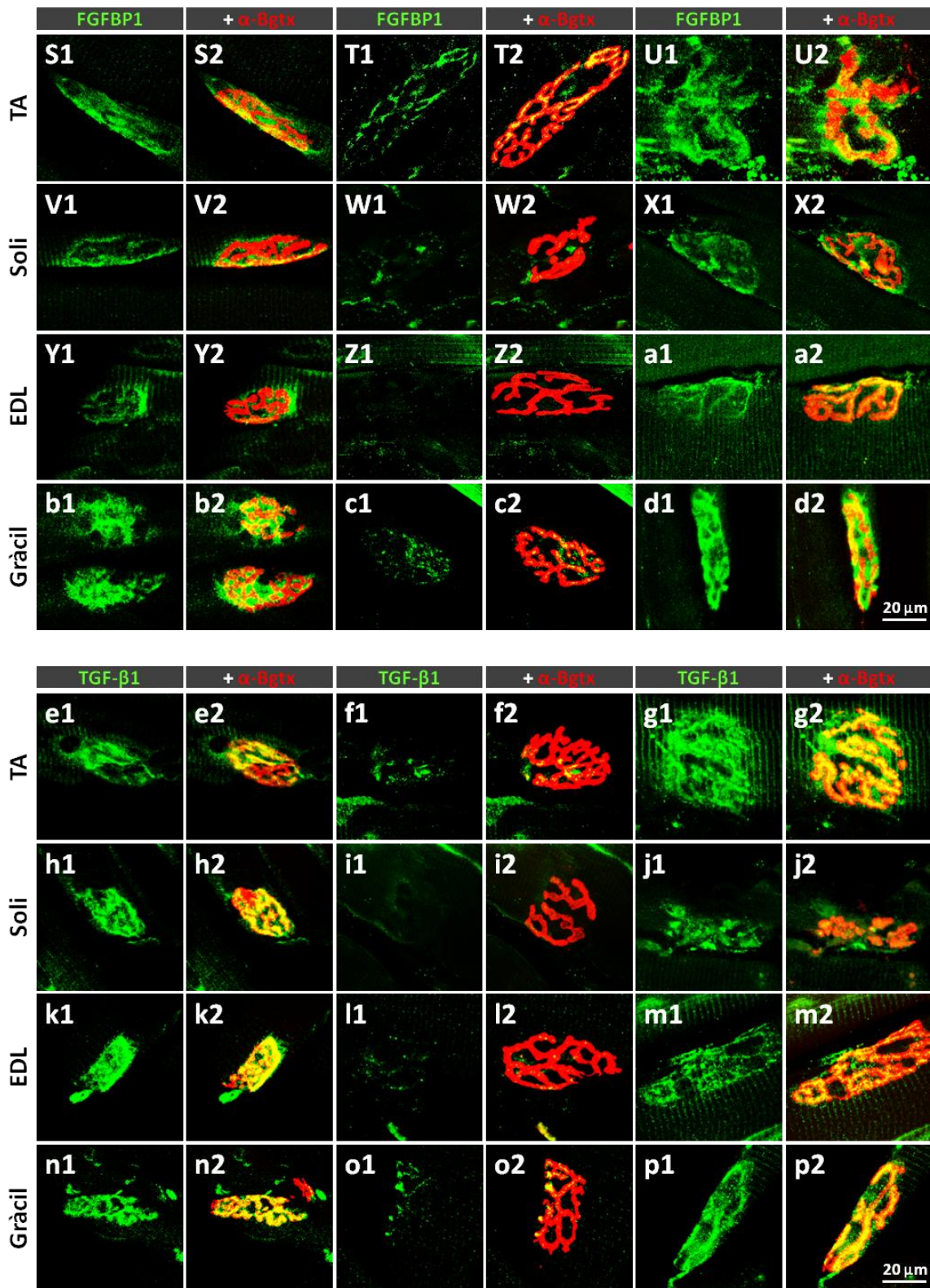


Figura R-I-11. Percentatges dels nivells d'expressió d'agrina (A i B), FGFBP-1 (C i D) i TGF-β1 (E i F) a les NMJs dels músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells. Les barres representen les mitjanes ± SEM expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test

one-way ANOVA amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 26-40$ NMJs de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Les línies discontinües verdes i morades representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (vermell), per identificar les plaques motores, junt amb agrina (G1-R2), FGFBP-1 (S1-d2) o TGF- β 1 (e1-p2) (verd) als músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells; els regles de calibratge (R2, 10 μ m; d2, 20 μ m i p2, 20 μ m) són vàlids per a les imatges G1-R2, S1-d2 i e1-p2, respectivament.

4. Canvis en els músculs esquelètics relacionats amb la maduració i l'envelliment

A més de les alteracions observades a les NMJs, ha estat descrit que amb l'envelliment també s'observen canvis en els músculs esquelètics d'alguns models murins, tant a nivell histològic com electrofisiològic (Caccia *et al.*, 1979; Ma *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2017; Ascenzi *et al.*, 2019; Faitg *et al.*, 2019; revisions: Hunter *et al.*, 2016; McKinnon *et al.*, 2017). Per això, es van descriure les alteracions histopatològiques en els quatre músculs estudiats per tal de determinar si els canvis a nivell muscular podrien explicar l'empitjorament observat en els tests d'habilitats motores.

4.1. Pes muscular

Donat el fet que es va observar un augment del percentatge de plaques motores denervades en els animals vells i que això pot anar lligat a fenòmens de sarcopènia, es va mesurar el pes dels músculs a diferents punts d'edat, així com l'àrea de les seccions transversals dels músculs. Es va observar que cap dels quatre músculs analitzats mostrava diferències significatives de pes entre els diferents grups d'edat (Figura R-I-12 A). També es va normalitzar el pes dels músculs amb el pes dels animals i en aquest cas tampoc es van observar diferències significatives entre els diferents grups d'edat; fins i tot, el múscul gràcil dels animals vells mostrava una menor relació massa muscular/pes corporal respecte als animals adults (Figura R-I-12 B).

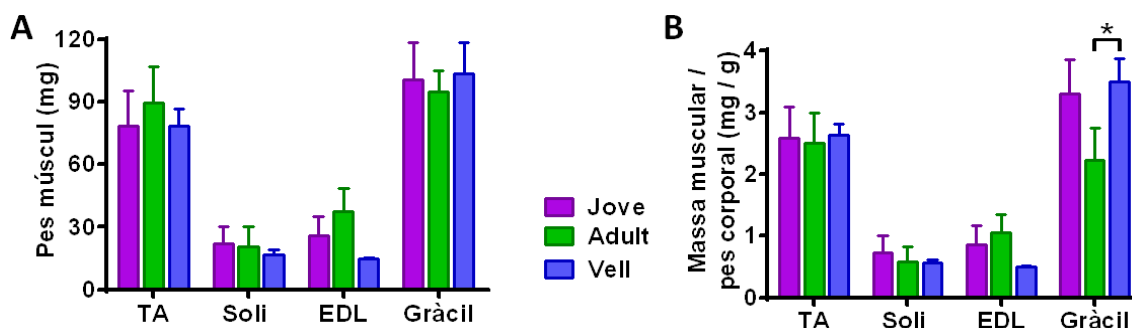
4.2. Àrea muscular

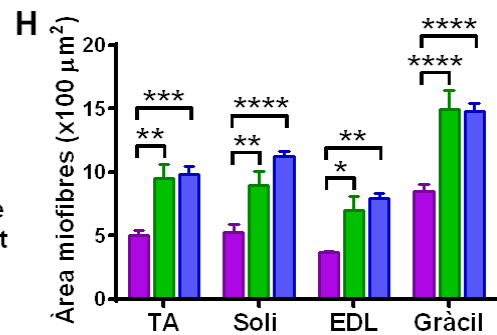
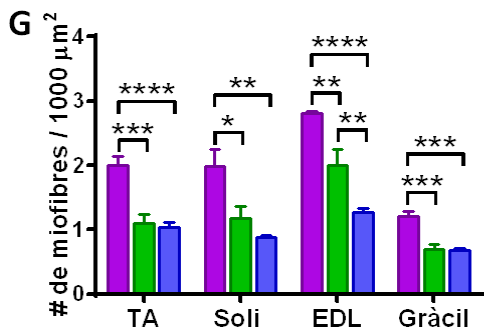
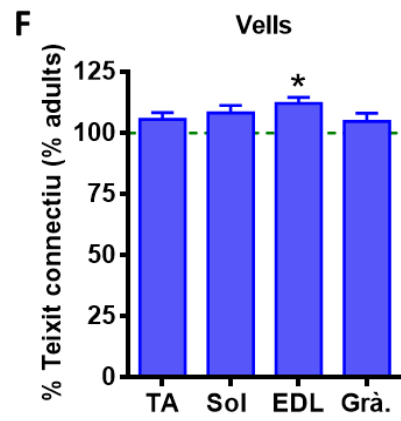
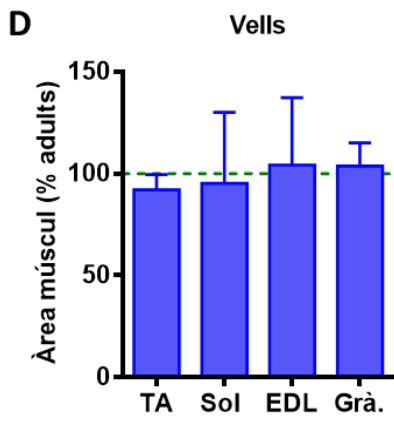
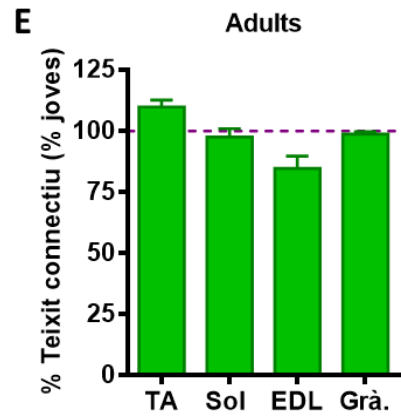
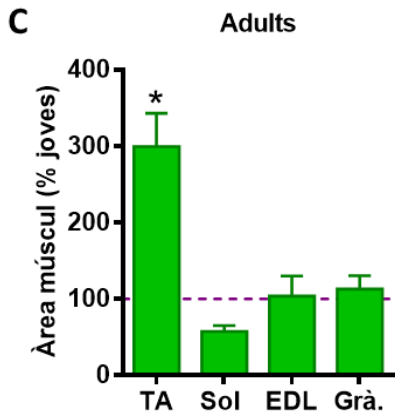
Pel que fa a l'àrea dels talls transversals dels músculs, només al TA es va observar un augment en els animals adults respecte als joves (Figura R-I-12 C i

I vs L), sense canvis significatius en cap dels músculs analitzats en els animals vells respecte als adults (Figura R-I-12 D, L-Q, S i T).

Atès que no es van observar grans canvis en l'àrea total dels músculs en els talls transversals, es va analitzar el percentatge de cada múscul ocupat per teixit connectiu, així com la densitat de les miofibres (representada com el nombre de miofibres contingudes en una àrea de 1000 μm^2) i l'àrea d'aquestes miofibres. El percentatge de teixit connectiu es va mostrar invariable entre animals joves i adults en els quatre músculs analitzats (Figura R-I-12 E, I-N, R i S); en animals vells però, sí que hi havia un augment del percentatge de teixit connectiu respecte als adults a tots els músculs, essent aquestes diferències estadísticament significatives a l'EDL (Figura R-I-12 F, L-Q, S i T). També es va veure que els quatre músculs mostraven una menor densitat de fibres en l'edat adulta en comparació amb els joves (Figura R-I-12 G, I-N, R i S) i que aquesta densitat encara era menor en els animals vells en el cas de l'EDL (Figura R-I-12 G i Q vs N), el que fa pensar que hi ha una afectació a les miofibres durant l'envelliment que és diferent segons el tipus de múscul.

Es van utilitzar imatges de crio-seccions transversals a 20 augments marcades amb laminina (Figura R-I-13 B-M) per mesurar l'àrea de les miofibres i, en aquest cas, en concordança amb la disminució de la densitat en els animals adults, es va observar un augment de la mida de les miofibres d'aquests animals en comparació amb els joves en els quatre músculs (Figura R-I-12 H i Figura R-I-13 F-I vs B-E), sense diferències significatives entre animals adults i vells (Figura R-I-12 H i Figura R-I-13 J-M vs F-I).





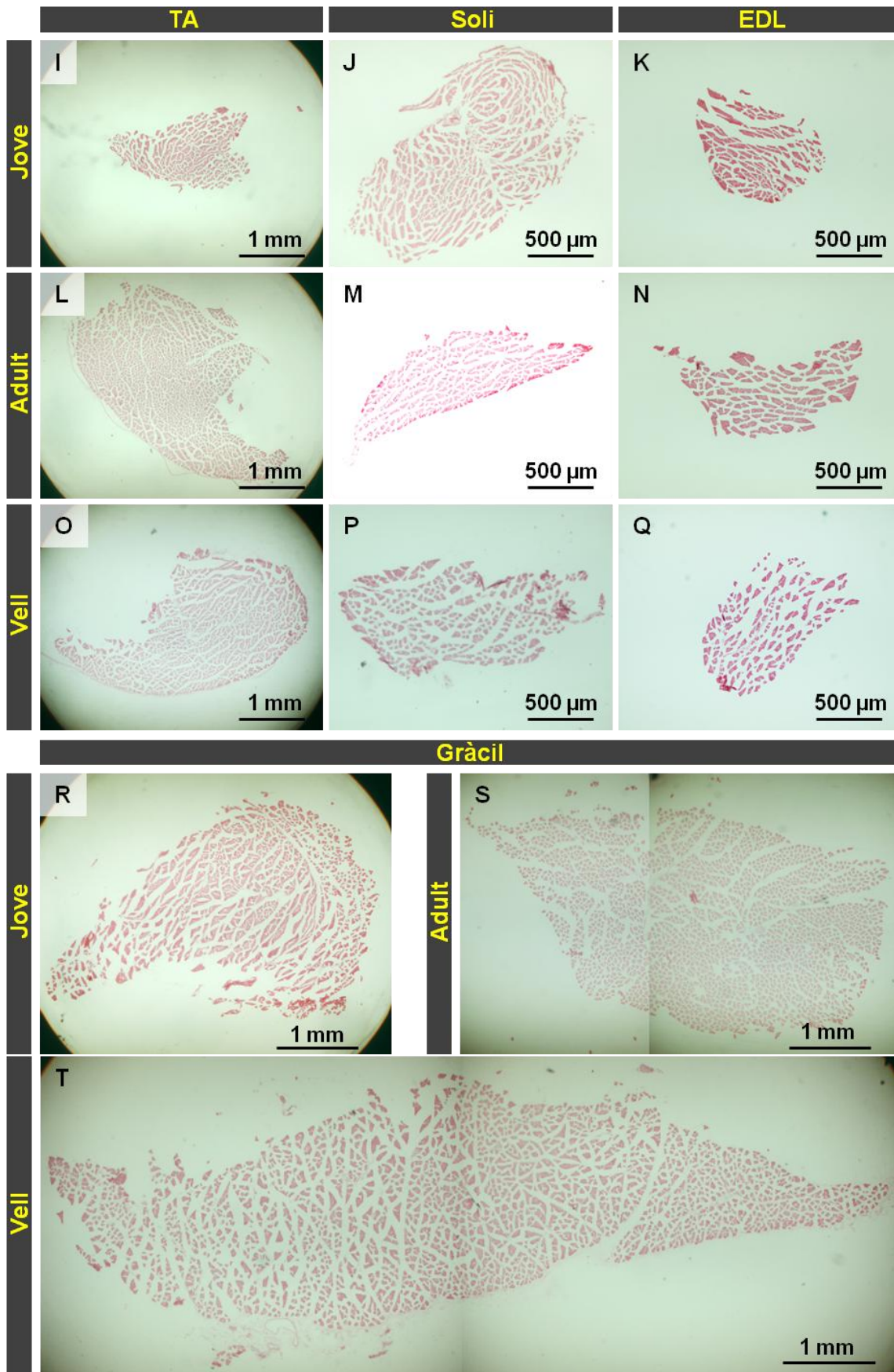


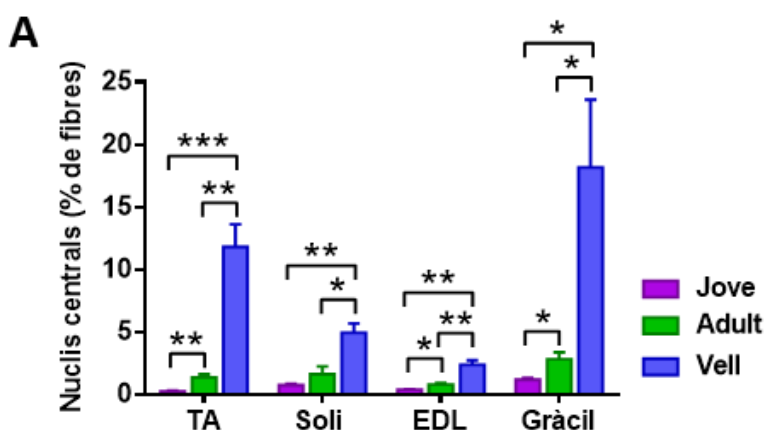
Figura R-I-12. Canvis histològics durant la maduració i l'envelliment en els músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells. Pes dels músculs (A, en mg) i relació

d'aquest pes amb el pes corporal (B, en mg/g), àrea de les crio-seccions transversals dels músculs (C i D, en μm^2), percentatge de teixit connectiu (E i F), densitat de miofibres (G, nombre de miofibres en 1000 μm^2) i àrea de les miofibres en talls transversals (H, en μm^2). Les barres representen les mitjanes \pm SEM (en C-F es troben expressades com el percentatge d'augment dels animals adults respecte als joves o dels vells respecte als adults segons correspongui), on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; $n = 4$ animals joves, 4 adults i 5 vells; en G i H s'han analitzat 200 miofibres per animal i múscul. Les línies discontinües verdes i morades (C-F) representen els valors de les mitjanes dels animals joves i adults, respectivament, representats com el 100 % i a partir dels quals s'han normalitzat la resta dels valors. Imatges representatives de talls transversals dels músculs tenyits amb hematoxilina-eosina capturades al microscopi òptic dels músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells (I-T).

4.3. Nuclis centrals

Tal com ha estat descrit en estudis anteriors, amb l'envelliment hi ha un augment del percentatge de miofibres amb nuclis localitzats centralment (Valdez *et al.*, 2010), el que és indicatiu d'un procés de degeneració i subseqüent regeneració (Folker & Baylies, 2013) (Revisió: Carlson, 1973).

En aquest estudi, es va veure que els animals joves pràcticament no presentaven fibres amb els nuclis centrals (Figura R-I-13 A i B-E), que els animals adults mostraven un lleuger augment d'aquest percentatge en els músculs TA, EDL i gràcil respecte als joves (Figura R-I-13 A i B vs F, D vs H i E vs I) i que els animals vells mostraven un percentatge encara superior en comparació amb els animals vells en els quatre músculs analitzats (Figura R-I-13 A i F vs J, G vs K, H vs L i I vs M).



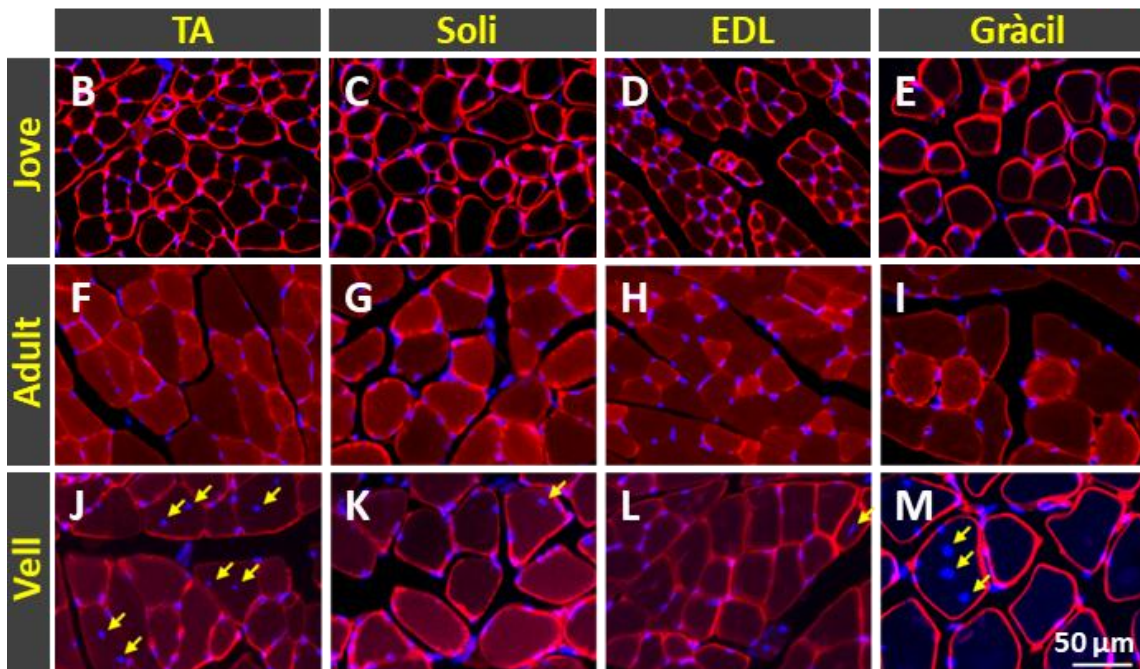


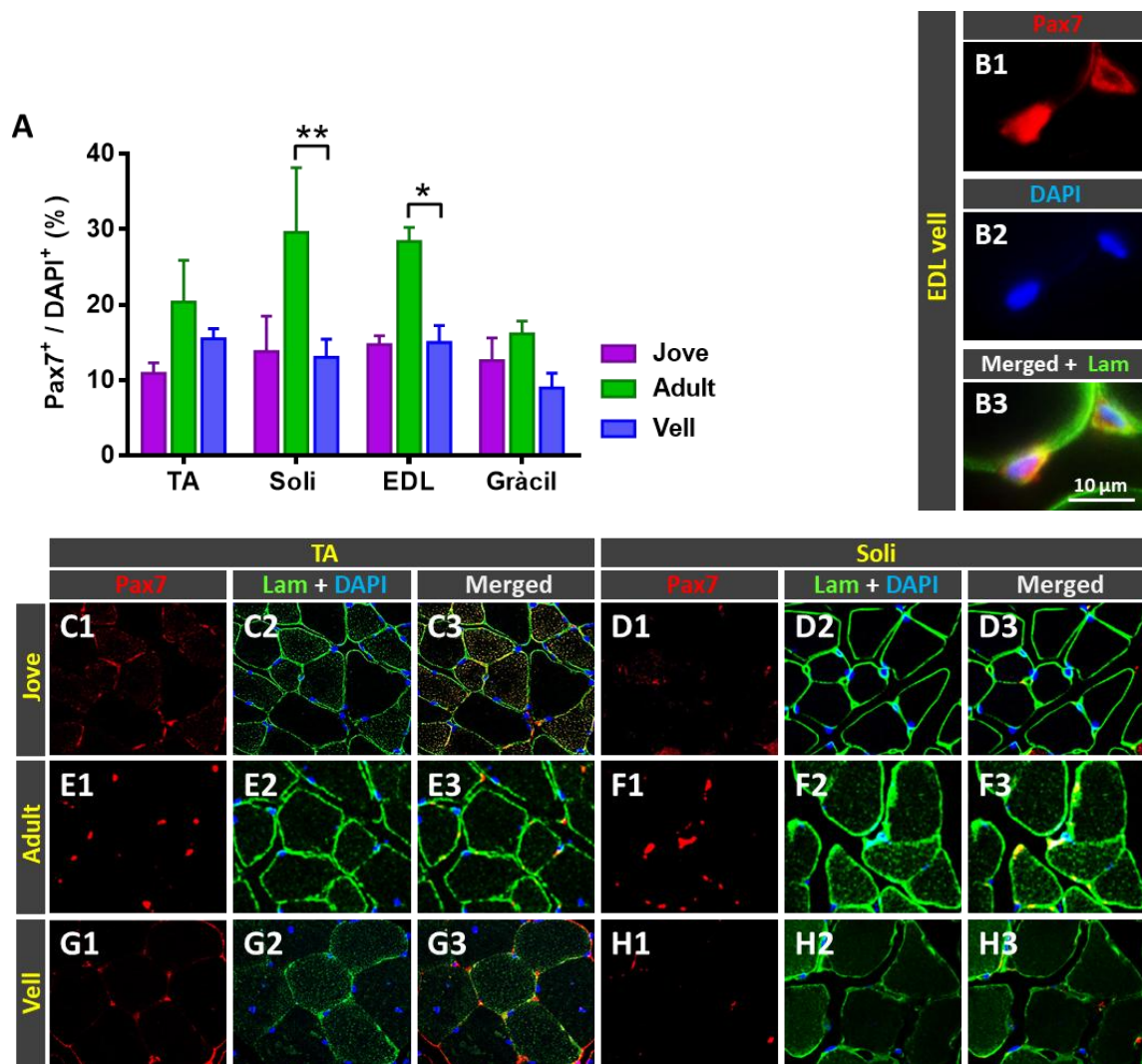
Figura R-I-13. Percentatge de miofibres amb nuclis centrals en els músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells (A). Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$; $n = 3000$ miofibres per animal i múscul de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges representatives de talls transversals dels músculs capturades al microscopi de fluorescència on s'observen les miofibres marcades amb laminina (vermell) junt amb DAPI (blau, per visualitzar els nuclis) en els músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells (B-M); les fletxes grogues assenyalen els nuclis localitzats centralment; el regle de calibratge (M, 50 μm) és vàlid per a les imatges B-M.

4.4. Cèl·lules satèl·lit (SCs)

Les SCs són un tipus de cèl·lules que es troben al múscul esquelètic i que intervenen en el procés de regeneració muscular (Sacco and Puri, 2015; Sousa-Victor *et al.*, 2015). S'ha descrit que, amb l'envelliment, hi ha una disminució del nombre d'SCs (Snow, 1977; Gopinath and Rando, 2008; Day *et al.*, 2011).

Per analitzar els canvis relacionats amb l'envelliment a les SCs, es va fer una tinció immunohistoquímica amb DAPI, per visualitzar el DNA, i laminina, per delimitar el perímetre de les fibres musculars, combinats amb Pax7, implicat en la proliferació de les cèl·lules precursors musculars i que ha estat utilitzat com a marcador de les SCs. Es va observar que els músculs dels animals adults

mostraven un percentatge més elevat d'SCs positives amb Pax7 en relació al nombre de nuclis positius amb DAPI quan es comparaven tant amb els animals joves com amb els vells (Figura R-I-14 A i E1-F3 vs C1-D3 i G1-H3), tot i que aquestes diferències només eren estadísticament significatives en els músculs soli i EDL quan es comparaven els animals vells amb els adults (Figura R-I-14 F1-F3 vs H1-H3 i K1-K3 vs M1-M3). Es mostren imatges representatives d'un EDL d'un animal vell a més augment on s'observa la colocalització dels nuclis de les SCs (marcades amb Pax7, en vermell) (Figura R-I-14 B1) i els nuclis marcats amb DAPI, en blau (Figura R-I-14 B2), junt amb la laminina (en verd) (Figura R-I-14 B3) per visualitzar el perímetre de la fibra muscular.



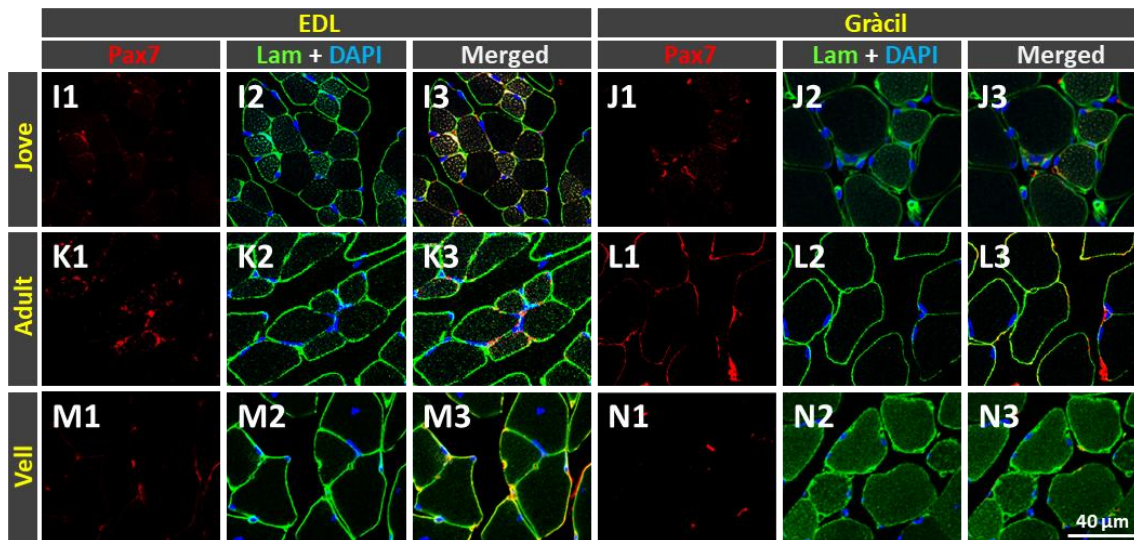


Figura R-I-14. Percentatge d'SCs (marcades amb Pax7) respecte al nombre de nuclis positius per DAPI en els músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells (A). Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; $n = 3000$ miofibres per animal i múscul de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. C1-L3) Imatges representatives de talls transversals dels músculs capturades al microscopi confocal on s'observen les SCs marcades amb Pax7 (vermell) i les miofibres marcades amb laminina (verd) junt amb DAPI (blau, per visualitzar els nuclis), en els músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells; B1-B3) imatges a major augment de la tinció amb Pax7 a l'EDL d'un animal vell; els regles de calibratge (B3, 10 μ m; N3, 40 μ m) són vàlids per a les imatges B1-B3 i C1-N3, respectivament.

4.5. Tipologia de fibres

En estudis previs realitzats amb rates, s'han observat canvis en el patró de la tipologia de fibres relacionats amb l'envelliment; s'ha descrit que hi ha una conversió de les fibres ràpides (de tipus 2) a lentes (de tipus 1), de manera que aquestes últimes superen en nombre les ràpides en els músculs dels animals vells (Pette and Staron, 2000; Schiaffino and Reggiani, 2011). Tal com ha estat descrit en estudis anteriors (Hämäläinen and Pette, 1993; Valdez *et al.*, 2012), en animals adults, el soli està format principalment per fibres de tipus 1 i 2A; l'EDL està format majorment per fibres de tipus 2B, tot i que també s'hi veu un petit percentatge de les de tipus 2A i, en menor nombre, de les de tipus 1; el TA també té una composició predominant en fibres de tipus 2B, mentre que les de tipus 2A són menys abundants i pràcticament no se n'observen de les de tipus 1; el gràcil, el múscul més proximal dels que s'ha analitzat en aquest estudi,

està format en major part per fibres de tipus 2A i, en segon lloc, de tipus 2B, amb una proporció menor de les de tipus 1.

Es va analitzar la composició de la tipologia de fibres (1, 2A i 2B) dels músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells mitjançant anticossos específics contra les diferents isoformes de l'MyHC (I, IIA i IIB, respectivament). Els músculs dels animals adults no van mostrar una composició de fibres molt diferent a la dels joves: només el soli i el gràcil van mostrar un percentatge de fibres de tipus 2A significativament inferior (Figura R-I-15 A i D2 vs F2 i J2 vs L2). Amb l'envelliment, però, hi ha una remodelació de la composició de les fibres. Pel que fa als músculs més distals (TA, soli i EDL) dels animals vells, es va observar que tots ells mostraven una disminució del nombre de fibres de tipus 2B (Figura R-I-15 B i E3 vs G3, F3 vs H3 i K3 vs M3), mentre que les de tipus 2A es trobaven en menor proporció als músculs TA i EDL (Figura R-I-15 B i E2 vs G2 i K 2 vs M2) i en major percentatge al soli (Figura R-I-15 B i F2 vs H2); a més, aquests tres músculs mostraven una reducció del nombre de fibres de tipus 1, tot i que aquest canvi només era estadísticament significatiu a l'EDL (Figura R-I-15 B i E1 vs G1, F1 vs H1 i K1 vs M1). En canvi, al múscul proximal gràcil es va veure que, en comparació amb els animals adults, els vells mostraven un augment del percentatge de fibres de tipus 1 i 2B (Figura R-I-15 B i L1 vs N1 i L3 vs N3) i una disminució de les de tipus 2A (Figura R-I-15 B i L2 vs N2).

Tot i que la majoria de les fibres musculars són pures, en els animals adults s'observa un nombre considerable de fibres híbrides; en estudis realitzats en rates s'ha descrit que almenys un 3 % de les de tipus 2A i un 10 % de les de tipus 2B ho són. Això podria explicar que al TA, per exemple, hi hagi un augment del percentatge de fibres de tipus 2A i 2B en els vells respecte als adults sense canvis del de les de tipus 1 o que a l'EDL fins i tot s'observi una disminució dels tres tipus de fibres en els animals vells en comparació amb els adults (Figura R-I-15 B). Aquests resultats difereixen dels obtinguts en estudis previs realitzats amb músculs esquelètics de rata, on s'ha descrit que, amb l'envelliment, el soli (de tipus lent) mostra un canvi de fibres de tipus 2A a tipus 1 i els músculs ràpids, de tipus 2B a tipus 2X (un tipus de fibres resistents que són intermèdies entre les de tipus 2A i 2B) (Larsson *et al.*, 1991, 1993).

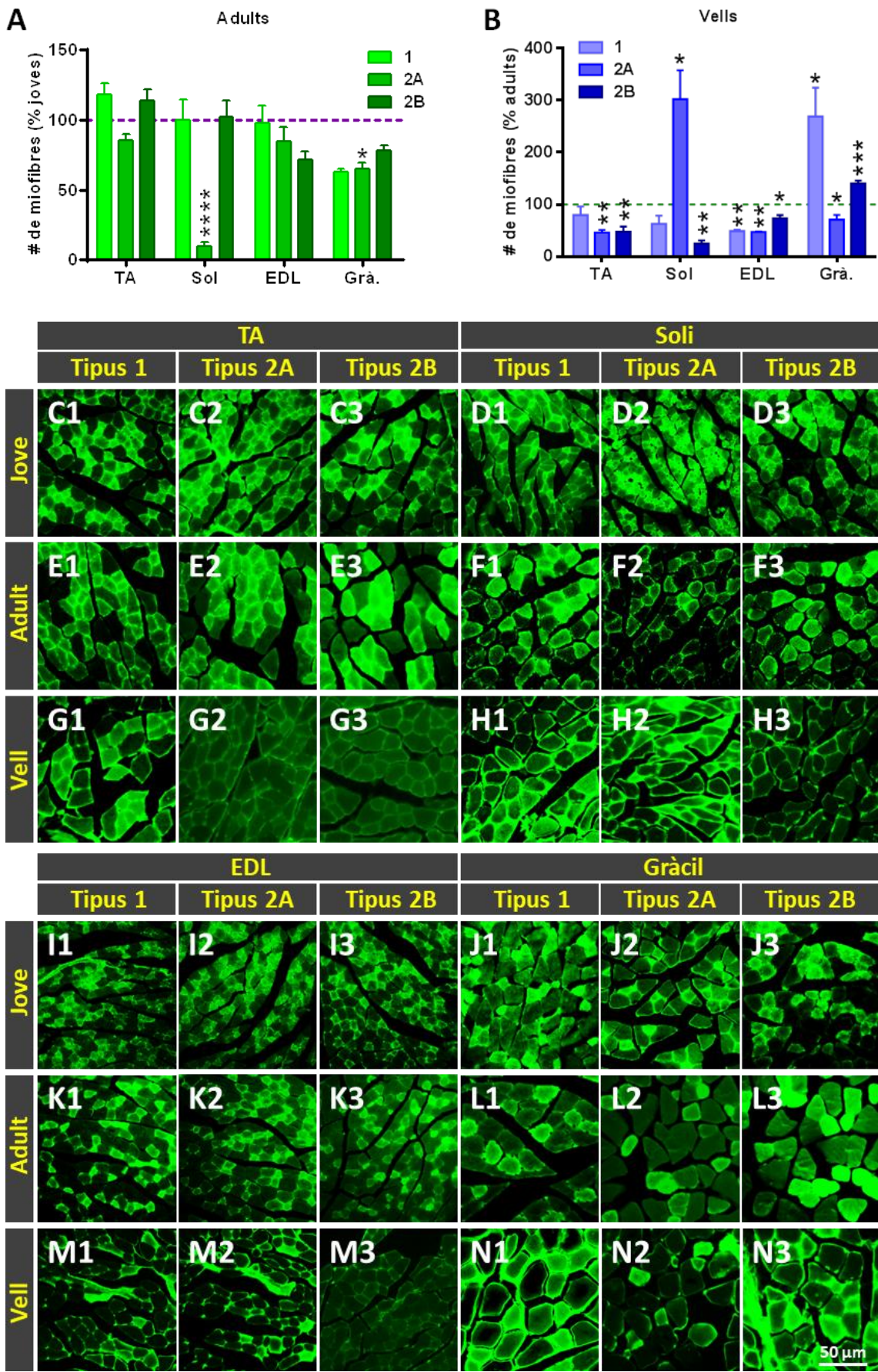


Figura R-I-15. Canvis en la composició de la tipologia de fibres en els músculs TA, soli, EDL i gràcil en animals joves, adults i vells (A i B). Les barres representen les mitjanes \pm

SEM de la proporció de fibres de tipus 1, 2A i 2B, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni, on * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; $n = 400-700$ miofibres per animal i múscul de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges representatives de talls transversals dels músculs (I1-N3) capturades al microscopi confocal on es mostren les tincions amb l'MyHC I (I-N [sufix 1]), IIA (I-N [sufix 2]) i IIB (I-N [sufix 3]), corresponents als tipus de fibres 1, 2A i 2B, respectivament (en verd) en els músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells; el regle de calibratge (N3, 50 μm) és vàlid per a les imatges I1-N3.

4.6. Lipofuscina

La lipofuscina, coneguda com el pigment de l'edat, consisteix en un cúmulo de material polimorf provinent de diferents estructures intracel·lulars que no es pot degradar i que ha estat autofagocitat, de manera que s'acumula en els lisosomes. Aquestes acumulacions semblen generar-se durant un procés d'estrès oxidatiu en què alguns compostos oxidats, principalment d'origen lipídic i proteic, són resistents a la hidròlisi per part dels enzims lisosomals (Brunk and Terman, 2002; Gray and Woulfe, 2005). La lipofuscina té propietats autofluorescents, de manera que es pot diferenciar de la resta de les estructures fluorescents en les immunotincions quan és excitada amb llums amb una certa longitud d'ona i és combinada amb certs filtres barrera (Terman *et al.*, 1999).

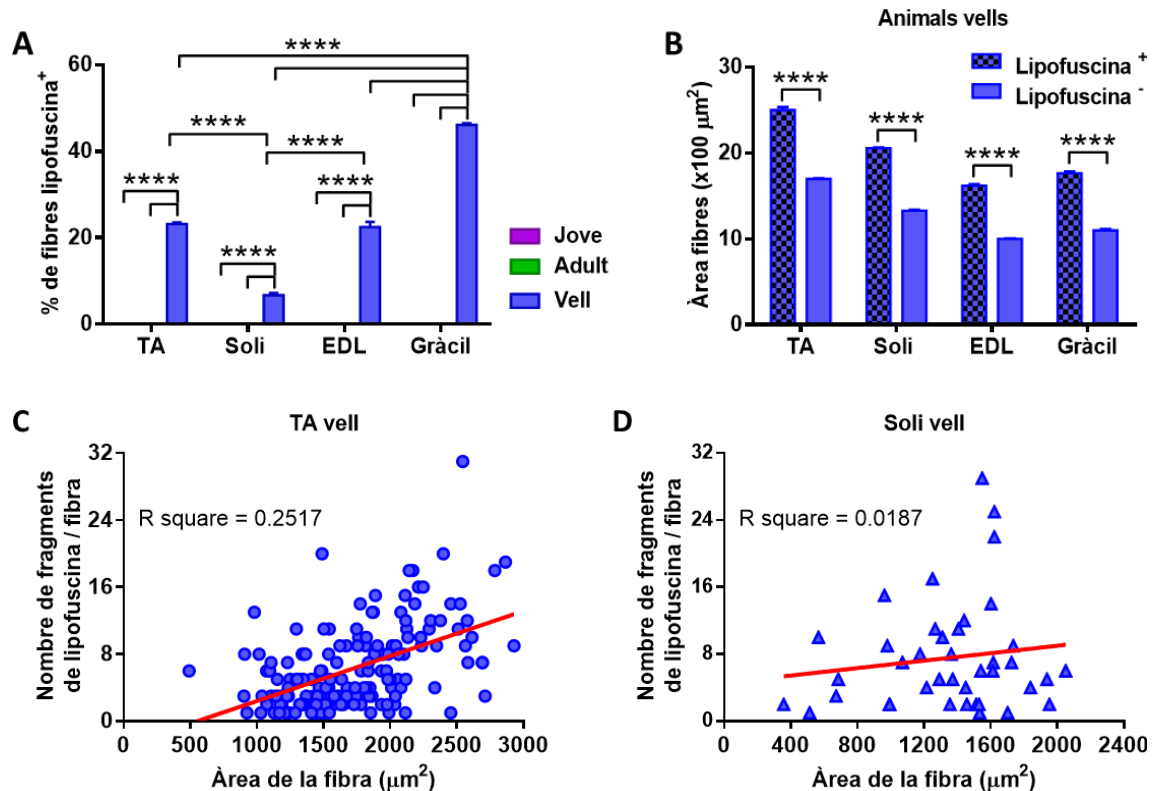
Es va analitzar el percentatge de fibres amb lipofuscina, així com el nombre de fragments en cada fibra. Es va veure que ni els animals joves ni els adults tenien fibres amb agregats de lipofuscina a cap dels quatre músculs analitzats (Figura R-I-16 A). En els animals vells, però, es van veure notables acumulacions d'agregats de lipofuscina en els quatre músculs (Figura R-I-16 A i G-J); el percentatge de fibres amb presència de lipofuscina era molt més elevat al múscul gràcil en comparació amb els altres tres músculs (Figura R-I-16 A i J vs G, H i I) i considerablement menor al soli (Figura R-I-16 A i H vs G, I i J), que és un múscul de contracció lenta.

Després d'haver vist que els agregats de lipofuscina no es trobaven distribuïts de manera uniforme en les fibres que en tenien (algunes d'elles, però, no contenien cap fragment), es va analitzar si hi havia alguna relació entre aquelles fibres que presentaven agregats i la seva mida, el tipus de fibres i/o la

presència o absència de nuclis centrals. Es va veure que, en els quatre músculs analitzats en els animals vells, les fibres que contenien agregats de lipofuscina eren més gruixudes que aquelles que no en contenien (Figura R-I-16 B i G-J); també es va poder establir una relació directament proporcional entre el nombre de fragments presents en cada fibra i l'àrea transversal de les fibres, essent aquesta relació més directa al múscul TA que en els altres tres (Figura R-I-16 C, D, E i F i G-J).

A continuació, es va analitzar la relació entre l'acumulació de lipofuscina i el tipus de fibres al TA dels animals vells. Es va veure que el percentatge de fibres amb presència de lipofuscina era significativament inferior a les fibres de tipus 1 en comparació amb les de tipus 2A i 2B (Figura R-I-16 K).

Pel que fa a la presència de nuclis centrals, es va veure que al TA dels animals vells era en aquestes fibres -en les que presenten nuclis al seu interior- on s'observa un major percentatge de fibres amb agregats de lipofuscina, essent estadísticament superior en comparació amb el de les fibres amb nuclis perifèrics (Figura R-I-16 L i M1 i M2).



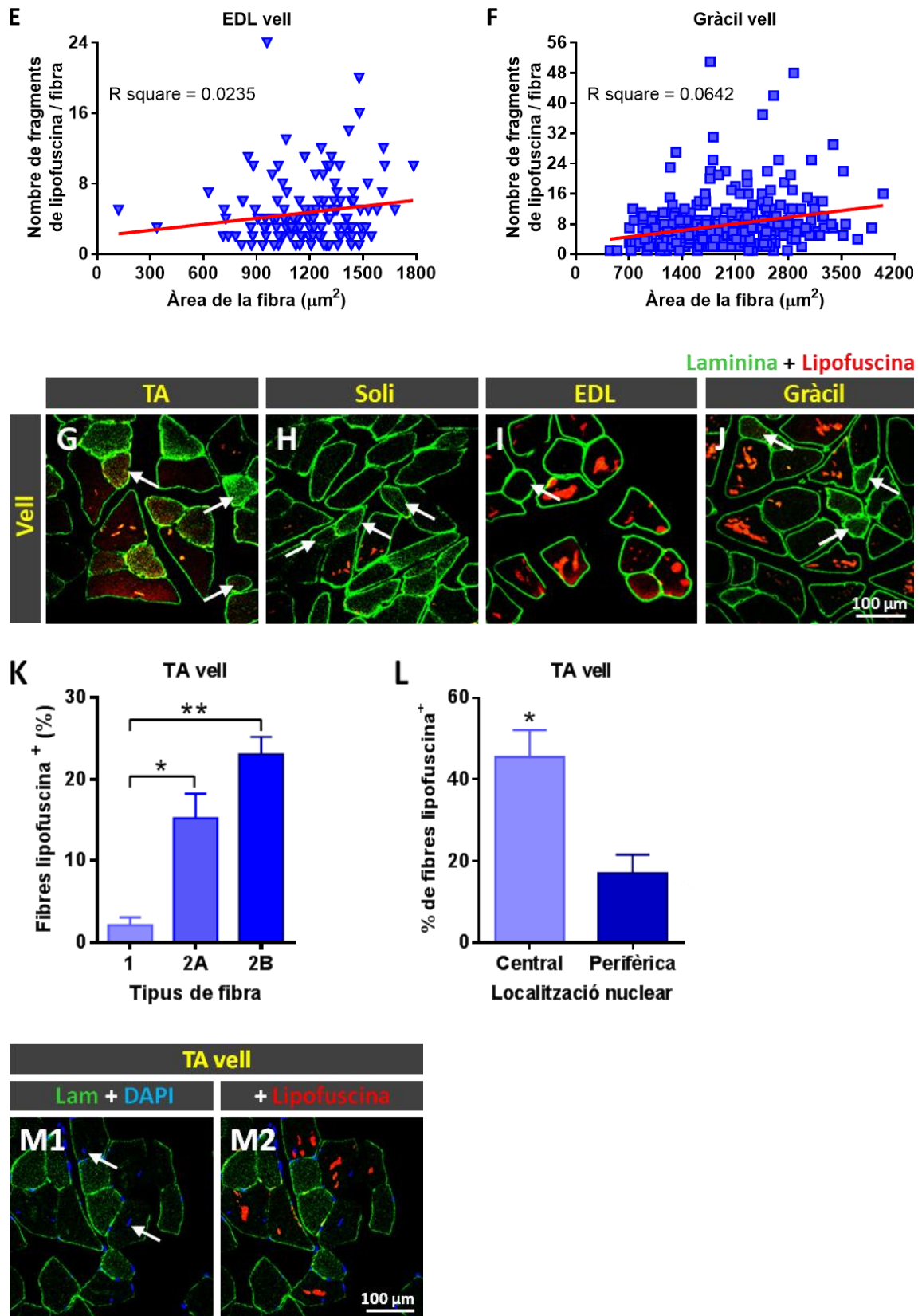


Figura R-I-16. Canvis en l'acumulació de lipofuscina relacionats amb l'envelliment. Percentatge de fibres amb grànuls de lipofuscina (A), àrea dels talls transversals (en μm^2) de les miofibres amb o sense agregats de lipofuscina (B), correlació entre l'àrea de les fibres amb grànuls de lipofuscina i el nombre d'agregats (C-F), percentatge de fibres

amb fragments de lipofuscina a les fibres de tipus 1, 2A i 2B (K), percentatge de fibres amb cúmuls de lipofuscina en fibres amb nuclis centrals o perifèrics al múscul TA d'animals vells (L). Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test post hoc de Bonferroni o en el *t*-test, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$; $n = 400-700$ miofibres per animal i múscul de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges representatives de talls transversals dels músculs TA, soli, EDL i gràcil d'animals joves, adults i vells capturades al microscopi confocal on es mostren les immunotincions amb laminina (en verd), junt amb DAPI (blau, ver visualitzar els nuclis) (G-J); l'autofluorescència de la lipofuscina es manifesta a l'excitar-la a 510-560 nm i aplicant-hi filtres d'emissió de 590 nm; les fletxes assenyalen les fibres amb una àrea menor, on no s'observen fragments de lipofuscina (G-J), i els nuclis centrals (M1 i M2), presents en les fibres on es pot veure una major acumulació de grànuls de lipofuscina; els regles de calibratge (J, 100 μ m i M2, 100 μ m) són vàlids per a les imatges G-J i M1-M2, respectivament.

4.7. Mitocondri

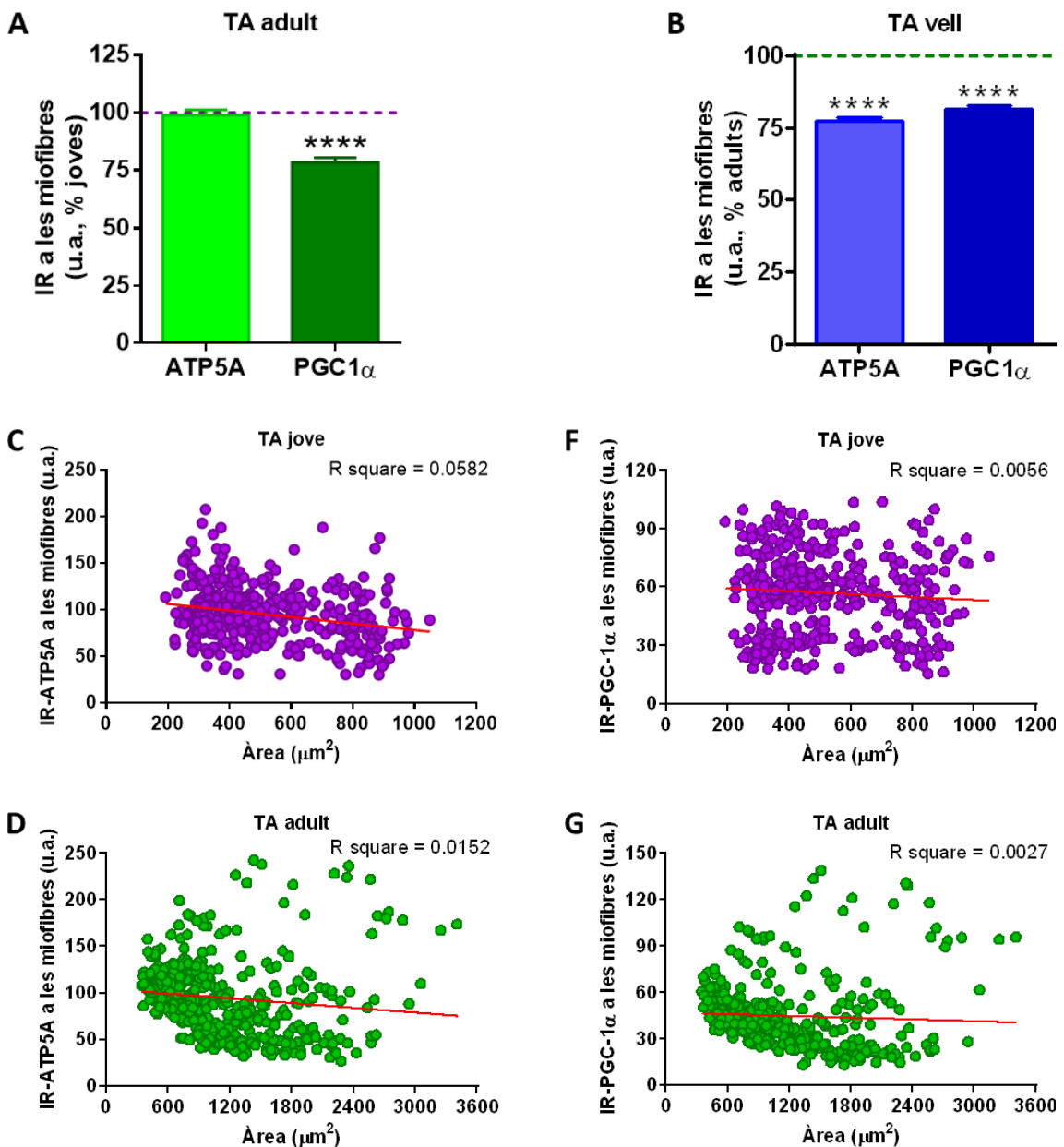
Ha estat descrit que el PGC-1 α , a part de promoure la biogènesi mitocondrial, regula el metabolisme de les miofibres, l'autofàgia i l'expressió de diverses proteïnes que estan implicades en el manteniment de les NMJs (Schiaffino *et al.*, 2013; Gonzalez-Freire *et al.*, 2014; Tintignac *et al.*, 2015; Taetzsch and Valdez, 2018; Lepore *et al.*, 2019); s'ha vist que tant els nivells d'mRNA com de proteïna de PGC-1 α es troben reduïts en els músculs dels animals vells, el que es tradueix en una disminució de la funció mitocondrial (Ling *et al.*, 2004; Wenz *et al.*, 2009; Rygiel *et al.*, 2016).

D'altra banda, s'ha descrit que l'ATP5A està implicada en l'augment de calci intracel·lular que provoca l'activació de la via mTOR, un mecanisme canònic de longevitat (Schiaffino *et al.*, 2013).

Així doncs, es van analitzar els nivells d'expressió de PGC-1 α i d'ATP5A al TA d'animals joves, adults i vells. Es va observar que els animals adults mostraven menors nivells d'expressió de PGC-1 α en comparació amb els animals joves (Figura R-I-17 A i L2-L4 vs M2-M4) (sense canvis en l'expressió d'ATP5A [Figura R-I-17 A i L1, L3 i L4 vs M1, M3 i M4]) i que ambdues proteïnes es veien encara més reduïdes en els animals vells en comparació amb els adults (Figura R-I-17 B i M1-N4).

A més, durant l'anàlisi, es va veure que el marcatge, tant del PGC-1 α com de l'ATP5A, no es distribuïa de manera uniforme entre totes les fibres. Es va analitzar si hi havia una relació entre la intensitat de marcatge i la mida de les fibres i es va observar que, sobretot en els animals vells, hi havia un major marcatge a les fibres més petites tant de PGC-1 α (Figura R-I-17 C-E i L3) com d'ATP5A (Figura R-I-17 F-H, i N1).

Finalment, es va comprovar si el marcatge d'ambdues proteïnes es donava en les mateixes fibres i es va veure que hi havia una alta correlació entre el marcatge per PGC-1 α i per ATP5A en una mateixa fibra en els tres grups d'edat (Figura R-I-17 I-K i L1-N4).



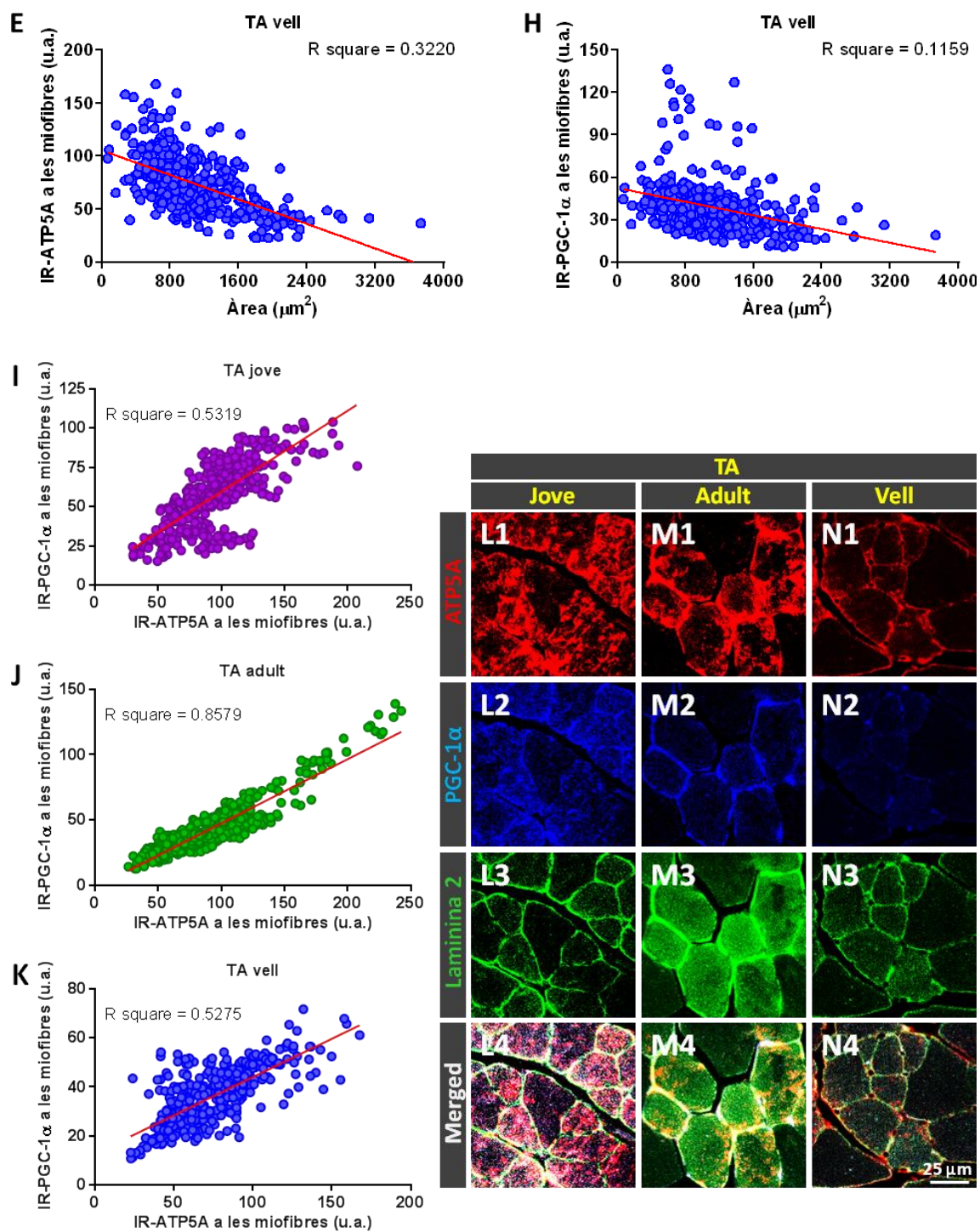


Figura R-I-17. Percentatges dels nivells d'expressió de PGC-1 α i d'ATP5A a les miofibres del múscul TA dels animals adults respecte als joves (A) i dels vells respecte als adults (B). Correlació entre els nivells d'expressió de PGC-1 α (C-E) o d'ATP5A (F-H) i la mida de les miofibres al múscul TA d'animals joves, adults i vells. Correlació entre els nivells d'expressió de PGC-1 α i d'ATP5A al múscul TA d'animals joves (I), adults (J) i vells (K). Les barres en A i B representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el *t*-test, on *****p* < 0,0001; els punts en C-E i en F-H representen els nivells d'expressió de PGC-1 α o d'ATP5A, respectivament, de cada

miofibra segons la seva àrea i les línies vermelles representen la correlació (segons l'*R square*) entre aquests dos paràmetres; els punts en I-K representen els nivells d'expressió de PGC-1 α i d'ATP5A de cada miofibra, les línies vermelles representen la correlació (segons l'*R square*) entre aquests dos paràmetres; n = 100 miofibres per animal i múscul de 4 animals joves, 4 adults i 5 vells. Imatges representatives de talls transversals del múscul TA d'animals joves (L1-L4), adults (M1-M4) i vells (N1-N4) capturades al microscopi confocal on es mostren les immunotincions amb ATP5A (en vermell), PGC-1 α (en blau) i laminina (en verd); el regle de calibratge (N4, 25 μ m) és vàlid per a les imatges L1-N4.

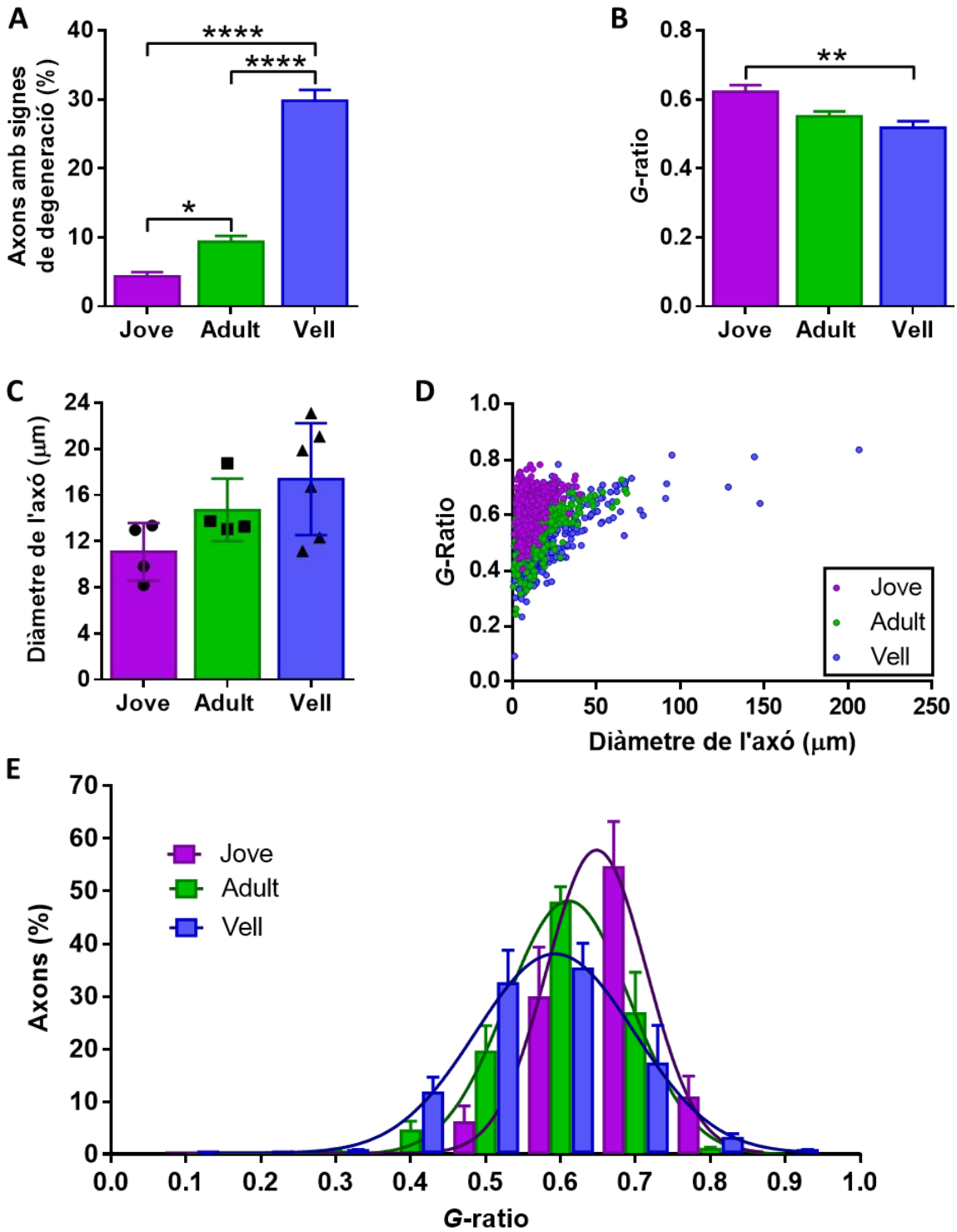
4.8. Canvis al nervi ciàtic durant els processos de maduració i envelliment

Es van analitzar els nervis ciàtics per tal de descriure les possibles alteracions estructurals dels seus axons amb l'edat.

Es va observar que en els animals adults hi havia un augment estadísticament significatiu del percentatge d'axons amb signes de degeneració en comparació amb els joves i que aquest percentatge encara era considerablement superior en els animals vells (Figura R-I-18 A); en alguns casos, es tractava d'estructures electrodenses a l'interior de l'axó (Figura R-I-18 I), mentre que en d'altres, es van observar axons amb discontinuïtats (Figura R-I-18 J) o engruïments (Figura R-I-18 K) en la beina de mielina, hi presentaven plecs (Figura R-I-18 L), inclusions de mielina a l'interior de l'axó (Figura R-I-18 M) o una beina de mielina en doble capa (Figura R-I-18 N).

Després d'haver observat que les beines de mielina no tenien un gruix uniforme entre els diferents axons, es va decidir calcular-ne la *G-ratio*, que consisteix en la ràtio entre el diàmetre intern de l'axó i el seu diàmetre extern, mielinitzat; així doncs, com menor és la *G-ratio*, més gruixuda és la beina de mielina.

Al mesurar la *G-ratio*, es va veure que aquesta era menor com més edat tenien els animals (Figura R-I-18 B i E). També es va mesurar el diàmetre dels axons (incloent la beina de mielina) i es va veure que aquest es veia augmentat amb l'edat dels animals (Figura R-I-18 C). Com es pot observar a la Figura R-I-18 D, en els tres grups d'edat, aquells axons amb diàmetres més grans són també els que tenen unes *G-ratios* majors, amb alguns axons extremadament grans i també amb *G-ratios* elevades en el cas dels animals vells (Figura R-I-18 D).



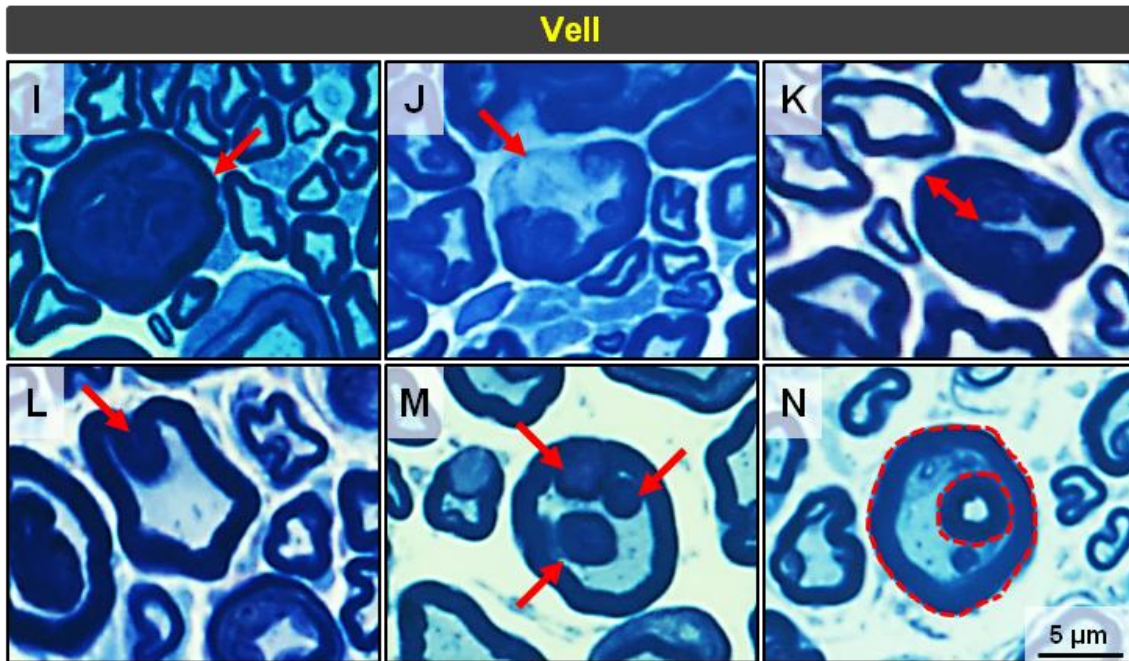


Figura R-I-18. Canvis en els nervis ciàtics relacionats amb la maduració i l'envelliment. Percentatge d'axons amb signes de degeneració (A), anàlisi de la G-ratio dels axons (B), diàmetre dels axons (C, en μm), G-ratio dels axons en relació al seu diàmetre (D, en μm) i freqüència relativa de les G-ratio (E). Les barres en A, B, C i E representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el *t*-test, on $*p < 0,01$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$; els punts en D representen el diàmetre de cada axó segons la seva G-ratio; $n = 900 - 2000$ axons procedents de 10 imatges capturades per cada animal, en 4 animals joves, 4 adults i 6 vells (A) i 4 animals joves, 4 adults i 6 vells dels quals s'han analitzat un total de 100 axons per cada animal procedents de 10 imatges diferents (B-E). I-N) matges representatives de talls transversals dels nervis ciàtics d'animals joves, adults i vells capturades al microscopi òptic (F-H) on les fletxes vermelles assenyalen els axons amb signes de degeneració; imatges a major augment representatives de talls transversals dels nervis ciàtics d'animals vells capturades al microscopi òptic mostrant diferents signes de degeneració, on les fletxes vermelles assenyalen un axó amb estructures electrodenses al seu interior (I), una beina de mielina fragmentada (J), amb un engruïment (K) o amb un plec (L), un axó amb inclusions de mielina al seu interior (M) i un axó amb una doble beina de mielina (N); els regles de calibratge (H, $10 \mu\text{m}$; N, $5 \mu\text{m}$) són vàlids per a les imatges F-H i I-N, respectivament.

RESULTATS. CAPÍTOL II

**EFFECTE DE DIETES
SUPLEMENTADES AMB
CACAU O AMB TE VERD
SOBRE ELS CANVIS
REGRESSIUS QUE TENEN
LLOC EN EL SISTEMA
NEUROMUSCULAR DEL
RATOLÍ DURANT
L'ENVELLIMENT**

1. El te verd i el cacau augmenten la supervivència, però no eviten l'empitjorament de les habilitats motores relacionat amb l'envelliment

A partir de P651 (equivalent a 93 setmanes o a 21 mesos d'edat), els animals van ser alimentats amb una dieta estàndard (AIN93-M, grup control), o amb la dieta AIN93-M suplementada amb te verd o amb cacau (grups te verd i cacau, respectivament). Les dietes es van estendre fins a P805 (setmana 116 o 27 mesos d'edat), moment en què es van sacrificar els animals per a l'obtenció de mostres.

1.1. Pes corporal

Es va fer un seguiment mensual del pes dels ratolins des del moment de la seva arribada, a P637, fins al punt final, P805. Els animals del grup control no van mostrar canvis estadísticament significatius en el seu pes corporal durant tot el seguiment; en canvi, els animals del grup te verd van mostrar una disminució significativa del seu pes, sobretot a partir de P749; els animals del grup cacau també van mostrar una lleugera disminució de pes a P805 (Figura R-II-1 A).

1.2. Consum de pinso

Per tal de poder concloure si els possibles canvis observats en el pes al llarg del temps o bé entre els tres grups eren deguts o no a diferències en el consum de pinso, se'n va fer un seguiment setmanal per a cada ratolí. Es va veure que els animals dels grups del te verd i del cacau van seguir un consum estable al voltant dels 18-20 g setmanals per animal, mentre que els del grup control van mostrar un consum significativament superior (20-23 g) als de les dietes suplementades entre P749 i P770 (Figura R-II-1 B).

1.3. Supervivència

Pel que fa a la supervivència, el grup control va mostrar una mitjana de 762 dies, arribant al punt final (P816) amb un 33 % de supervivència (5 dels 15 ratolins); pel que fa als grups te verd i cacau, els ratolins van arribar al punt final amb unes supervivències del 66,7 % (10 dels 15 ratolins) i del 73,3 % (11 dels 15 ratolins), respectivament (Figura R-II-1 C). No es van veure signes patològics ni diferències a nivell de fenotip entre els ratolins dels diferents grups que poguessin explicar aquesta variabilitat entre les seves supervivències.

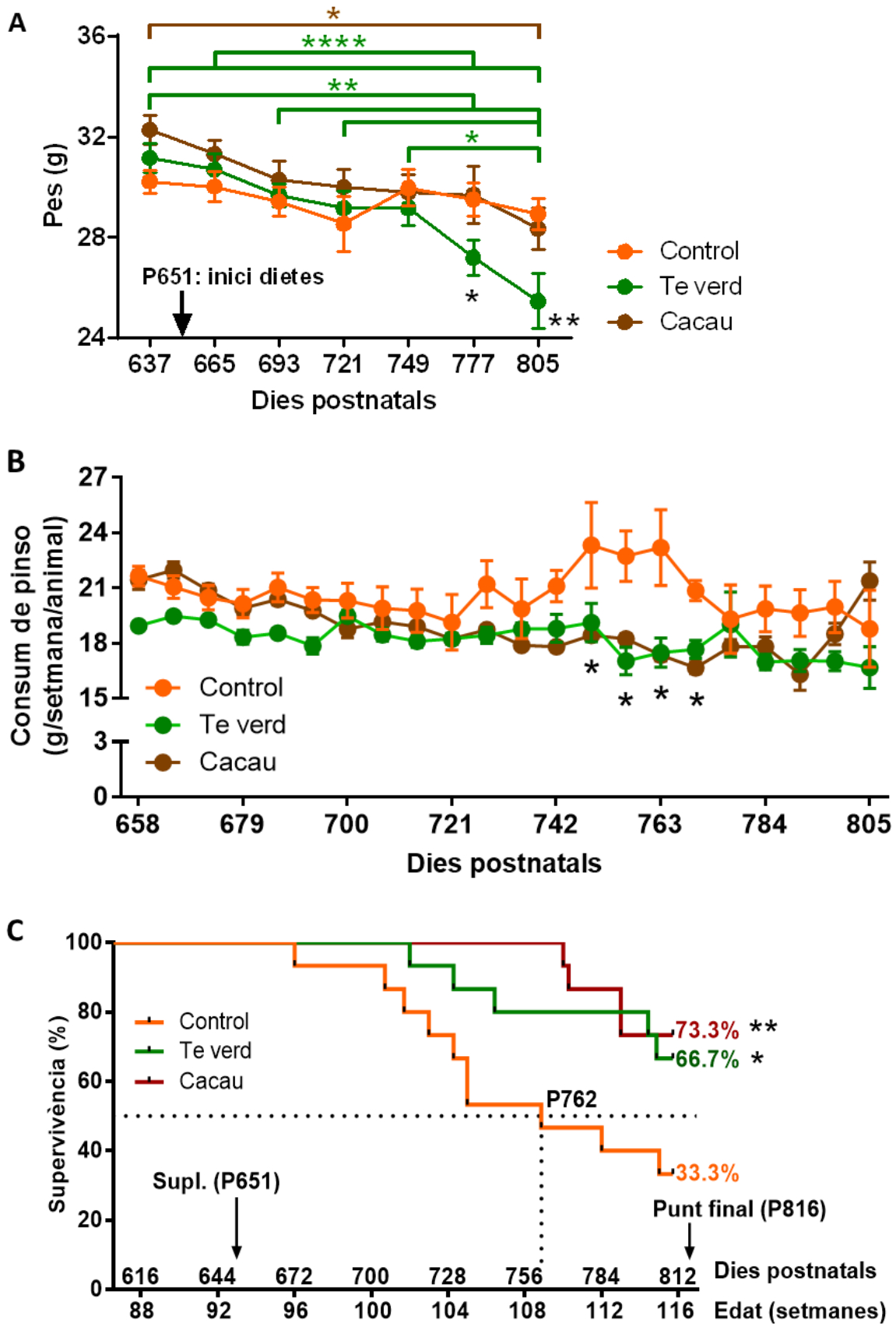


Figura R-II-1. Pes corporal (en g) dels animals des de P367 fins a P805 (A). Ingesta setmanal de pinso (B, expressada en g) per animal. Supervivència dels ratolins control (en taronja) i dels grups te verd (en verd) i cacau (en marró) a partir de P616 i durant els

següents 7 mesos (C). En A i B, els punts representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs (negres, verds i marrons) indiquen les diferències significatives (del te verd o del cacau respecte al control i dels grups te verd o cacau al llarg del temps, respectivament) basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $****p < 0,0001$; $n = 15$ animals per grup al punt inicial. En C, els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *Gehan-Breslow-Wilcoxon*, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; $n = 15$ animals per grup al punt inicial.

1.4. Proves motores

Al capítol I dels resultats, s'ha descrit l'existència d'una reducció de l'activitat motora amb l'envelliment. Després d'haver vist que ni amb el *grid stepping* ni amb el *rotarod* no es van observar diferències significatives entre els tres grups d'edat, no es van realitzar aquests tests a l'hora d'estudiar l'impacte dels suplementes dietètics sobre l'activitat motora dels animals. Així doncs, es van analitzar els efectes de la suplementació amb te verd o amb cacau sobre l'activitat motora mitjançant la realització dels tests *pen test* i *open-field* un cop cada quatre setmanes al llarg de tot el període de dietes.

Amb el *pen test*, es va comprovar quant de temps els animals eren capaços de mantenir-se agafats a un ferro de 2 mm de diàmetre (es va utilitzar un penjador); la prova es va repetir 3 vegades amb un descans de 15 min entre repeticions i es va anotar el millor temps dels 3 intents amb un màxim d'1 min.

Es va veure que amb el *pen test* no hi havia diferències significatives en la realització de la prova entre els tres grups i que els diferents animals tenien comportaments molt diferents, fet que, juntament amb la disminució progressiva del nombre d'animals cap als punts finals, va fer que les mitjanes tinguessin unes desviacions grans i que, per tant, les diferències no fossin estadísticament significatives; només s'observa una discreta millora en la realització del test per part del grup cacau respecte al control a les 103 setmanes; aquesta diferència és, però, deguda a un empitjorament per part dels controls i no pas per una millora en el grup cacau (Figura R-II-2).

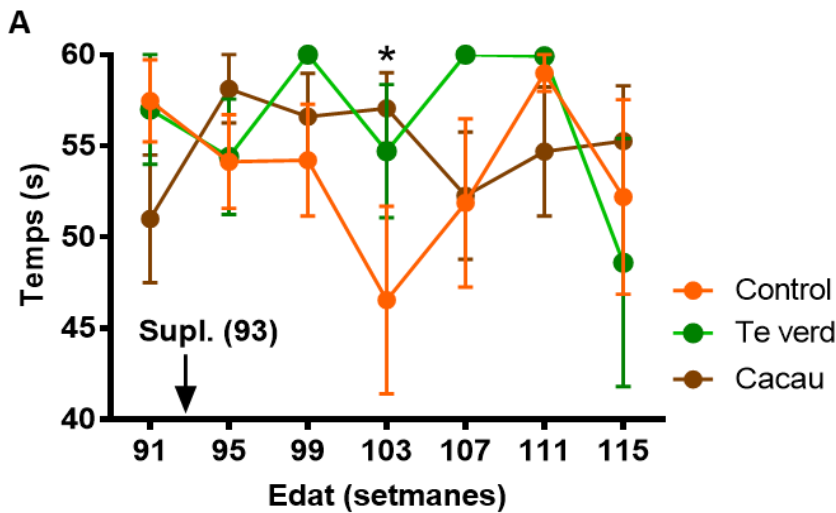


Figura R-II-2. *Pen test* en animals dels grups control, te verd i cacau. Els punts representen les mitjanes del temps (en s) \pm SEM del millor de tres intents fins a un màxim de 60 s; l'asterisc indica la diferència significativa entre el grup cacau respecte al control basada en el test *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $*p < 0,05$; $n = 15$ animals per grup al punt inicial.

Al capítol I s'ha pogut observar que l'*open-field* reflecteix un empitjorament de l'activitat locomotora amb l'envelliment. En aquest segon capítol, es pot veure que tant els controls com els grups de les dues dietes mostraven un empitjorament en tots els paràmetres analitzats a mesura que es repetia el test al llarg dels mesos (Figura R-II-3: nombre d'entrades a les diferents zones [Figura R-II-3 A], distància recorreguda [Figura R-II-3 B], percentatge del nombre d'entrades [Figura R-II-3 C] i del temps [Figura R-II-3 D] a les zones centrals, velocitats mitjana [Figura R-II-3 E] i màxima [Figura R-II-3 F], nombre de *rearings* [Figura R-II-3 G] i de *groomings* [Figura R-II-3 H]). No es van veure millores en els grups te verd o cacau respecte als controls; fins i tot, en algunes mesures, es va observar un cert empitjorament en els grups de les dietes suplementades respecte als controls als punts finals (Figura R-II-3 A, B, E i F).

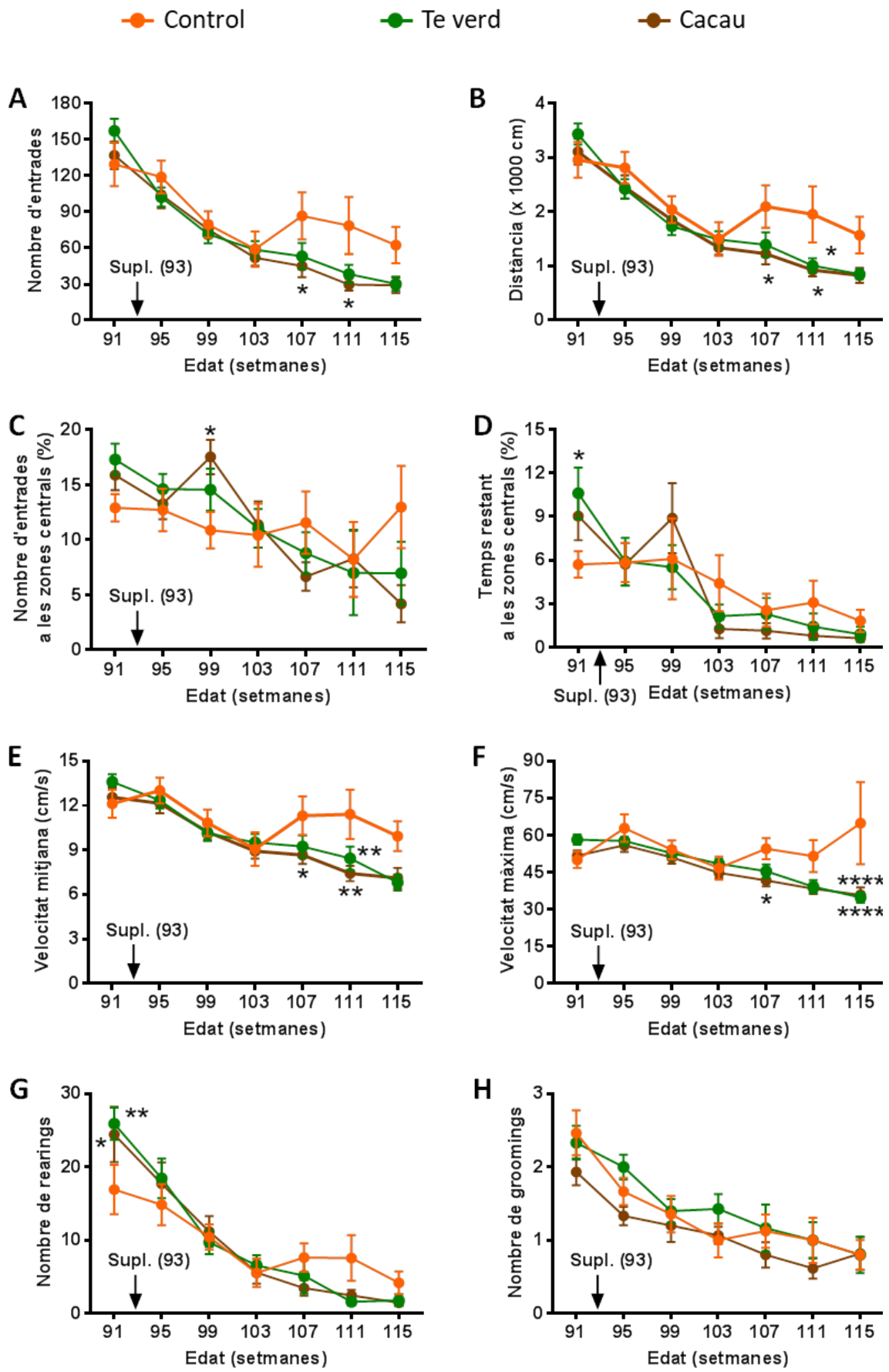


Figura R-II-3. *Open-field test* en animals dels grups control, te verd i cacau. Es van mesurar el nombre d'entrades (A), la distància (B, en cm), els percentatges del nombre d'entrades (C) i del temps (D) a les zones centrals, les velocitats (en cm/s) mitjana (E) i màxima (F) i el nombre de *rearings* (G) i de *groomings* (H). Els punts representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives del te verd o el cacau respecte al control basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; $n = 15$ animals per grup al punt inicial.

2. Ni el te verd ni el cacau són capaços de millorar els canvis electrofisiològics relacionats amb l'envelliment

Tal com s'ha mostrat al capítol I, hi ha una sèrie de canvis electrofisiològics lligats a l'envelliment com ara una reducció de la velocitat de conducció (reflectida amb un augment del temps de latència) i una reducció de l'amplitud del CMAP (a causa d'una disminució de la MUNE i de l'SMUA de les unitats motores). En aquest segon capítol, es va examinar si els suplementes dietètics basats en te verd o cacau eren capaços de revertir o pal·liar aquests canvis electrofisiològics relacionats amb l'envelliment.

Les proves es van realitzar en animals vells (de 24 mesos d'edat) després d'haver seguit 5 mesos de dieta estàndard o suplementada amb te verd o amb cacau. Cap de les dues dietes suplementades va provocar canvis significatius ni en la latència ni en l'amplitud del CMAP. Tot i que la latència de l'ona H no va resultar estadísticament diferent entre els tres grups, els animals alimentats amb la dieta suplementada amb cacau van mostrar uns valors inferiors als del grup control per a la ràtio H/M, essent més semblants als dels animals joves-adults. A més, ambdós suplementes van provocar un augment (tot i no ser estadísticament significatiu) de la MUNE del TA en comparació amb el grup control, el que significa que hi havia un augment del nombre d'unitats motores en aquest múscul (Taula R-II-1).

Paràmetre	Control	Te verd	Cacau
Latència del TA (ms)	1.55 ± 0.08	1.52 ± 0.03	1.48 ± 0.02
Latència del PL (ms)	2.44 ± 0.19	2.64 ± 0.07	2.34 ± 0.10
CMAP del TA (mV)	50.5 ± 2.7	47.0 ± 4.9	53.4 ± 4.7
CMAP del PL (mV)	4.60 ± 0.55	4.22 ± 0.75	4.80 ± 0.58
MUNE del TA	40.8 ± 1.5	44.5 ± 2.6	44.9 ± 0.7
SMUA (mV)	1.20 ± 0.08	1.01 ± 0.04	1.18 ± 0.12
CNAP de l'NDg (µV)	29.1 ± 1.8	31.0 ± 5.4	32.0 ± 4.7
Latència de l'ona H al PL (ms)	6.92 ± 0.40	7.51 ± 0.36	6.52 ± 0.21
Ràtio H/M del PL (%)	32.1 ± 3.6	28.0 ± 8.8	17.8 ± 3.3
Latència de l'NDg (ms)	1.39 ± 0.06	1.29 ± 0.07	1.32 ± 0.05
Pes (g)	29.7 ± 0.7	25.1 ± 1.3	27.8 ± 0.9

Taula R-II-1. Resultats dels tests de conducció nerviosa motors i sensorials en animals vells seguint una dieta control o suplementada amb te verd o amb cacau. Les dades representen les mitjanes ± SEM; l'anàlisi estadística s'ha realitzat amb el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni; n = 7 animals control, 5 del grup te verd i 5 del grup cacau. TA: múscul tibial anterior; PL: múscul plantar interossi; CMAP: potencial d'acció muscular compost; MUNE: estimació numèrica de la unitat motora; SMUA: amplitud d'una sola unitat motora; CNAP: potencial d'acció nerviós compost; NDg: 4t nervi digital.

3. Les dietes suplementades amb te verd i amb cacau prevenen la denervació muscular i milloren les alteracions regressives que es donen en les NMJs durant l'envelliment

Estudis previs realitzats en rosegadors han descrit que les NMJs dels músculs esquelètics experimenten alteracions estructurals i moleculars amb l'envelliment (Valdez *et al.*, 2010, 2012; Chai *et al.*, 2011; Willadt *et al.*, 2016; Blasco *et al.*, 2020). Al nostre grup, s'havia vist que un alt percentatge d'NMJs dels animals vells mostraven signes de denervació i poliinnervació, un augment en la complexitat de les seves ramificacions i la presència d'*sprouting* als terminals nerviosos. A més, els terminals postsinàptics mostraven fragmentacions en les plaques motores, amb una gran dispersió de fragments d'AChR, els quals es troben associats amb estructures pre-sinàptiques positives amb les immunotincions per a NF i VAcHT. En canvi, en les NMJs

dels ratolins joves s'observen zones postsinàptiques més homogènies, amb una morfologia més uniforme.

En aquesta part de l'estudi, es va voler analitzar si aquests canvis relacionats amb l'envelliment es podien prevenir amb la suplementació amb te verd o amb cacau. Es van realitzar immunotincions dobles amb anticossos contra NF i SV2, per tal de visualitzar el terminal nerviós pre-sinàptic, combinats amb α -Bgtx, per tal de localitzar la zona postsinàptica.

3.1. Àrea de les NMJs

No es van veure canvis significatius en la mida de les plaques motores amb la suplementació amb cacau, però les NMJs dels músculs TA i soli del grup te verd tenien una àrea significativament superior a les dels animals control (Figura R-II-4 A i I2 i J2 vs. H2 per al TA i L2 i M2 vs. K2 per al soli).

3.2. Innervació de les NMJs

Pel que fa al grau d'innervació, es va veure que amb les dues dietes hi havia un augment del percentatge de plaques motores monoinnervades, excepte en el cas del TA per al grup te verd, on es va veure un augment de la poliinnervació (Figura R-II-4 B i I1-J3 vs. H1-H3 per al TA i L1-M3 vs. K1-K3 per al soli). Per altra banda, els dos suplementes van provocar una disminució estadísticament significativa del percentatge de plaques denervades o parcialment innervades observades en els músculs dels animals vells, amb un augment del percentatge d'NMJs amb un major grau d'innervació (Figura R-II-4 C i I1-J3 vs. H1-H3 per al TA i L1-M3 vs. K1-K3 per al soli).

3.3. Fragmentació de les NMJs

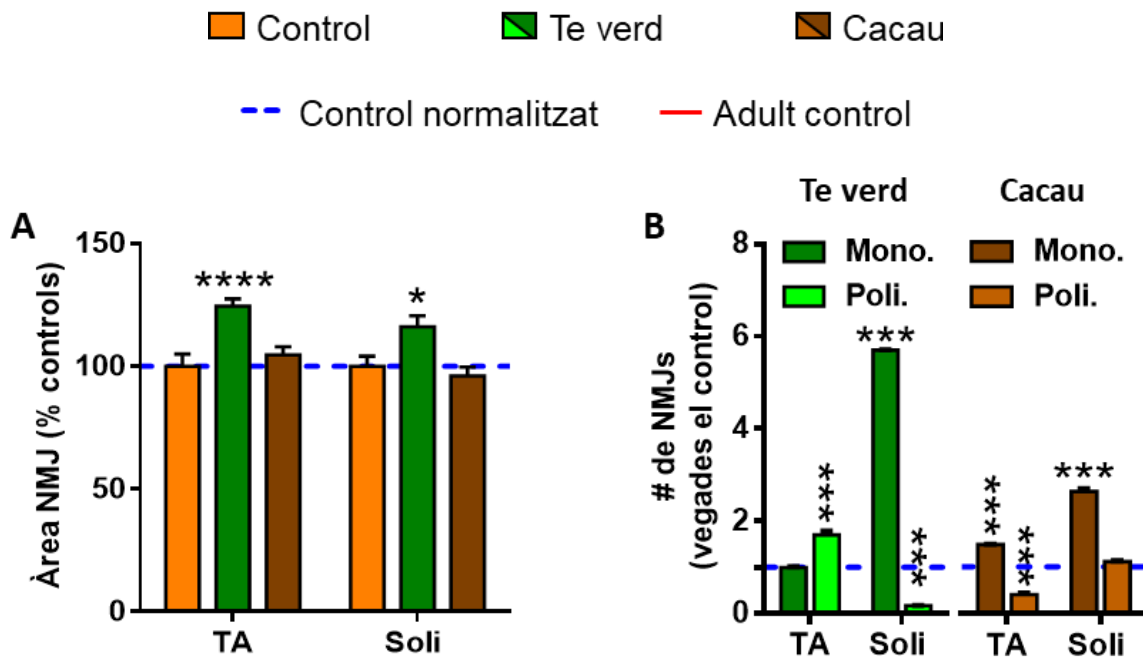
A més, els animals que van rebre la dieta suplementada amb te verd o amb cacau també van mostrar un menor percentatge de plaques motores fragmentades als músculs TA i soli respecte als animals control (Figura R-II-4 D i I1-J3 vs. H1-H3 per al TA i L1-M3 vs. K1-K3 per al soli). En canvi, el nombre de fragments que presentava cada placa es va mostrar invariable entre els tres grups, només amb una lleugera disminució en el nombre de fragments al soli amb el te verd respecte als controls (Figura R-II-4 D i H1-M3).

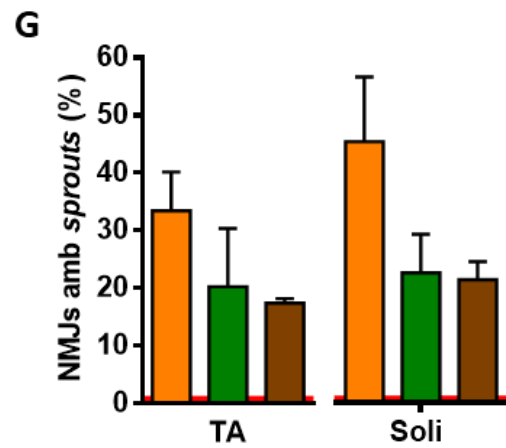
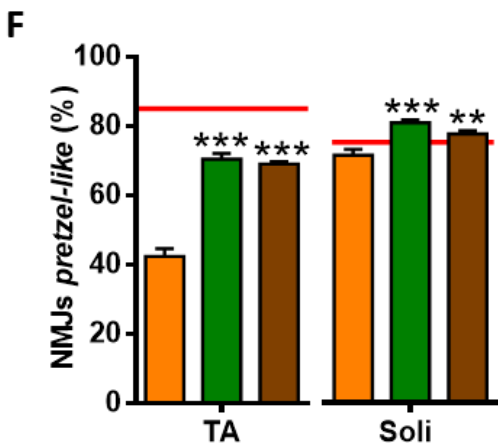
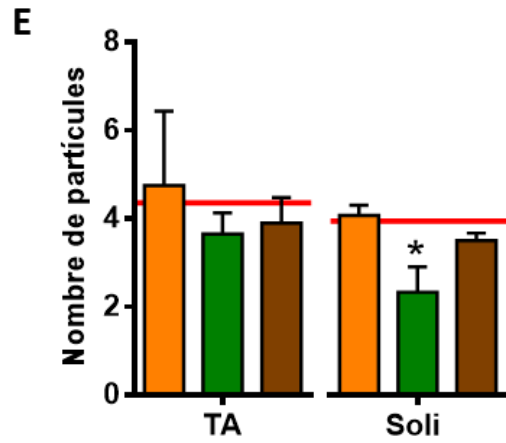
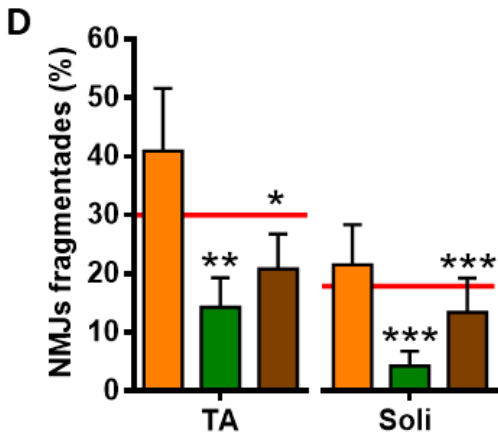
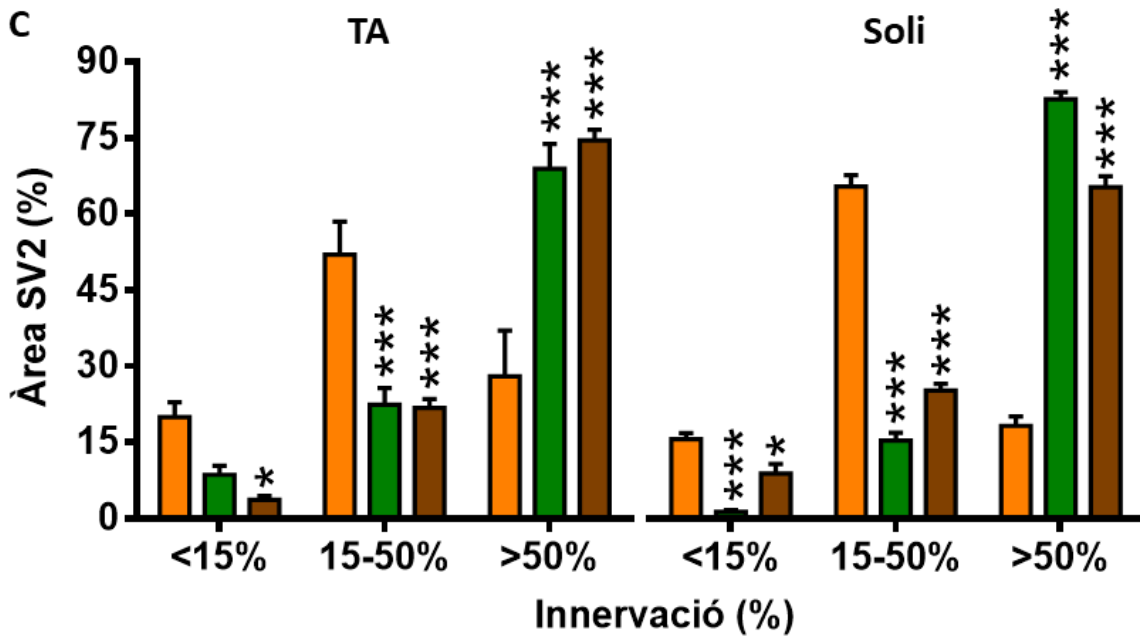
3.4. Maduració de les NMJs

D'altra banda, els animals alimentats amb les dietes suplementades exhibien un patró d'NMJs amb una aparença més sana, determinat per un augment del percentatge de plaques motores madures, conegudes com *pretzel-like*. En canvi, als músculs dels animals control es van observar uns terminals motors més immadurs i amb una aparença alterada (Figura R-II-4 F i H1-M3).

3.5. *Sprouting* de de les NMJs

De la mateixa manera, als músculs dels animals dels grups te verd i cacau es va veure que, tot i no ser estadísticament significatiu per les variacions entre els diferents animals dins de cada grup i pel reduït nombre d'animals, hi havia una reducció del percentatge d'axons motors amb *sprouting* tant al TA com al soli (Figura R-II-4 G).





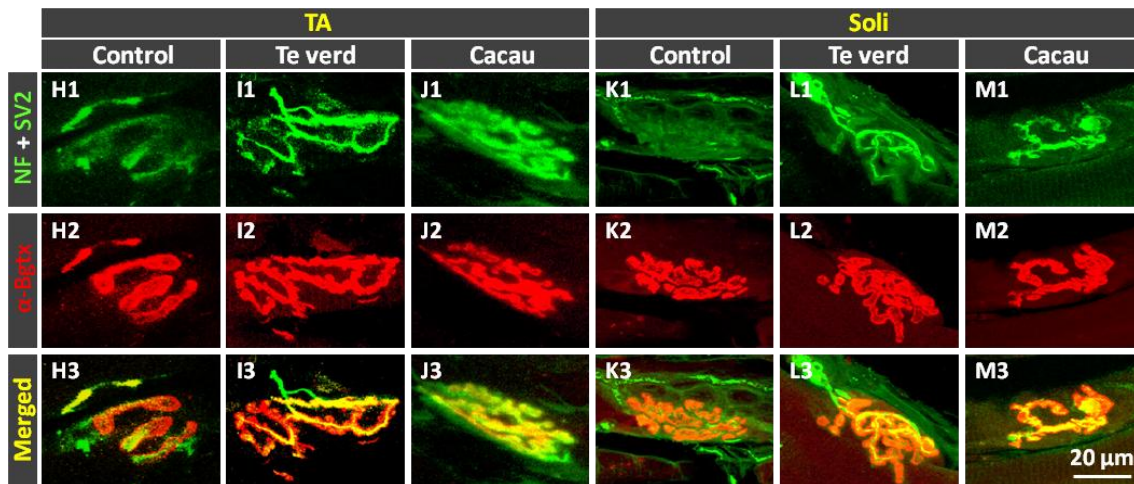


Figura R-II-4. Morfologia de les NMJs als músculs TA i soli en animals alimentats amb dietes suplementades amb te verd o amb cacau. A) Àrea de les NMJs en els diferents músculs; B) nombre d'NMJs amb una sola (mono.) o múltiples (poli.) innervacions expressat com les vegades de canvi respecte al control (línia discontinua blava); C) proporció d'NMJs mostrant diferents graus d'innervació; la quantificació es va fer en base al percentatge de la zona postsinàptica marcada amb α -Bgtx coberta per terminals pre-sinàptics tenyits amb SV2, on una cobertura inferior al 15 % va ser considerada com denervació; D) percentatge d'NMJs mostrant terminals motors fragmentats i E) nombre de fragments que formen cada placa motora; F) percentatge de zones postsinàptiques amb aparença *pretzel-like* (indicatiu d'un alt grau de maduresa sinàptica); G) percentatge d'NMJs amb *sprouts*. Les barres representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en els tests *one-* o *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 150-300$ (A) i $30-85$ (B-G) NMJs per múscul de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en D-G i representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (en vermell, per als AChR postsinàptics) i amb anticossos contra NF i SV2 (en verd, per als terminals nerviosos pre-sinàptics) als músculs TA i soli d'animals control i dels grups te verd i cacau; el regle de calibratge (M3, 20 μ m) és vàlid per a les imatges H1-M3.

Ha estat descrit que l'envelliment afecta de manera diferent als diversos grups musculars (Oertel, 1986; Hashizume and Kanda, 1995; Sheard and Anderson, 2012). A més, els nostres resultats descrits al capítol I suggereixen que el grau d'afectació muscular que es dona amb l'envelliment podria no només estar associat a la localització de cada múscul i a la seva composició segons el tipus de fibra, sinó també a la seva funció. En general, s'ha vist que el múscul gràcil, que es situa més proximalment respecte als músculs TA i soli, mostra més

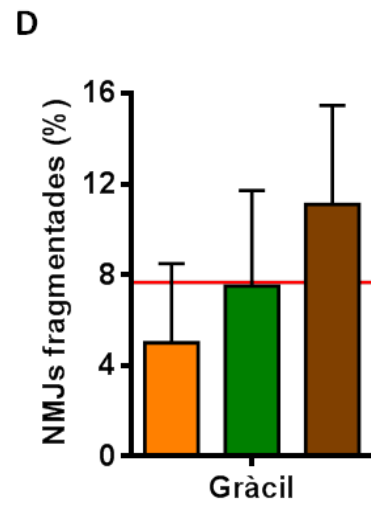
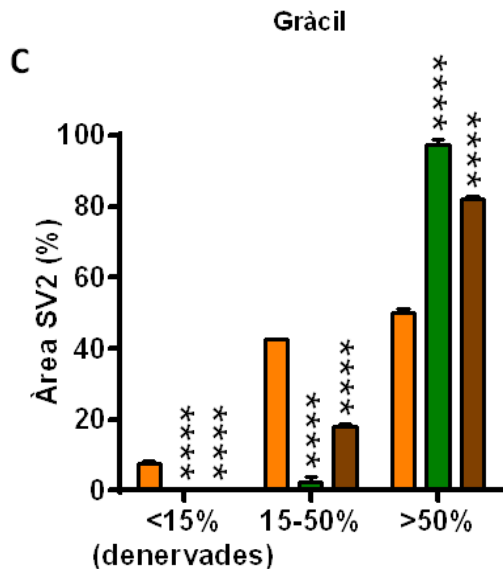
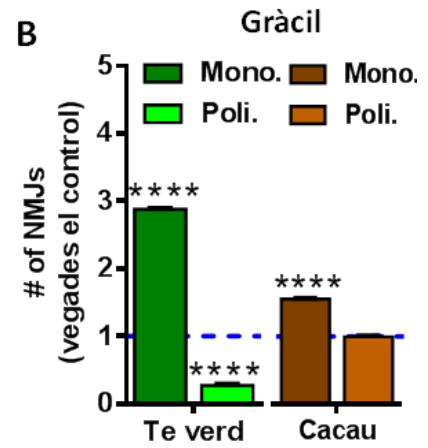
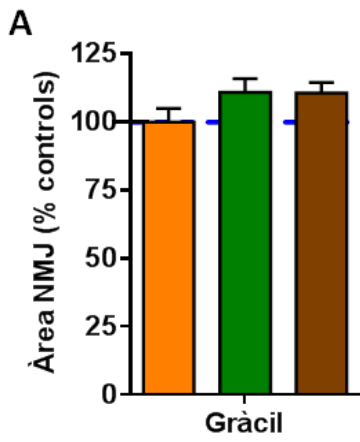
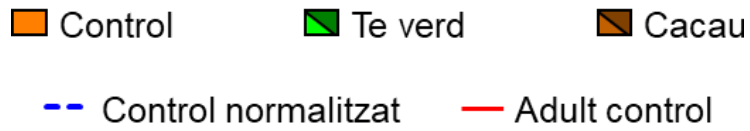
alteracions relacionades amb l'envelliment que aquests músculs distals. Per aquests motius, es va decidir analitzar també els efectes de les dietes enriquides en te verd i cacau al múscul proximal gràcil.

3.6. Múscul proximal gràcil: àrea, innervació, fragmentació i maduració de les NMJs

Analitzant el múscul gràcil, no es van veure diferències significatives entre l'àrea de les NMJs dels animals control i les dels animals que havien rebut les dietes suplementades (Figura R-II-5 A i G1-I3). Sí que es van observar canvis significatius en la innervació de les NMJs del gràcil: les dietes suplementades amb te verd o amb cacau van provocar un augment del percentatge de plaques motores monoinnervades, amb una disminució de les que estaven poliinnervades amb el te verd i sense canvis amb el cacau (Figura R-II-5 B i G1-I3). A més, es va observar una disminució del percentatge de plaques denervades o parcialment innervades, amb un augment del percentatge d'aquelles que mostraven una major innervació (Figura R-II-5 C i G1-I3).

En aquest cas, al múscul gràcil dels animals que havien rebut les dietes suplementades, no es van observar canvis en la fragmentació de les NMJs; ni en el percentatge de plaques motores fragmentades (Figura R-II-5 D i G1-I3) ni en el nombre de fragments presents en cada placa (Figura R-II-5 E i G1-I3).

Pel que fa al grau de maduresa de les NMJs, al gràcil es va veure que hi havia un augment encara més alt del percentatge de plaques motores *pretzel-like* amb les dues dietes que el que s'havia observat als músculs TA i soli (Figura R-II-5 F i H1-I3 vs. G1-G3).



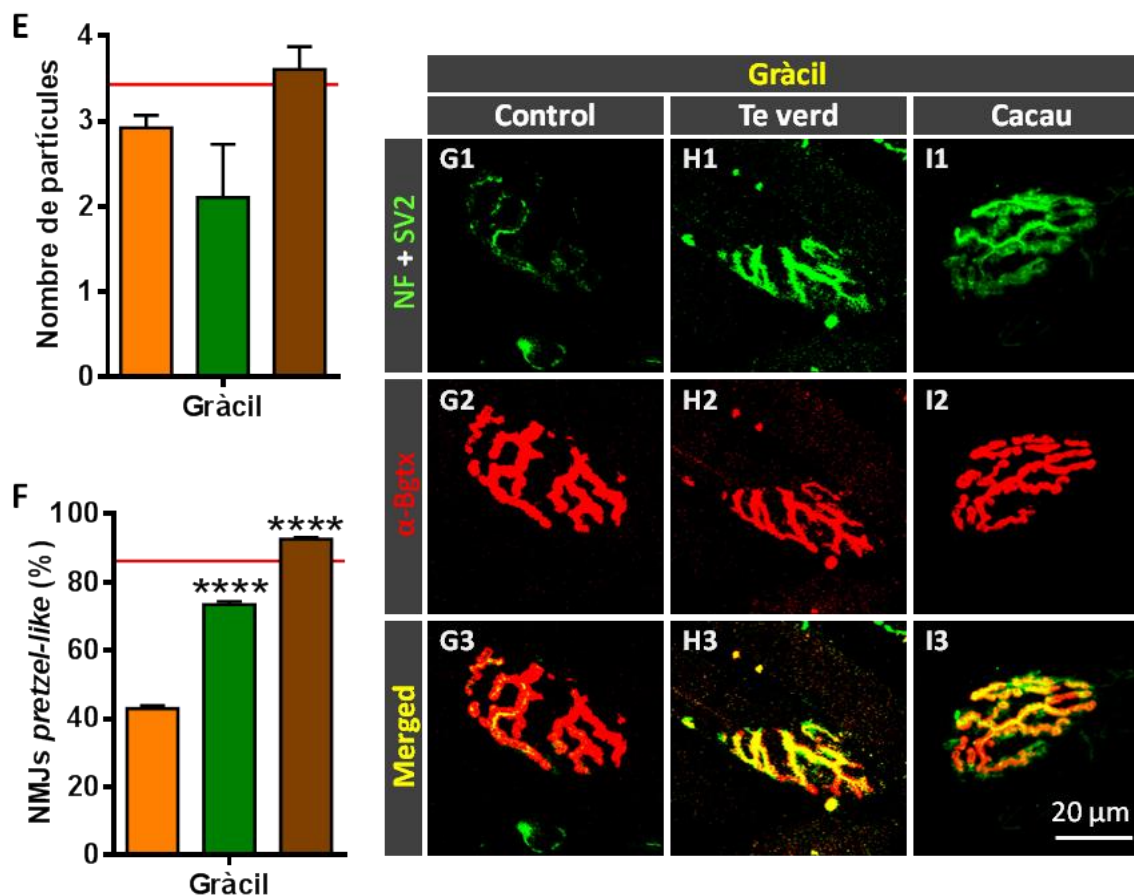


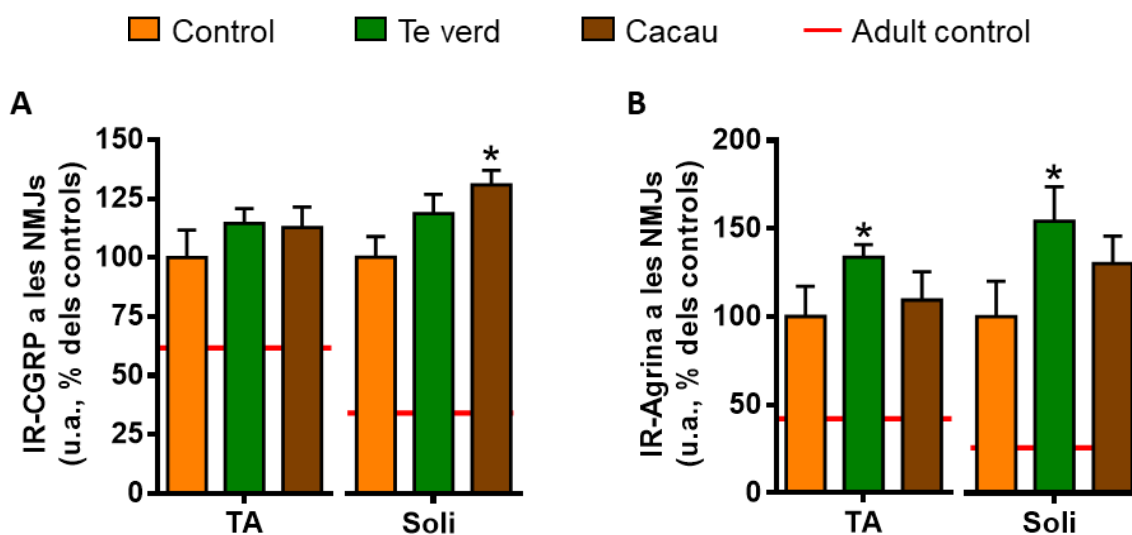
Figura R-II-5. Morfologia de les NMJs al múscul gràcil en animals alimentats amb dietes suplementades amb te verd o amb cacau. A) Àrea de les NMJs; B) nombre d'NMJs amb una sola (mono.) o múltiples (poli.) innervacions expressat com les vegades de canvi respecte al control (línia discontinua blava); C) proporció d'NMJs mostrant diferents graus d'innervació; la quantificació es va fer en base al percentatge de la zona postsinàptica marcada amb α -Bgtx coberta per terminals pre-sinàptics tenyits amb SV2, on una cobertura inferior al 15 % va ser considerada com denervació; D) percentatge d'NMJs mostrant terminals motors fragmentats i E) nombre de fragments que formen cada placa motora; F) percentatge de zones postsinàptiques amb aparença *pretzel-like* (indicatiu d'un alt grau de maduresa sinàptica). Les barres representen les mitjanes \pm SEM; els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en els tests *one-* o *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on **** $p < 0,0001$; $n = 150-300$ (A) i $30-85$ (B-F) NMJs per múscul de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en D-F i representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (en vermell, per als AChR postsinàptics) i amb anticossos contra NF i SV2 (en verd, per als terminals nerviosos pre-sinàptics) al múscul gràcil d'animals control i dels grups te verd i cacau; el regle de calibratge (I3, 20 μ m) és vàlid per a les imatges G1-I3.

3.7. Canvis en els nivells d'expressió de diferents molècules a les NMJs

Al capítol I, s'ha descrit que l'envelliment s'acompanya de canvis en l'expressió de diferents proteïnes que han estat relacionades amb el desenvolupament, la plasticitat i el manteniment de les NMJs, com ara el CGRP (Matteoli *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1995; Tarabal, 1996; Tarabal *et al.*, 1996), l'agrina (Samuel *et al.*, 2012) o la GAP-43 (Holahan, 2017). Els nivells d'aquestes molècules en els músculs dels animals adults es troben significativament reduïts en comparació amb els dels animals joves, però es troben sobre-expressades en els dels animals vells (Blasco *et al.*, 2020).

3.7.1. Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) i agrina

Es va analitzar l'impacte de les dietes suplementades amb te verd o cacau en el contingut d'aquestes molècules a les NMJs i es va veure que, en comparació amb els animals control, els músculs dels animals dels grups te verd i cacau mostraven unes NMJs amb uns nivells discretament superiors de CGRP i d'agrina, tot i només ser estadísticament significatius amb el cacau al soli en el cas del CGRP (Figura R-II-6 A i C1-C3 vs. D1-D3) i amb el te verd tant al TA com al soli en el cas de l'agrina (Figura R-II-6 B i E1-E3 vs. F1-F3).



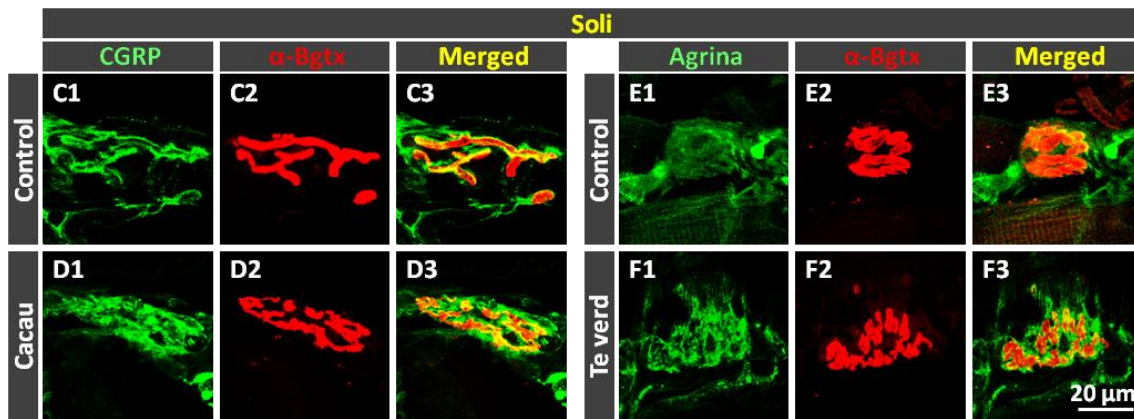


Figura R-II-6. Efecte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre els nivells d'expressió de CGRP (A) i d'agrina (B) a les NMJs dels músculs TA i soli en animals vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM del percentatge de canvi en comparació amb els controls, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $*p < 0,05$; $n = 40-70$ NMJs per múscul de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en A i B representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (en vermell), per identificar les plaques motores, junt amb CGRP (C1-D3) o agrina (E1-F3) (en verd) al múscul soli d'animals dels grups control, te verd i cacau; el regle de calibratge (F3, 20 μ m) és vàlid per a les imatges C1-F3.

3.7.2. Proteïna associada al creixement 43 (GAP-43)

En canvi, no es van observar canvis significatius en l'expressió de GAP-43 entre les NMJs dels tres grups (Figura R-II-7 A i C1-C3 vs. D1-D3), encara que el contingut total de GAP-43 als músculs determinat per *western blot* sí que va mostrar una tendència cap a una disminució en els animals que havien rebut les dietes suplementades en comparació amb els controls (Figura R-II-7B i E).

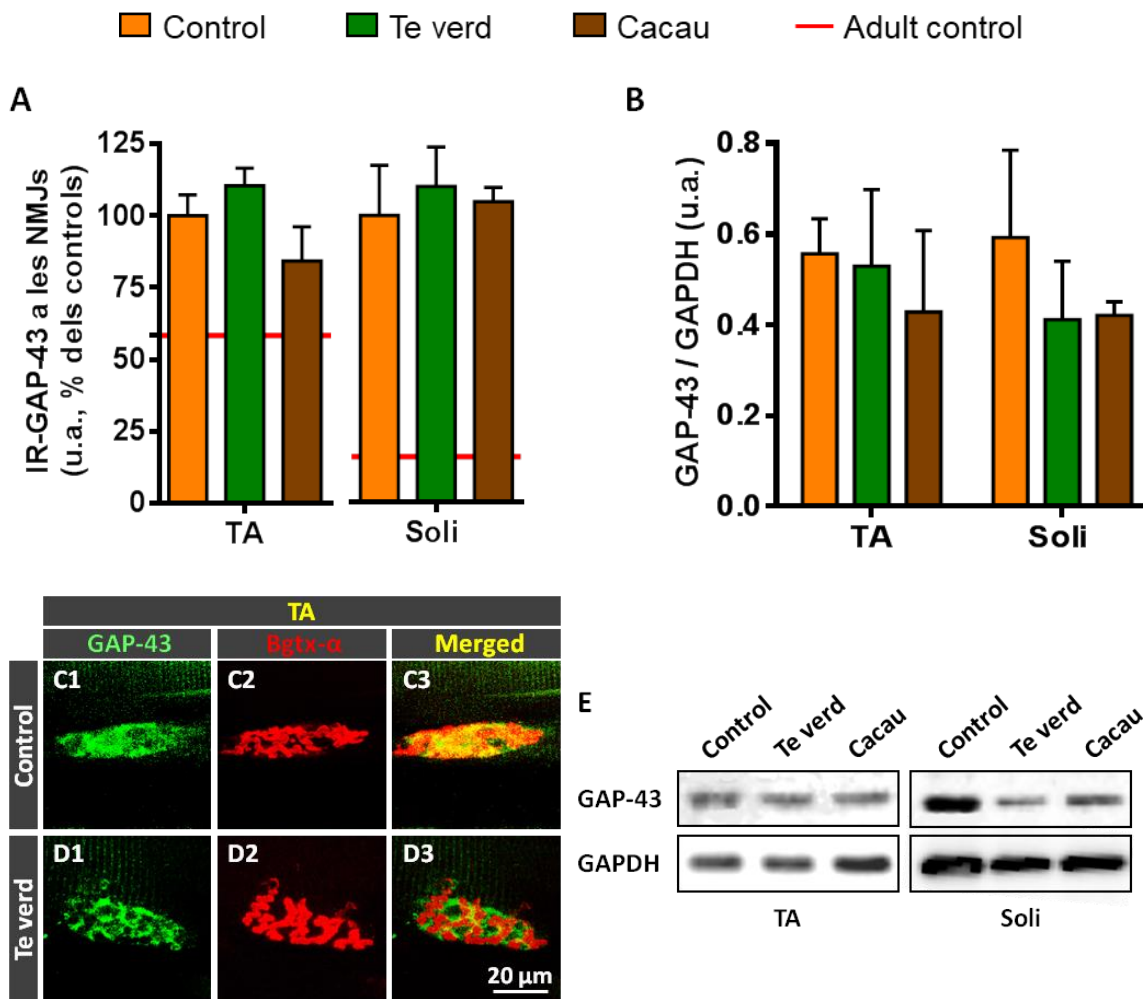


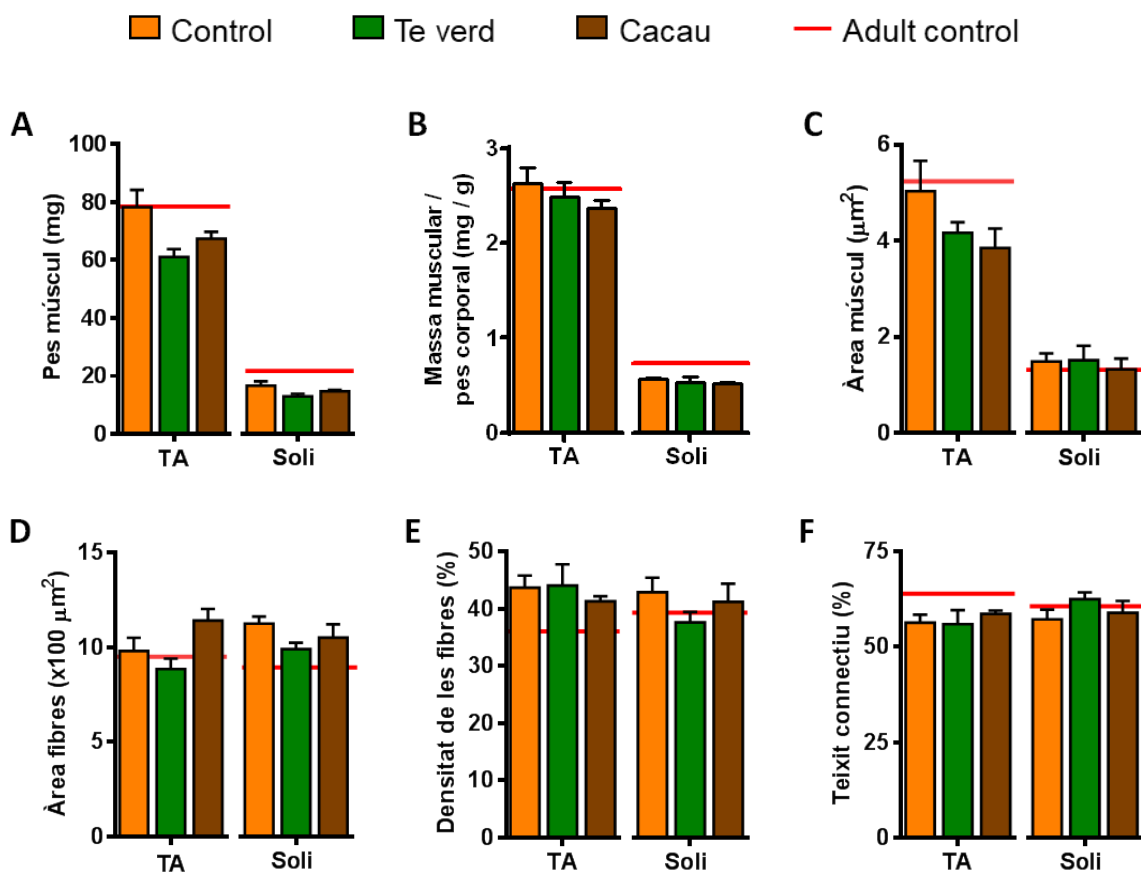
Figura R-II-7. Efecte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre els nivells d'expressió de GAP-43 (A) a les NMJs dels músculs TA i soli en animals vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM del percentatge de canvi en comparació amb els controls. L'anàlisi estadística es va realitzar amb el test *two-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni; $n = 40-70$ NMJs per múscul de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en A i B representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. C1-D3) Imatges representatives capturades al microscopi confocal de les NMJs marcades amb α -Bgtx (en vermell), per identificar les plaques motores, junt amb GAP-43 (en verd) al múscul TA d'animals dels grups control, te verd i cacau; el regle de calibratge (D3, 20 μ m) és vàlid per a les imatges C1-D3.

4. Tant el te verd com el cacau milloren el grau d'envelliment i els signes de degeneració en les fibres dels músculs esquelètics dels animals vells

Havent observat que l'envelliment es troba lligat a fenòmens de sarcopènia, es van analitzar els efectes del te verd i el cacau sobre aquests canvis histològics.

4.1. Pes i àrea musculars

En comparació amb els animals control, en els grups te verd i cacau no es van trobar diferències significatives en el pes dels músculs TA i soli, tant en el pes net (Figura R-II-9 A) com en la seva normalització amb el pes corporal dels animals (massa muscular/pes corporal) (Figura R-II-9 B). Tampoc es van trobar canvis pel que fa a l'àrea transversal dels músculs (Figura R-II-9 C). Aquests resultats indiquen que aquestes dietes no són capaces de prevenir la moderada disminució de la massa muscular que s'havia descrit amb l'envelliment al capítol I. A més, les dietes suplementades estudiades tampoc no van provocar canvis significatius en la mida de les fibres (Figura R-II-9 D), en la seva densitat (Figura R-II-9 E) o en el percentatge de teixit connectiu (Figura R-II-9 F) en comparació amb el grup control. En la Figura R-II-9 G-L, es mostren imatges representatives de talls transversals dels músculs TA i soli d'animals vells dels grups control, te verd i cacau.



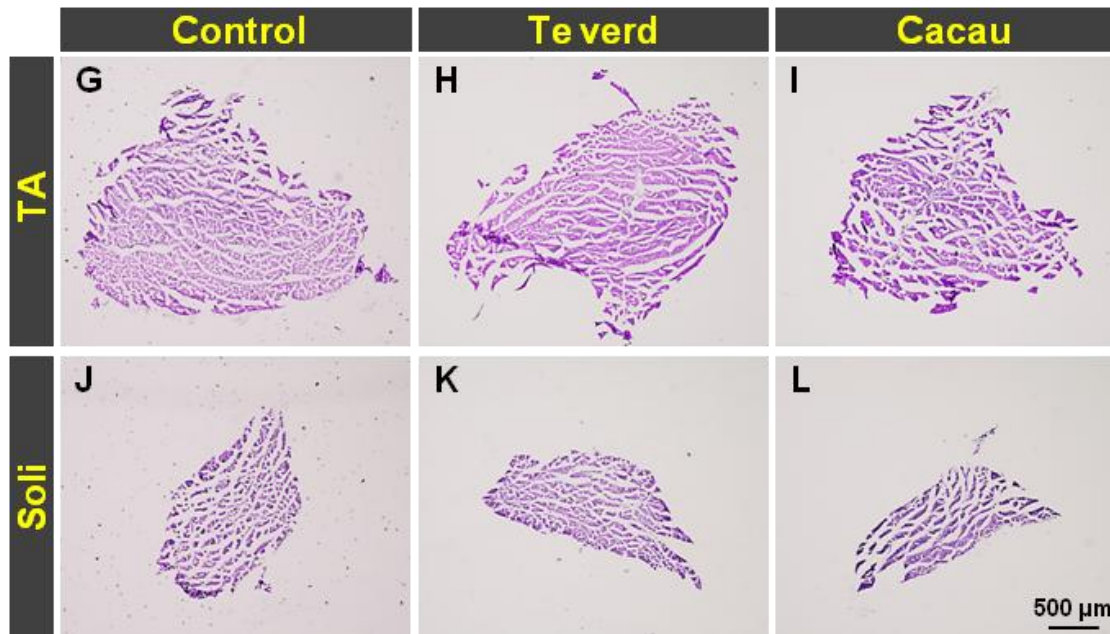


Figura R-II-8. Efecte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre els canvis associats a l'envelliment als músculs TA i soli d'animals vells. Pes net dels músculs (A, en mg) i relació d'aquest pes amb el pes corporal (B, en mg/g), àrea de les crio-seccions transversals dels músculs (C, en μm^2), àrea de les miofibres en talls transversals (D, en μm^2), densitat de miofibres (E, nombre de miofibres en 1000 μm^2) i percentatge de teixit connectiu (F). Les barres representen les mitjanes \pm SEM; l'anàlisi estadística es va realitzar amb el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni; $n = 200$ miofibres de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en A-F representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives de talls transversals dels músculs TA (G-I) i soli (J-L); el regle de calibratge (L, 500 μm) és vàlid per a les imatges G-L.

Pel que fa al múscul proximal gràcil, tampoc no es van trobar diferències significatives en els paràmetres analitzats anteriorment entre els controls i els grups de les dietes suplementades (Figura R-II-9 A-F, i H i I vs. G); només es va observar una lleugera disminució de l'àrea de les fibres dels músculs dels animals del grup te verd en comparació amb els controls (Figura R-II-9 D, i H i I vs. G).

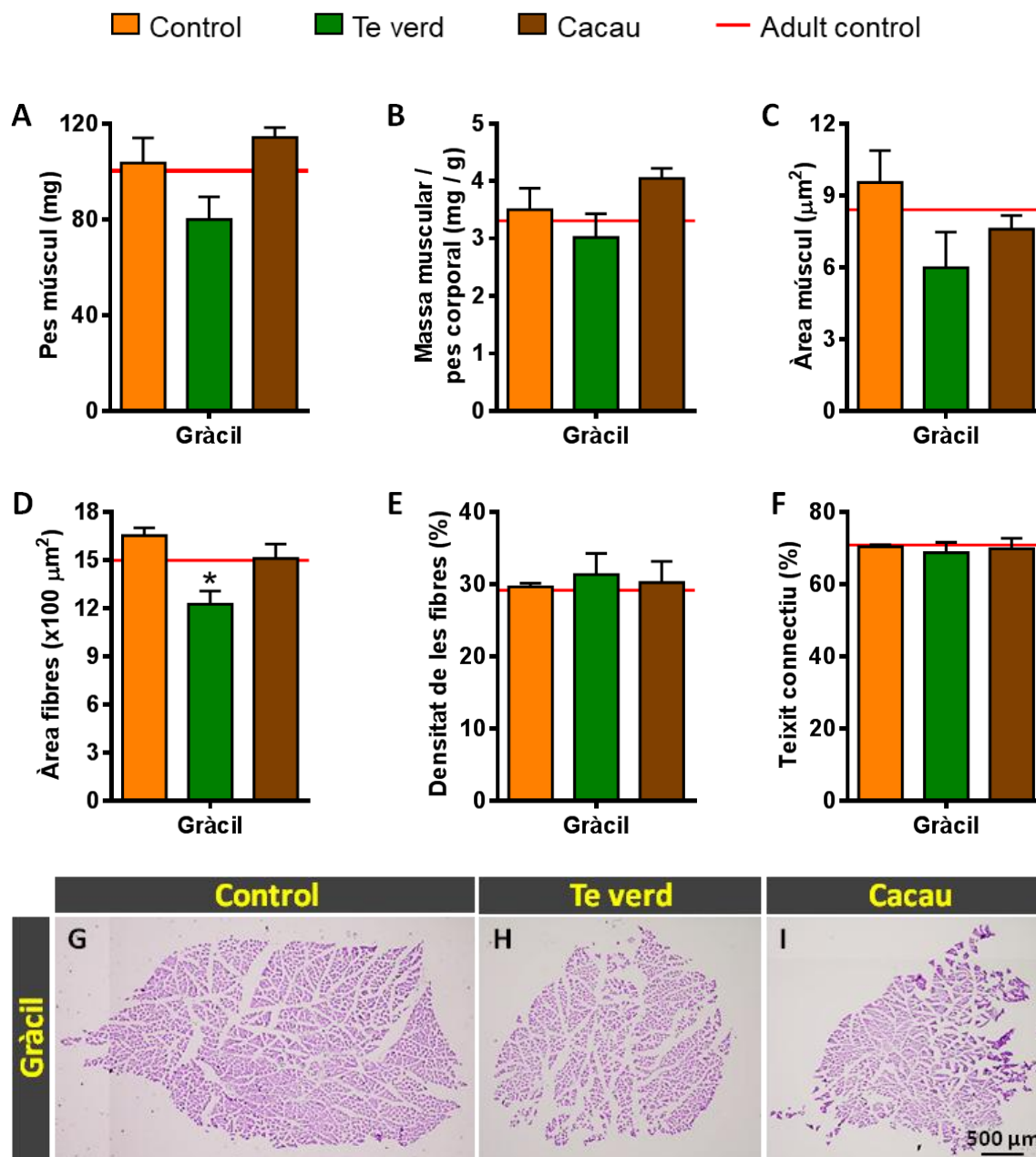


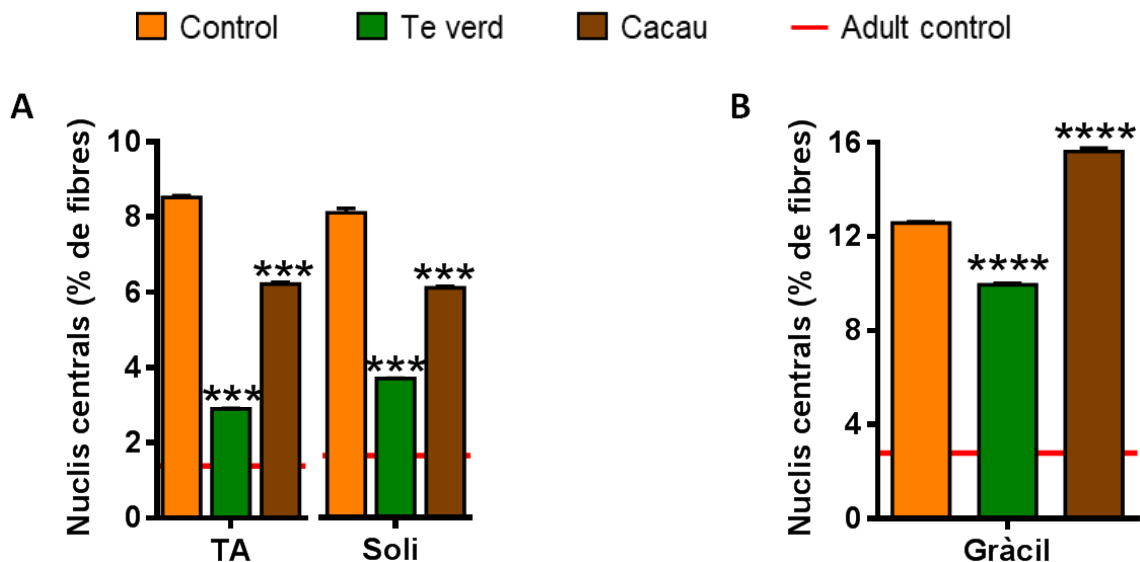
Figura R-II-9. Efecte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre els canvis associats a l'envelliment al múscul gràcil d'animals vells. Pes net dels músculs (A, en mg) i relació d'aquest pes amb el pes corporal (B, en mg/g), àrea de les crioseccions transversals dels músculs (C, en μm^2), àrea de les miofibres en talls transversals (D, en μm^2), densitat de miofibres (E, nombre de miofibres en $1000 \mu\text{m}^2$) i percentatge de teixit connectiu (F). Les barres representen les mitjanes \pm SEM; l'asterisc indica la diferència significativa basada en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $*p < 0,05$; $n = 200$ miofibres de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau; les línies vermelles en A-F representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives de talls transversals del múscul gràcil tenyits amb HE capturades al microscopi òptic; el regle de calibratge (I, $500 \mu\text{m}$) és vàlid per a les imatges G-I.

4.2. Nuclis centrals

Tant el nostre grup com d'altres, han descrit que els músculs esquelètics dels animals vells sovint presenten una gran proporció de fibres amb nuclis localitzats centralment (Valdez *et al.*, 2010; Blasco *et al.*, 2020). Aquest canvi sembla ser el resultat d'un procés de regeneració als músculs en què s'intenten reemplaçar les fibres degenerades que s'han perdut durant l'envelliment (Carlson, 1973; revisió de Folker & Baylies, 2013).

En aquest estudi es va veure que, tant el te verd com el cacau, provocaven una reducció significativa de la proporció d'aquestes fibres amb nuclis centrals en comparació amb els músculs dels animals control (Figura R-II-10 A, i D i E vs. C i G i H vs. F), amb uns valors més propers als dels animals adults control (sobretot en el cas del te verd).

A més, es va veure que, com en els múscul TA i soli, al múscul gràcil també hi havia una reducció del percentatge de miofibres amb els nuclis localitzats centralment al grup te verd en comparació amb els controls; no obstant això, amb el cacau es van observar uns valors significativament superiors als dels controls (Figura R-II-10 B i J i K vs. I).



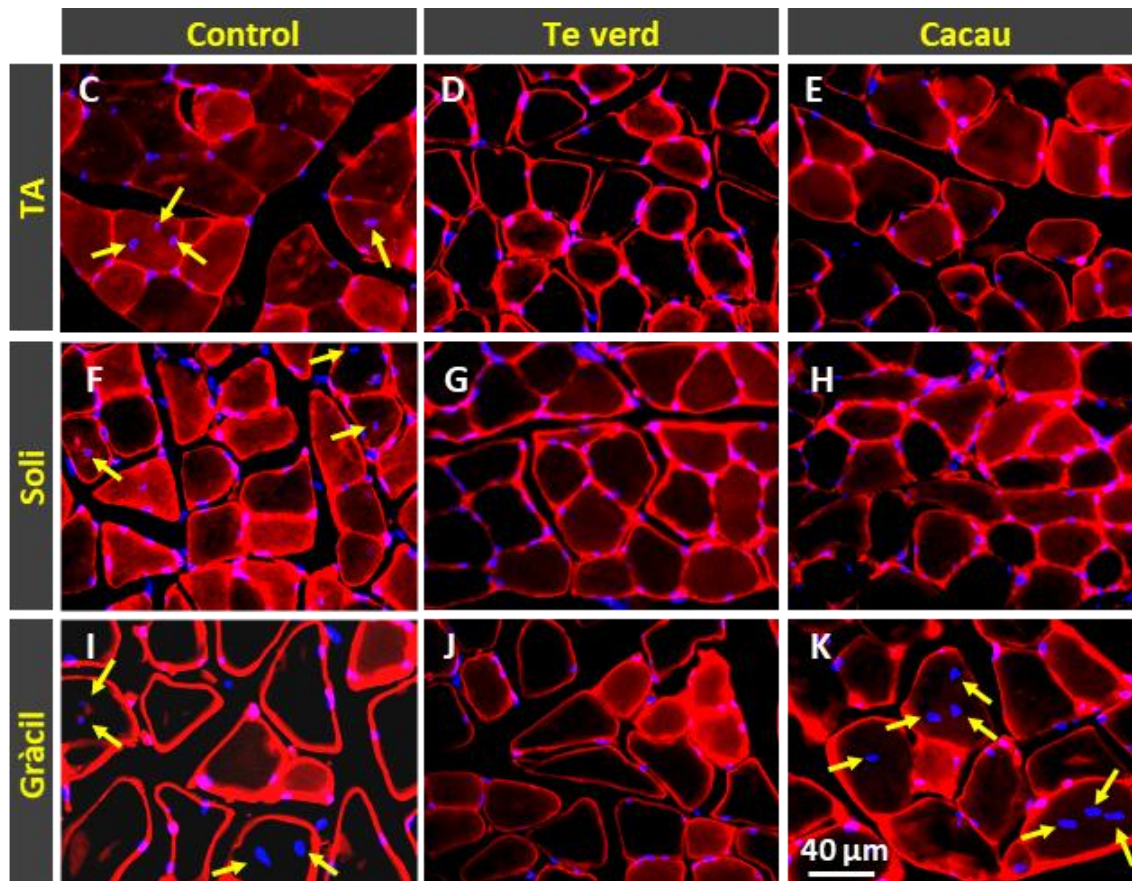


Figura R-II-10. Impacte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre els canvis relacionats amb l'envelliment als músculs TA, soli i gràcil d'animals vells. Percentatge de miofibres amb nuclis centrals als músculs distals TA i soli (A) i al múscul proximal gràcil (B) en ratolins vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $n = 2500-4000$ miofibres per animal i múscul per condició (de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau); les línies vermelles en A i B representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. C-K) Imatges representatives de talls transversals dels músculs capturades al microscopi de fluorescència on s'observen les miofibres marcades amb laminina (vermell) junt amb DAPI (blau, ver visualitzar els nuclis) dels músculs TA, soli, i gràcil d'animals dels grups control, te verd i cacau; les fletxes grogues assenyalen els nuclis localitzats centralment; el regle de calibratge (K, 40 μm) és vàlid per a les imatges C-K.

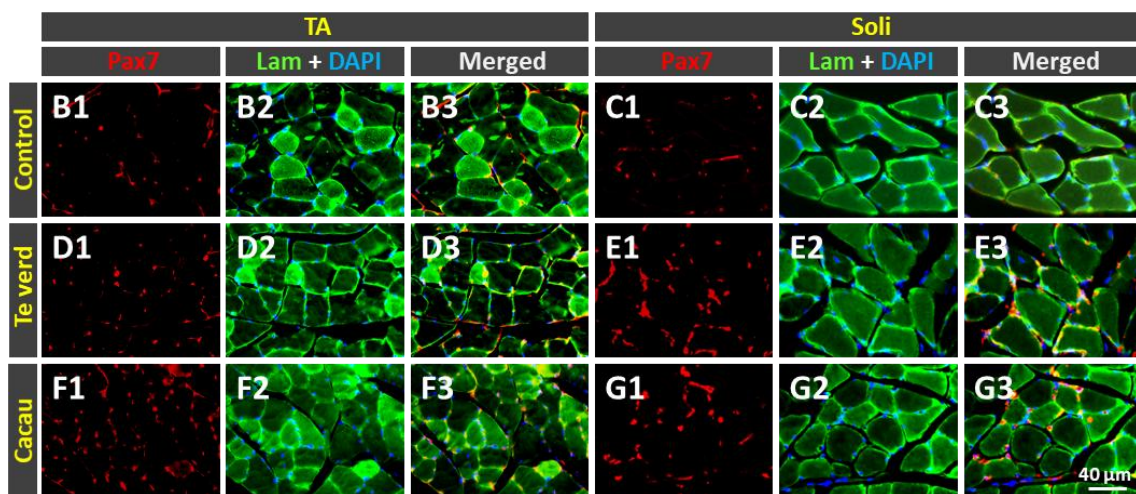
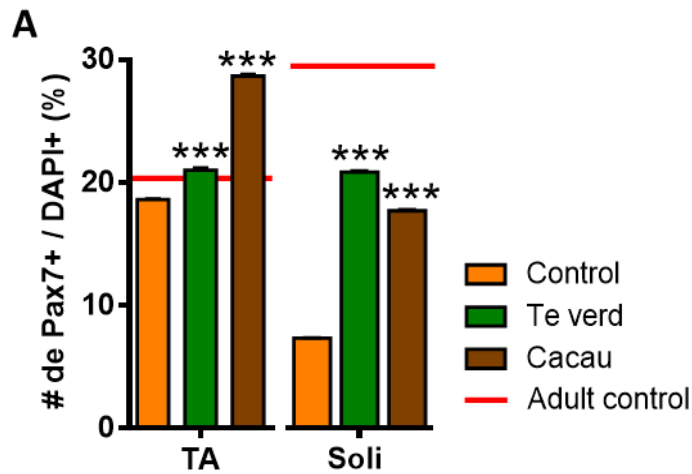
4.3. Cèl·lules satèl·lit (SCs)

D'altra banda, tant el nostre laboratori com d'altres, han demostrat que l'envelliment es troba acompanyat d'una pèrdua d'SCs (Snow, 1977; Gopinath and Rando, 2008; Day *et al.*, 2011; Sousa-Victor *et al.*, 2015; Blasco *et al.*, 2020), les quals tenen un paper crucial en la creació de noves miofibres durant

els processos de regeneració muscular (Sacco and Puri, 2015; Sousa-Victor *et al.*, 2015).

Es van analitzar els efectes de les dietes suplementades sobre les SCs mitjançant una immunohistoquímica amb Pax7, factor de transcripció implicat en la proliferació de les cèl·lules precursors del múscul, juntament amb laminina i amb DAPI. Es va observar que els músculs TA i soli, tant del grup te verd com del cacau, tenien unes densitats d'SCs significativament superiors a les dels animals control (Figura R-II-11 A i D1-F3 vs. B1-B3 i E1-G3 vs. C1-C3).

Pel que fa al múscul proximal gràcil, també es va veure que ambdues dietes provocaven un augment de la densitat d'SCs respecte al grup control (Figura R-II-11 H i J1-K3 vs. I1-I3).



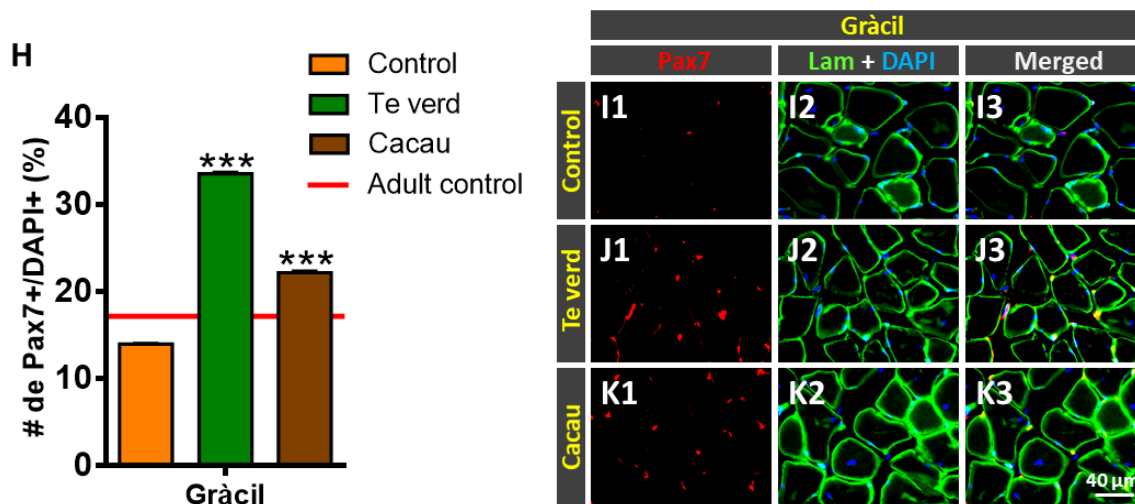


Figura R-II-11. Impacte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau sobre el percentatge d'SCs (marcades amb Pax7) respecte al nombre de nuclis positius per DAPI als músculs TA, soli i gràcil d'animals vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA* amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on $***p < 0,001$; $n = 2500-4000$ miofibres per animal i múscul per condició (de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau); les línies vermelles en A i H representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives de talls transversals dels músculs TA i soli (B1-G3) i gràcil (I1-K3) d'animals dels grups control, te verd i cacau, capturades al microscopi confocal, on s'observen les SCs marcades amb Pax7 (vermell) i les miofibres marcades amb laminina (verd) junt amb DAPI (blau, ver visualitzar els nuclis); els regles de calibratge (G3, 40 μ m i K3, 40 μ m) són vàlids per a les imatges B1-G3 i I1-K3, respectivament.

4.4. Lipofuscina

A continuació, es van analitzar els efectes de les dietes sobre la presència de lipofuscina en els músculs dels animals vells. Tal i com s'ha vist al capítol I, el soli -que és un múscul de contracció lenta- dels animals control, va mostrar un menor percentatge de fibres amb presència de lipofuscina que el TA, que és un múscul de contracció ràpida (Figura R-II-12 F-H vs. C-E). Tant la dieta suplementada amb te verd com la del cacau van reduir de manera significativa no només el percentatge de miofibres amb cúmuls del pigment (Figura R-II-12 A i D i E vs. C per al TA i G i H vs. F per al soli) sinó també el nombre de fragments de lipofuscina presents en cada fibra (Figura R-II-12 B i D i E vs. C per al TA i G i H vs. F per al soli).

Analitzant el múscul proximal gràcil, es va veure que amb el te verd hi havia una reducció significativa del percentatge de miofibres amb lipofuscina (Figura R-II-12 I i L i M vs. K), mentre que hi havia una reducció del nombre d'aquests fragments en cada fibra amb les dues dietes respecte als controls (Figura R-II-12 J i L i M vs. K).

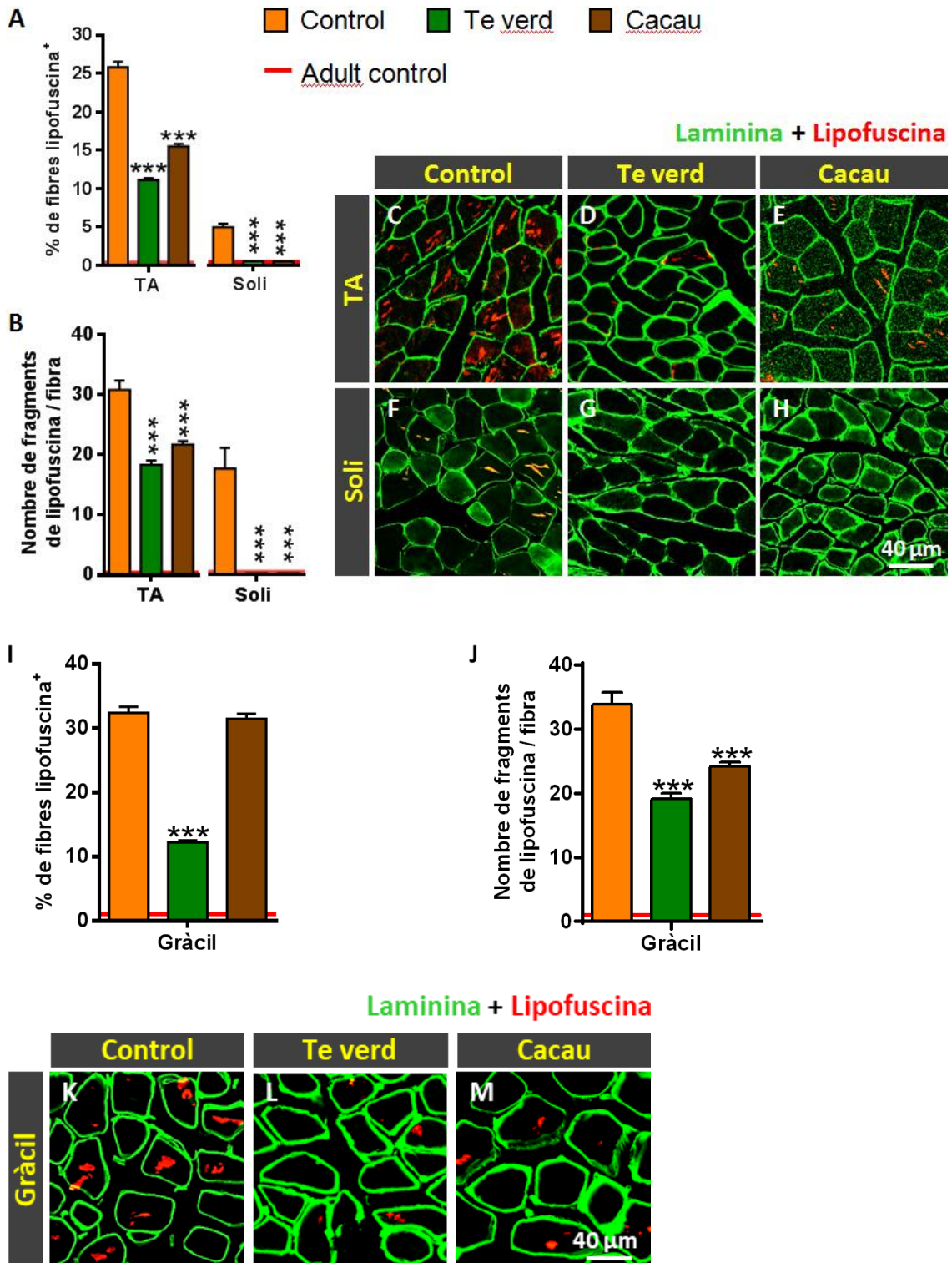


Figura R-II-12. Impacte de les dietes suplementades amb te verd o amb cacau en l'acumulació de lipofuscina en el múscul relacionada amb l'envelliment. Percentatge de fibres amb grànuls de lipofuscina (A), i nombre de fragments d'aquest pigment per fibra (B) als músculs TA, soli i gràcil d'animals vells. Les barres representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en el test *one-way ANOVA*, amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, o en el *t*-test, on $***p < 0,001$; $n = 1200-2200$ miofibres per animal i múscul per condició (de 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del grup cacau); les línies vermelles en A, B, I i J representen els valors de les mitjanes dels animals adults control. Imatges representatives de talls transversals dels músculs TA (C-E), soli (F-H) i gràcil (K-M) capturades al microscopi confocal on es mostren les immunotincions amb laminina (en verd); l'autofluorescència de la lipofuscina (en vermell) es manifesta a l'excitar-la a 510-560 nm i aplicant-hi filtres d'emissió de 590 nm; els regles de calibratge (H i M, 40 μ m) són vàlids per a les imatges C-H i K-M, respectivament.

5. Tant el te verd com el cacau prevenen les alteracions associades a l'envelliment als mitocondris dels músculs esquelètics

Per tal d'avaluar si les dietes suplementades amb te verd i amb cacau eren capaces de promoure el metabolisme del múscul esquelètic a través de la regulació de PGC-1 α , es va analitzar la seva expressió per *western blot*.

Es va veure que, tot i només ser estadísticament significatiu per al grup te verd, els extractes dels músculs TA i soli d'animals que havien rebut qualsevol dels dos suplementos mostraven nivells de proteïna PGC-1 α superiors als dels animals controls (Figura R-II-13 A i B).

Amb l'objectiu de saber si aquest augment de l'expressió de PGC-1 α als músculs esquelètics induït pel te verd i el cacau estava lligat a un augment de la densitat de mitocondris a les miofibres, es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica amb l'anticòs contra ATP5A, un marcador mitocondrial, al múscul de contracció ràpida TA. El TA està format principalment per fibres ràpides (té una major proporció de fibres del tipus 2A i, seguidament, de fibres del tipus 2B), les quals es caracteritzen per tenir un metabolisme glicolític i un baix contingut mitocondrial en comparació amb les fibres de contracció lenta, que són de metabolisme oxidatiu (Valdez *et al.*, 2012; Blasco *et al.*, 2020). En comparació amb els músculs dels animals adults, els dels animals vells mostraven una reducció d'aproximadament un 25 % en la immunotinció

d'ATP5A a les miofibres, el que indica que hi ha una disminució en el nombre de mitocondris amb l'envelliment.

Al múscul TA dels animals que havien rebut una dieta suplementada amb te verd o amb cacau, es va observar un contingut de mitocondris significativament superior al dels controls, amb uns valors molt semblants als observats als animals adults per al te verd i amb uns valor encara superiors per al cacau (Figura R-II-13 C i E i F vs. D).

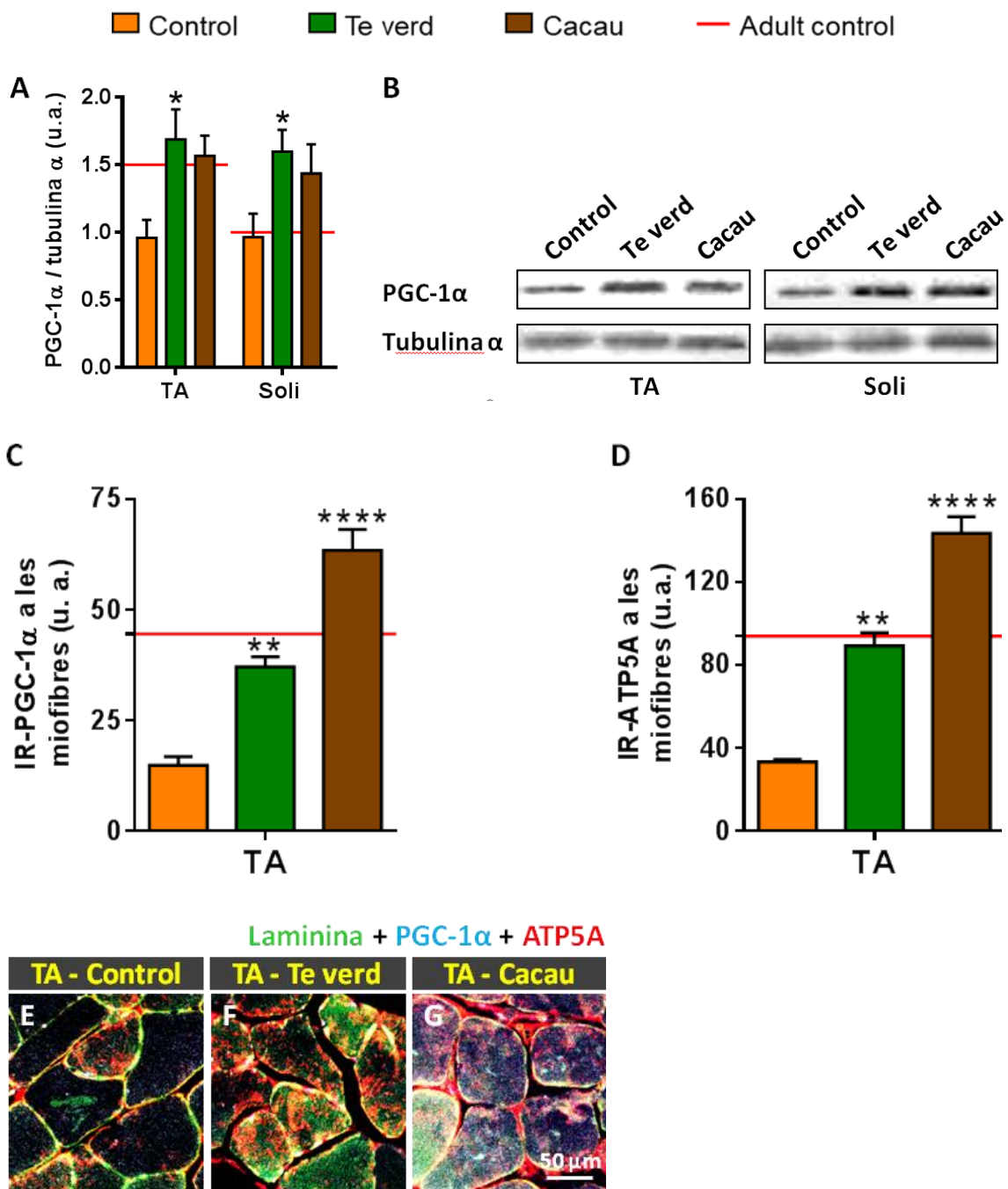


Figura R-II-13. Efectes del te verd i del cacau en els mitocondris dels animals vells. Anàlisi densitomètrica dels canvis en els nivells de PGC-1 α en els músculs TA i soli dels animals control o amb dietes suplementades amb te verd o amb cacau (A); les dades van ser normalitzades amb la tubulina α . *Western blots* representatius de les proteïnes PGC-1 α i tubulina α (com a control de càrrega) al TA i al soli d'animals control i dels grups te verd i cacau (B). Quantificació de la immuno-reactivitat de PGC-1 α (C) i d'ATP5A (D) a les miofibres del múscul TA dels animals del grup control i dels del te verd i del cacau. Imatges representatives de talls transversals del múscul TA d'animals dels tres grups experimentals capturades al microscopi confocal on es mostren les immunotincions amb PGC-1 α (en blau), ATP5A (en vermell) i laminina (en verd) (E-G); el regle de calibratge (G, 50 μ m) és vàlid per a les imatges E-G; les barres en A, C i D representen les mitjanes \pm SEM, on els asteriscs indiquen les diferències significatives basades en els tests *two-way ANOVA* (A) i *one-way ANOVA* (C i D) amb la posterior correcció amb el test de Bonferroni, on * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; n = 3 animals per condició de 2 *western blots* independents (A i B) i 3 animals control, 4 del grup te verd i 5 del cacau (C-G); les línies vermelles en A, C i D representen els valors de les mitjanes dels animals adults control.

DISCUSSIÓ

1. L'anàlisi simultània de les modificacions que es donen a nivell nerviós i muscular en el ratolí C57BL/6JRj permet una caracterització dels processos de maduració i envelliment

Tot i que s'ha avançat molt en el coneixement dels factors que condueixen a la sarcopènia, encara es desconeixen els mecanismes precisos que la provoquen. El sistema neuromuscular està format per un gran conjunt de cèl·lules i teixits de diferents tipus que interaccionen entre sí d'una manera molt complexa, el que dificulta la seva anàlisi de manera aïllada. En la literatura trobem estudis, la majoria d'ells realitzats amb rosegadors, principalment amb diverses soques de rates i ratolins, que sovint mostren resultats ambigus, amb notables diferències segons el model d'envelliment utilitzat (Ballak *et al.*, 2014).

Tot i que no està clar del tot que alguns dels resultats sobre els processos d'envelliment obtinguts en rosegadors puguin ser extrapolats als humans, aquests proporcionen una bona eina d'experimentació per a la recerca en aquest àmbit, ja que permeten evitar en gran mesura els problemes derivats de la llarga esperança de vida, les condicions ambientals i nutricionals i d'obtenció de teixits en humans (Ballak *et al.*, 2014). No obstant això, la major part de la recerca realitzada en models murins es centra en estudiar el sistema neuromuscular, la qual cosa proporciona una visió només parcial de les alteracions cel·lulars i moleculars que provoquen la sarcopènia. Per tal d'intentar unificar i aclarir totes aquestes dades publicades que mostren resultats parcials i discrepants, en aquest estudi es va realitzar una anàlisi detallada de les alteracions estructurals i funcionals del sistema neuromuscular relacionades amb l'envelliment en ratolins C57BL/6JRj, un model àmpliament utilitzat en estudis de sarcopènia. En cada animal, i a diferents edats, es van estudiar de manera simultània les modificacions estructurals que la sinapsi neuromuscular i el múscul esquelètic experimenten amb l'edat, així com els canvis en algunes molècules clau implicades en el desenvolupament i manteniment de la innervació neuromuscular. Un resum dels principals resultats obtinguts en aquest estudi es mostra en la Figura D-1.

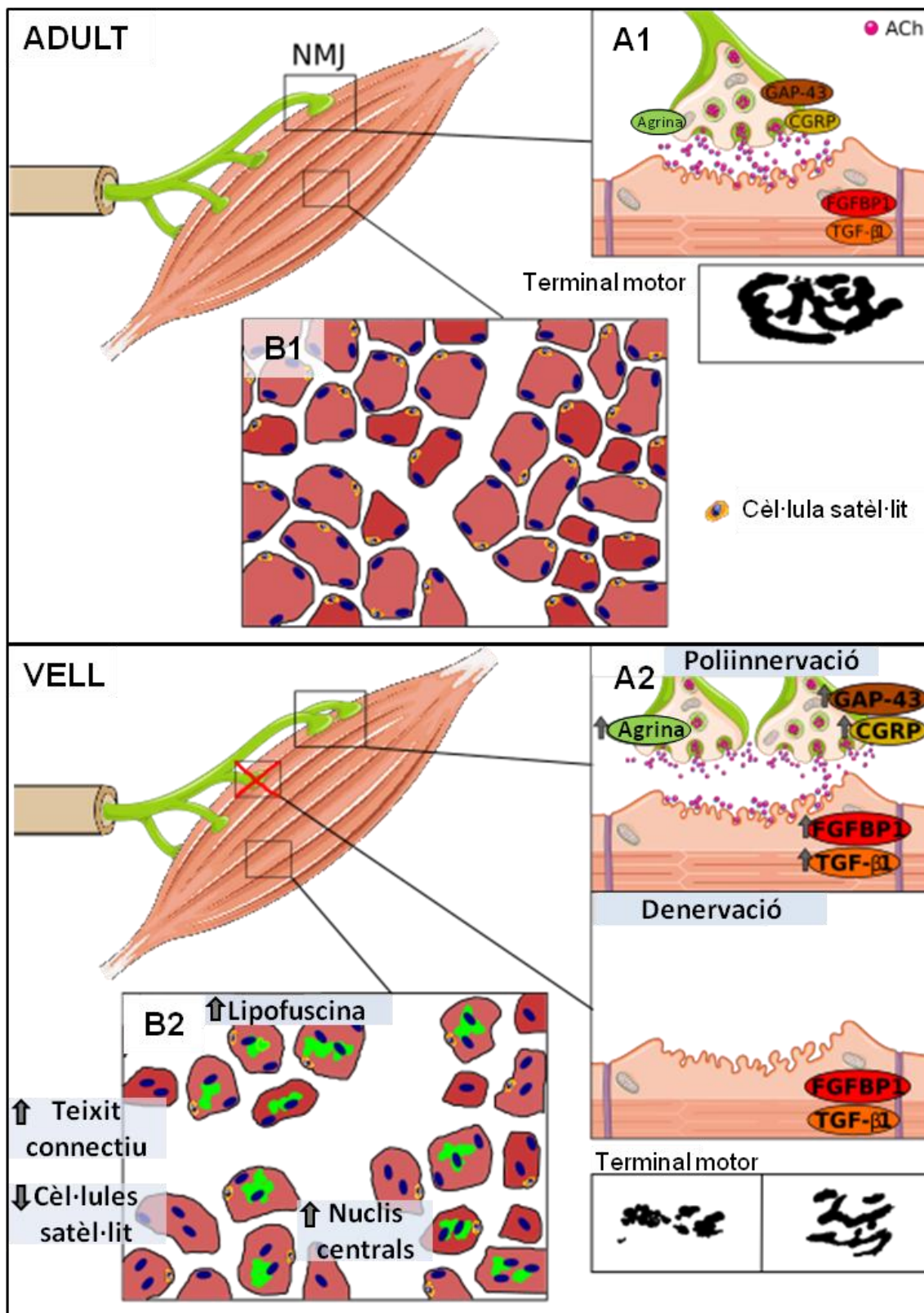


Figura D-1. Visió general dels canvis associats a l'edat al sistema neuromuscular dels ratolins C57BL/6JRj. A1-B1 mostren un esquema de l'organització estructural de diferents components del sistema incloent les NMJs i els músculs esquelètics; els terminals nerviosos motors estableixen connexions sinàptiques amb les fibres dels músculs esquelètics (NMJs); en els músculs adults, tant els elements pre-sinàptics com

els postsinàptics de les NMJs mostren un aspecte “saludable” i ben organitzat on un terminal nerviós motor contacta amb una placa motora que mostra un patró de *pretzel*. A1) Les NMJs adultes mostren nivells baixos d'agrina, GAP-43, CGRP, FGFBP1 i TGF- β 1. B1 mostra un diagrama de les miofibres adultes envoltades de teixit connectiu, tal com es veu en la secció muscular transversal. A2-B2 mostren que els músculs dels ratolins vells presenten signes de poliinnervació o de denervació i fragmentació dels terminals motors; aquests canvis es veuen acompanyats per un augment de l'expressió de GAP-43, CGRP, FGFBP1 i TGF- β 1, el que suggereix que en aquests animals es dona un procés de remodelació i de reinnervació musculars. A més, els músculs vells mostren un gran nombre de fibres amb acumulacions de lipofuscina i amb nuclis localitzats de manera central, el que indica un procés de regeneració muscular, i de dipòsits de teixit connectiu fibròtic entre fibres; en B2 es mostra que la proporció d'SCs també es troba notablement reduïda als músculs vells. *imatge creada amb BioRender.com.*

2. La conducció dels impulsos nerviosos es veu alterada amb l'edat en els ratolins C57BL/6JRj

Els estudis de conducció nerviosa permeten realitzar una valoració funcional quantitativa de les fibres mielinitzades més grans; l'amplitud dels potencials d'acció evocats és un indicatiu del nombre de fibres nervioses conductores i de la innervació perifèrica, mentre que la velocitat de conducció nerviosa està relacionada amb el calibre axonal i la mielinització (Navarro and Udina, 2009). Els tests de conducció nerviosa realitzats indiquen que la conducció dels impulsos es troba reduïda en edats avançades, el que coincideix amb estudis previs realitzats en animals de laboratori (Sato *et al.*, 1985; Schmelzer and Low, 1987; Verdú *et al.*, 1996) i en humans (Dorfman and Bosley, 1979; Taylor, 1984). Així doncs, estudis previs en els quals s'ha fet una avaluació longitudinal prèvia en ratolins han demostrat que la velocitat de conducció dels nervis motors i sensorials augmenta durant la vida adulta-jove i que, després, es manté sense canvis fins a l'últim terç de la vida, quan tendeix a disminuir (Verdú *et al.*, 1996).

A més, també s'ha descrit que hi ha una reducció de l'amplitud dels potencials d'acció dels nervis motors i sensorials relacionada amb l'edat tant en animals (Schmelzer and Low, 1987; Verdú *et al.*, 1996) com en humans (O'Sullivan and Swallow, 1968; Sharma *et al.*, 1980; Buchthal *et al.*, 1984; Ceballos *et al.*, 1999). En aquest estudi, també s'ha demostrat que les amplituds dels CMAPs i dels CNAPs tendeixen a disminuir amb l'edat, especialment en elements distals

com ara els músculs dels peus i els nervis dels dits dels peus. També s'ha demostrat que amb l'envelliment es dona una pèrdua del nombre de fibres mielinitzades als nervis perifèrics en diverses espècies animals (O'Sullivan and Swallow, 1968; Sharma *et al.*, 1980; Buchthal *et al.*, 1984; Ceballos *et al.*, 1999), tal com queda reflectit també en els nostres resultats. El fet que els músculs plantars tinguin una major pèrdua funcional que els músculs més proximals i que els músculs de la cua (Sharma *et al.*, 1980) ha estat atribuït, entre altres factors determinants, a l'efecte de la pressió sostinguda sobre les potes al llarg de la vida, tal com s'ha observat en aquest estudi en els animals vells.

2.1. No s'observa una pèrdua significativa de MNs als ratolins amb l'envelliment

L'anàlisi de la MUNE reflecteix el nombre de MNs presents en cada individu; en estudis anteriors, la MUNE ha permès identificar la marcada pèrdua de MNs que es dona amb l'envelliment. En aquest estudi, però, només s'ha trobat una lleugera reducció de la MUNE als músculs dels animals vells, el que es correlaciona amb l'absència d'una degeneració significativa de les MNs. Després d'una pèrdua de MNs, els axons motors inicien un mecanisme compensatori per tal de mantenir la força muscular a través de la formació de branques col·laterals dins el propi múscul, procés conegut com a *sprouting*, i, d'aquesta manera, augmentar la mida de la unitat motora corresponent (Brown *et al.*, 1981). No obstant això, amb l'envelliment, aquesta capacitat d'iniciar un *sprouting* col·lateral (Fagg *et al.*, 1981) i de mantenir la mida de la unitat motora (Jacob and Robbins, 1990) és defectuosa. A més, s'han descrit alteracions en la funció de les NMJs dels rosegadors vells com a conseqüència de les alteracions en les unitats motores de contracció ràpida, ràpidament fatigables (Fogarty *et al.*, 2019), el que provoca una disminució en la mida mitjana de les unitats motores restants, com s'ha vist en aquest treball.

3. Les NMJs dels ratolins sofreixen canvis plàstics relacionats amb l'edat

Hi ha certa controvèrsia sobre si les NMJs són estables durant tota la seva vida i sobre si es donen canvis en la seva morfologia. Alguns estudis primerencs realitzats en conills i en gats han descrit que s'observa un cert grau d'*sprouting* nerviós i un continu renovament de les NMJs en els músculs normals (Barker

and Ip, 1966). No obstant això, dades més recents provinents d'estudis realitzats en ratolins i en humans han demostrat que les NMJs es mantenen generalment estables al llarg de tota la vida (Marques *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2017). En canvi, tal i com ha estat descrit en estudis previs (Marmigère and Erfors, 2007; Valdez *et al.*, 2010, 2012; Li *et al.*, 2011; Willadt *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2017), nosaltres hem vist que, en els músculs dels animals vells, hi ha una quantitat significativa d'NMJs que presenten canvis plàstics evidents com ara la denervació parcial o completa, la poliinnervació, l'augment de la complexitat de les ramificacions dels terminals nerviosos i l'*sprouting*. A més, es van observar signes evidents de fragmentació de la placa motora i cúmuls d'AChRs innervats de forma anòmala al llarg de tota la miofibra als músculs dels animals vells. En conjunt, tots aquests canvis encaixen amb la hipòtesi que l'envelliment comporta un procés continu de denervació-reinnervació musculars (Larsson *et al.*, 2019). En aquest treball, es va observar que els animals vells presentaven uns músculs amb un augment significatiu dels nivells d'expressió d'algunes molècules que tenen funcions específiques en els processos de desenvolupament, maduració, plasticitat i estabilitat de les NMJs; entre aquestes molècules es troben el CGRP, l'FGFBP1, el TGF- β 1, la GAP-43 i l'agrina. Aquestes dues últimes són proteïnes que estan regulades durant el desenvolupament, que són sintetitzades als cossos cel·lulars de les MNs i que són transportades de manera axonal als terminals nerviosos, on són alliberades i hi exerceixen les seves funcions. Mentre que la GAP-43 és altament expressada als cons de creixement dels axons motors i està implicada en el creixement axonal del desenvolupament (Holahan, 2017), l'agrina té un paper crucial en la iniciació de la formació de les NMJs a través de l'agrupament d'AChRs i, també, en la preservació i la regeneració de les NMJs adultes (Samuel *et al.*, 2012; Tintignac *et al.*, 2015). D'altra banda, al sistema neuromuscular, ha estat proposat que el CGRP actua com a molècula comunicadora entre les MNs i els músculs esquelètics i que està implicat en el desenvolupament i el manteniment de les NMJs i de les cèl·lules musculars (Changeux *et al.*, 1992; Chung, 2018); el CGRP motoneuronal es troba sobreexpressat després d'una lesió a nivell neuronal, però els seus nivells elevats disminueixen amb la recuperació morfològica i funcional de la innervació motora, el que suggereix que aquest neuropèptid té una funció en el creixement

axonal i en la plasticitat de les NMJs (Arvidsson *et al.*, 1990; Haas *et al.*, 1990; Calderó *et al.*, 1992; Tarabal, 1996). En conjunt, aquestes tres molècules es troben en nivells baixos als músculs dels ratolins adults en comparació amb els animals joves, però es troben sobre-expressades als terminals motors nerviosos dels músculs vells. Aquests canvis en els nivells d'expressió d'aquestes molècules entre els diferents punts d'edat suggereixen que aquestes proteïnes tenen un paper en la regulació de l'*sprouting* compensatori dels terminals nerviosos i en la reinnervació dels músculs denervats durant l'envelliment.

Pel que fa a l'FGFBP1, s'ha vist que es troba sobre-expressada als músculs esquelètics d'un model d'SMA (Valsecchi *et al.*, 2015). Més recentment, s'ha descrit que les NMJs dels músculs adults normals expressen i concentren FGFBP1, però que els seus nivells disminueixen quan les NMJs sofreixen canvis fisiopatològics com els que es donen en el model SOD1^{G93A} d'ALS (Taetzsch *et al.*, 2017). Mentre que a les NMJs dels músculs dels animals joves s'observa una elevada immunoreactivitat per l'FGFBP1, vam trobar que aquesta disminuïa considerablement a les NMJs dels animals adults, però que augmentava de nou a les NMJs dels animals vells, especialment a les del múscul gràcil. Aquesta disminució dels nivells d'FGFBP1 als músculs dels animals vells es correlaciona amb el seu paper en la promoció de la reparació de les NMJs (Williams *et al.*, 2012) i suggereix que aquesta proteïna també intervé en el procés de remodelació de les NMJs relacionada amb l'envelliment i en la reinnervació muscular. Els nivells elevats d'FGFBP1 observats per immunohistoquímica als músculs dels animals vells difereixen dels resultats observats al grup de Valdez (Taetzsch *et al.*, 2017), que han descrit que hi ha una reducció significativa en els transcritps d'FGFBP1 al múscul TA dels ratolins de 24 mesos d'edat. Aquesta divergència podria ser explicada per les diferències en la metodologia i en els animals utilitzats en aquest darrer estudi (Taetzsch *et al.*, 2017), en el qual els nivells d'expressió d'FGFBP1 van ser examinats per PCR quantitativa en ratolins heterozigots (FGFBP1^{+/-}) *wild-type* vells i en KOs homozigots (FGFBP1^{-/-}). No obstant això, tal i com va ser descrit en aquest estudi, nosaltres també vam trobar nivells més alts de TGF-β1 als músculs dels animals joves i als dels animals vells que als dels animals adults.

Els nostres resultats mostren nivells augmentats tant de TGF- β 1 com d'FGFBP1 en els músculs vells *in vivo*, el que és difícil de relacionar amb la funció del TGF- β 1 en la inhibició d'FGFBP1 que ha estat descrita en cultius de miotubs (Taetzsch *et al.*, 2017). L'augment dels nivells de TGF- β 1, però, podria explicar alguns dels canvis observats als músculs dels animals vells. Les alteracions en l'expressió de TGF- β 1 i en les seves vies de senyalització han estat associades amb miopaties hereditàries i adquirides (Burks and Cohn, 2011). En relació amb això, s'ha vist que un augment dels nivells circulants de TGF- β 1 està associat amb la sarcopènia. El TGF- β 1 és un potent regulador de la cicatrització de les ferides en els teixits i de la fibrosi en el múscul esquelètic (Serrano and Muñoz-Cánoves, 2010) i sembla tenir un paper important en la promoció de la transformació dels mioblasts en cèl·lules miofibroblàstiques. Els miofibroblasts han estat implicats en la fibrosi dels teixits i podrien ser els responsables de l'augment de les proporcions de teixit connectiu que hem trobat als músculs dels animals vells. S'ha suggerit que els nivells elevats de TGF- β 1 a nivell sistèmic o local i la fibrosi muscular podrien interferir amb l'activació i la proliferació de les SCs, el que acaba conduint a defectes ulteriors en la regeneració de les miofibres i en el remodelatge muscular durant la sarcopènia (Carlson *et al.*, 2009; Burks and Cohn, 2011). En aquest sentit, caldria esperar que la reducció en la proporció d'SCs que hem trobat als músculs dels animals vells afectés de manera negativa la capacitat regenerativa dels músculs i agreugés la fibrosi muscular (Fry *et al.*, 2014, 2015). Es van trobar dipòsits de teixit connectiu a tots els músculs dels animals vells, tot i que van ser especialment aparents als músculs soli i EDL. Tot i que els dipòsits de teixit connectiu podrien contribuir a l'empitjorament del deteriorament de la funció muscular durant l'envelliment, la fibrosi podria explicar l'absència de canvis significatius relacionats amb l'envelliment en el pes dels músculs que hem observat als músculs soli i EDL malgrat la pèrdua del nombre de miofibres en aquests.

4. Els músculs esquelètics dels ratolins experimenten canvis relacionats amb l'edat, amb alteracions molt variables entre els diferents músculs

Sorprenentment, en comparació amb els ratolins adults, no es van trobar diferències significatives en la massa muscular en els músculs dels animals

vells encara que, en aquests últims, es va observar una certa disminució en el pes mitjà dels músculs soli i EDL. En conjunt, aquests resultats suggereixen que l'envelliment només té un petit impacte en la massa muscular dels ratolins, un resultat que difereix dels descrits en estudis realitzats en humans, però que coincideix amb les anàlisis prèvies realitzades en rates i ratolins vells; en aquests models, només s'han observat disminucions molt petites o moderades en la massa muscular en comparació amb les dels humans (Ballak *et al.*, 2014). A més, el fet que dos músculs distals, com ho són el soli i l'EDL, amb diferent composició en la seva tipologia de fibres, tinguin una major tendència a patir una reducció de la massa muscular amb l'envelliment que el TA, que també és un múscul distal, i que el gràcil, que és proximal, concorda amb la hipòtesi que els diferents músculs es veuen afectats en diferent grau durant el procés d'envelliment. Això suggereix que el desgast muscular en edats avançades podria estar més relacionat amb la localització muscular i amb la funció específica del múscul que no pas amb la tipologia de les miofibres que el constitueixen. De fet, altres grups han descrit diferències en la massa muscular relacionades amb l'envelliment entre els músculs de les potes posteriors (el soli i l'EDL) i els cervicals (l'esternocleidomastoïdal i el cleidomastoïdal), sense canvis en aquests últims (Sheard and Anderson, 2012). A més, ha estat demostrat en rates (Hashizume and Kanda, 1995) i també en humans (Oertel, 1986) que els músculs de les extremitats posteriors (cames) es veuen afectats d'una manera més greu que els músculs de les extremitats anteriors (braços). Els resultats obtinguts en el nostre estudi indiquen que fins i tot els músculs que es troben molt propers els uns dels altres, com ara el TA i l'EDL, també pateixen alteracions histològiques diferencials relacionades amb l'edat, amb una disminució significativa de la densitat de miofibres al múscul EDL i sense canvis evidents al múscul TA dels animals vells. Aquestes observacions són sorprenents degut al fet que els músculs TA i EDL estan formats per un tipus de fibres similar i pertanyen al mateix grup funcional i, en conseqüència, cabria esperar alteracions relacionades amb l'edat comparables en ambdós músculs. Aquestes observacions apunten al fet que la funció específica i el grau d'activitat dels músculs podrien ser els principals determinants de la severitat dels canvis musculars en la gent gran.

Tots els músculs vells que han estat analitzats en aquest estudi mostraven fibres amb els nuclis localitzats de manera central, amb proporcions molt més elevades als músculs TA i gràcil. L'augment del nombre de fibres amb nuclis localitzats centralment ha estat associat a diferents trastorns i processos de reparació musculars (Folker and Baylies, 2013). En el cas de la reparació muscular, la fusió de les SCs amb les miofibres danyades provoca la incorporació de nous nuclis, els quals es desplacen primer cap al centre de la miofibra abans de moure's cap a la seva perifèria. Així doncs, la presència de nuclis localitzats al centre de les miofibres ha estat utilitzada com un indicador de la seva regeneració. D'aquesta manera, el fet de trobar un nombre elevat de fibres amb nuclis centrals als músculs dels animals vells podria reflectir un procés de regeneració contínua de les miofibres en resposta a un deteriorament muscular persistent que es produeix durant l'envelliment. Els canvis en les NMJs que porten als cicles de denervació-reinnervació podrien ser un dels principals causants dels cicles de degeneració-regeneració en els músculs dels animals vells. No obstant això, no es pot descartar la possibilitat que la disfunció muscular en gent gran sigui deguda a una alteració intrínseca de les miofibres. Sigui com sigui, el fet de trobar miofibres amb els nuclis localitzats de manera central en tots els músculs dels animals vells, tot i que en diferents proporcions, suggereix que la regeneració de les miofibres durant l'envelliment és una característica general que es dona en diferents tipus de músculs de les extremitats posteriors, tot i que aquests presentin un grau de reparació molt variable. Una altra dada a destacar és que els músculs amb un menor nombre de miofibres amb nuclis centrals (el soli i l'EDL) també són els que mostraven una menor capacitat de regeneració de les seves miofibres, ja que en aquests dos músculs, sobretot a l'EDL, s'observa una reducció en la densitat de les miofibres en els animals vells, el que indica que el procés de regeneració no ha estat capaç de contrarestar completament la pèrdua de miofibres. De fet, als músculs amb un major percentatge de miofibres amb els nuclis localitzats de manera central (el TA i el gràcil) no es va detectar cap disminució en la densitat de les miofibres en els animals vells en comparació amb els adults.

Estudis realitzats amb models de rata han descrit que els canvis en la innervació muscular relacionats amb l'edat donen lloc a una disminució en la proporció de miofibres de tipus 2 i, especialment, d'aquelles que tenen un metabolisme glicolític (les de tipus 2B) (Larsson *et al.*, 1991, 1993; Schiaffino and Reggiani, 2011; McKinnon *et al.*, 2017). Les fibres de tipus 2 estan innervades per MNs ràpides, positives per a la metal·loproteïnasa de matriu (en anglès, *matrix metalloproteinase* [MMP])-9, i vulnerables (Kaplan *et al.*, 2014; Nijssen *et al.*, 2017). La disminució en la proporció de miofibres de tipus 2 relacionada amb l'envelliment sembla ser compensada per l'augment del nombre de miofibres de tipus 1 (Larsson *et al.*, 1991, 1993) que, innervades per MNs lentes, tenen un metabolisme oxidatiu i són més resistents a la degeneració. De fet, diverses anàlisis realitzades en diferents models de malalties de la MN han descrit que les MNs i les sinapsis que innerven les miofibres de tipus 2B degeneren abans que aquelles que innerven les miofibres de tipus 2A o 1 (Frey *et al.*, 2000; Vinsant *et al.*, 2013). Aquests resultats es correlacionen amb les diferències en el grau de plasticitat de les sinapsis, ja que aquelles que presenten una baixa capacitat d'*sprouting* són les més vulnerables, mentre que les que reaccionen amb un *sprouting* prominent són selectivament resistents (Frey *et al.*, 2000). Així, s'ha especulat que la transició de les fibres de tipus 2 a tipus 1 es dona com a conseqüència d'una pèrdua preferent de les MNs ràpides i vulnerables, el que acaba provocant una denervació de les fibres de tipus 2B i la seva posterior innervació per part de MNs lentes i resistents, que tenen una gran capacitat d'*sprouting*. De fet, en models animals de malalties de la MN com ara els ratolins SMA, ha estat descrit un canvi de miofibres de tipus 2 a tipus 1 (Lee *et al.*, 2011; Cerveró *et al.*, 2016). Com que els músculs esquelètics amb un contingut més alt de fibres de tipus 1 són més resistents al desgast que aquells amb una composició predominant de fibres de tipus 2 (Minnaard *et al.*, 2005; Schiaffino and Reggiani, 2011), ha estat proposat que aquesta transició de fibres de tipus 2 a fibres de tipus 1 en aquestes malalties podria resultar de l'activació d'un mecanisme compensatori miogènic oxidatiu metabòlic amb l'objectiu de limitar la disfunció muscular. En aquest estudi, els nostres resultats han mostrat que un mecanisme similar probablement no té lloc als músculs dels ratolins C57BL/6JRj amb l'envelliment. De manera contrària al que ha estat descrit en

estudis previs realitzats amb rates velles, amb excepció del múscul gràcil, nosaltres no hem observat cap augment significatiu en la proporció de fibres de tipus 1 als músculs dels animals vells. Per contra, es va observar una tendència a una disminució relacionada amb l'edat en la quantitat de fibres de tipus 1 en tots els músculs distals de les extremitats posteriors, essent aquesta reducció especialment important en el múscul EDL. A més, al múscul soli dels animals vells, de contracció lenta, es va veure que la proporció de fibres de tipus 2A augmentava de forma considerable i que es veia acompanyada d'una reducció en el nombre de fibres de tipus 1 i 2B. Aquests resultats es correlacionen amb els descrits prèviament, indicant que la transició de fibres de tipus 2 a fibres de tipus 1 durant l'envelliment no és una característica comuna compartida per tots els músculs, amb grans diferències entre els que són de contracció ràpida i els que són de contracció lenta (Sheard and Anderson, 2012). A més, els nostres resultats suggereixen que també hi ha diferències en la transició del tipus de miofibra relacionada amb l'envelliment entre músculs que tenen una composició similar pel que fa a la tipologia de fibres, però amb una topografia diferent al llarg de les extremitats; per exemple, els músculs distals TA i EDL i el múscul proximal gràcil, essent tots ells de contracció ràpida. En relació amb això, és important assenyalar que hi ha una inconsistència considerable entre els resultats provinents de diferents estudis descrits en la literatura. En alguns estudis realitzats amb músculs humans s'ha vist que hi ha una transició de fibres de tipus 2 a fibres de tipus 1 acompanyada d'una reducció del nombre de fibres de tipus 2, mentre que altres estudis han descrit, de manera contrària, un augment del nombre de fibres de tipus 2 relacionat amb l'edat; en altres treballs, però, no s'han trobat canvis en els perfils de la tipologia de fibres musculars amb l'envelliment (Larsson, 1978; Lexell *et al.*, 1988; Häkkinen *et al.*, 1998; Frontera *et al.*, 2000). S'han trobat disparitats similars en les transicions de tipus de fibra relacionades amb l'edat en estudis realitzats en rosegadors (Brown and Hasser, 1996; Carter *et al.*, 2010; Deschenes *et al.*, 2010; Sheard and Anderson, 2012). L'absència d'un patró consistent en les alteracions del tipus de fibra que hem trobat als músculs dels animals vells es correlaciona amb l'absència de la mort d'un nombre important de MNs i, més concretament, amb la manca d'una disminució en la proporció de MNs vulnerables (positives per a MMP-9) (Blasco *et al.*, 2020), tal com es mostra en estudis realitzats en el

nostre laboratori. En conjunt, els resultats aquí exposats suggereixen que els canvis en el tipus de fibra es donen més aviat com a conseqüència de la disfunció de les MNs que no pas de la seva degeneració i mort.

L'acumulació de lipofuscina a les cèl·lules postmitòtiques està extensament acceptada com a un marcador d'envelliment (Brunk and Terman, 2002; Gray and Woulfe, 2005). En aquest sentit, la presència de grànuls de lipofuscina a les cèl·lules cerebrals, especialment a l'escorça cerebral i a les àrees motores, és una de les característiques més establertes com pròpies de l'envelliment (Farin and Porta, 2002). En un estudi realitzat en ratolins i en micos rhesus vells, es va analitzar el contingut d'agregats de lipofuscina a les MNs com a marcador d'envelliment neuronal (Maxwell *et al.*, 2018a); els resultats mostren que hi ha un grau variable d'acumulació de lipofuscina en les diferents MNs, el que suggereix que no totes elles envelleixen a un ritme comparable ni al mateix temps. De manera similar, els nostres resultats mostren que, mentre que s'observa una absència total de lipofuscina en els músculs dels animals C57BL/6JRj adults, els dels ratolins vells mostren acumulacions d'aquest pigment al citosol de les miofibres. No obstant això, vam observar variacions notables en les quantitats de lipofuscina presents entre els diferents músculs examinats, on el múscul de contracció lenta solí va mostrar la proporció més baixa del pigment lipídic, mentre que el múscul de contracció ràpida gràcil mostrava la més alta. Aquestes diferències es correlacionen amb el fet que les miofibres de contracció ràpida, les de tipus 2A i 2B, eren aquelles que mostraven els continguts més alts de lipofuscina als músculs vells, mentre que les fibres de tipus 1 estaven pràcticament desproveïdes dels grànuls del pigment. Això indica que les fibres vulnerables (les de tipus 2A i 2B) són més propenses a envellir que les de tipus 1. Ha estat descrit que hi ha una acumulació d'un gran nombre de grànuls de lipofuscina en diferents distròfies musculars en humans i en ratolins *mdx* joves deficientes en distrofina (Nakae *et al.*, 2004; Terrill *et al.*, 2013; Nakae and Stoward, 2016). S'ha proposat que l'acumulació de lipofuscina cel·lular es dona com a conseqüència d'un procés d'estrès oxidatiu que fa que els components cel·lulars no puguin ser degradats pels enzims lisosomals (Brunk and Terman, 2002). De fet, el tractament de ratolins joves *mdx* amb antioxidants redueix l'acumulació de lipofuscina i millora

la funció muscular. Així doncs, l'oxidació, com a una causa de la formació de lipofuscina, també sembla estar relacionada amb una disminució de la capacitat de degradació lisosomal, el que es podria donar amb l'envelliment o sota condicions patològiques. No obstant això, encara no està clar si la lipofuscina realment interfereix amb la funció cel·lular normal o si, per contra, l'acumulació d'aquest pigment és solament el resultat d'una alteració cel·lular prèvia. Diverses evidències suggereixen que es pot produir un bucle de retroalimentació perjudicial que condueix a una inhibició de les vies lisosomal i ubiquitina-proteasoma com a resultat de l'agregació de la lipofuscina. Sigui com sigui, sembla factible que la lipofuscina acumulada faci que les cèl·lules siguin més vulnerables als estímuls patològics i que faci disminuir l'adaptabilitat cel·lular i la seva capacitat de resposta a les lesions (Brunk and Terman, 2002). En el cas de les MNs envellides, l'acumulació de lipofuscina no es troba associada amb l'atròfia o la mort cel·lulars, tot i que sí que sembla estar correlacionada amb les alteracions que es donen durant l'envelliment als terminals nerviosos motors (Maxwell *et al.*, 2018b). A més, tot i que l'agregació de lipofuscina és significativament més elevada a les fibres musculars sense nuclis d'ubicació central, la presència d'un cert nombre de fibres amb nuclis en el centre indica l'existència d'unes miofibres que han estat recentment regenerades i que encara contenen el pigment de l'edat. S'hauria d'analitzar si els grànuls de lipofuscina presents en aquestes fibres es correlacionen o no amb una funció cel·lular deteriorada ja existent en els primers estadis del programa miogènic.

En resum, l'envelliment als ratolins s'acompanya de defectes en les habilitats motores i de canvis en els patrons miogràfics. Tal com s'ha vist al nostre grup, aquestes alteracions es donen en absència d'una mort significativa de MNs (Blasco *et al.*, 2020), però es troben associades a una desaferentació de les MNs i a una gliosi reactiva, que possiblement contribueix al deteriorament de les MNs. Per tant, la disfunció de les MNs relacionada amb l'edat, més que no pas la seva mort, podria ser la responsable de les alteracions estructurals i moleculars als axons motors, les NMJs i els músculs esquelètics que es troben en la senescència. El procés de l'envelliment sembla comportar continus cicles de degeneració-regeneració motora i d'*sprouting*, tal i com es dedueix pels

signes dels axons motors alterats morfològicament en ratolins adults i per l'augment del nombre d'axons petits mielinitzats agrupats que es troben a les arrels ventrals dels ratolins de mitjana edat. Tot i que els diferents tipus de músculs vells examinats comparteixen certes característiques indicatives d'un procés d'envelliment, el perfil d'algunes alteracions és molt variable entre els diferents músculs. Aquesta variabilitat es dona fins i tot entre músculs que tenen una localització propera i amb una composició de fibres d'una tipologia similar, el que suggereix que el grau d'activitat i la funció específica dels músculs, més que no pas la seva topografia i la tipologia de les seves fibres, tenen un gran impacte en els canvis musculars relacionats amb l'edat. Caldria realitzar més investigacions per extreure conclusions més fiables sobre els mecanismes patogènics relatius a les alteracions neuromusculars que es donen durant l'envelliment i sobre de quina manera contribueixen al procés de la sarcopènia.

5. Les dietes suplementades amb cacau o amb te verd mitiguen els canvis regressius que tenen lloc en el sistema neuromuscular del ratolí durant l'envelliment

Per tal d'avaluar els ingredients nutricionals que poden pal·liar la progressió de la sarcopènia, vam analitzar els efectes de dos extractes vegetals enriquits amb dos flavonoides, les catequines de l'extracte del te verd o els flavanols del cacau. Es van examinar els seus beneficis potencials sobre els músculs envellits i els canvis que experimenta l'NMJ amb l'edat. Els resultats van indicar que la ingesta de flavonoides de l'extracte del te verd i del cacau podia mitigar alguns dels fenòmens regressius neuromusculars relacionats amb l'envelliment que es produeixen en ratolins a través de la millora del grau d'innervació muscular i de maduració de les NMJs i del retardament d'alguns canvis potencialment nocius en els músculs esquelètics.

Tot i que els suplementes d'extracte del te verd o cacau van ser capaços de fer augmentar la taxa de supervivència dels ratolins, no es va observar un impacte significatiu en la disminució de l'activitat motora ni en les alteracions electrofisiològiques que es troben associades a la senescència. Aquests resultats diferien dels descrits en estudis anteriors on es mostren els beneficis de les catequines de l'extracte del te verd i dels flavanols del cacau sobre l'activitat física i la funció muscular en models de disfunció muscular de rata i de ratolí. En rates velles, ha estat descrit que l'extracte del te verd millora la funció muscular després d'un període perllongat de manca d'ús (Alway *et al.*, 2015). En un model murí d'envelliment accelerat, les catequines de l'extracte del te verd juntament amb l'exercici físic habitual milloren el rendiment físic (Murase *et al.*, 2008). Altres estudis han revelat que l'extracte del te verd i la seva principal catequina, l'EGCg, milloren la funció muscular i la capacitat de resistència en models de ratolí de distròfia muscular de Duchenne (Dorchies *et al.*, 2006; Call *et al.*, 2008). La disparitat entre aquests i els nostres resultats podria ser deguda a les diferències en els models animals utilitzats i a les proves que s'han fet servir per avaluar el comportament motor i la funció muscular. A més, cal contemplar la possibilitat que les proves utilitzades en aquest estudi per avaluar el fenotip motor dels ratolins, tot i que han permès detectar una disminució de la funció muscular relacionada amb l'edat (Blasco *et*

al., 2020), no són prou sensibles per detectar millores subtils en l'activitat motora promogudes per la intervenció dietètica. D'altra banda, un estudi anterior ha demostrat que la flavanol-epicatequina del cacau podria millorar el declivi de l'activitat física relacionada amb l'edat en ratolins (Si *et al.*, 2019). No obstant això, aquesta intervenció es va dur a terme durant un període de temps més llarg (~9 mesos) que el del nostre estudi (~5 mesos); a més, a l'estudi de Si *et al.*, el període de dietes es va iniciar als 20 mesos d'edat, mentre que al nostre treball es va fer als 22 mesos, pel que els canvis relacionats amb l'envelliment al començament del període de les dietes podrien ser més accentuats en aquest últim. També cal tenir en compte que Si *et al.* van utilitzar una dosi diferent a la proporcionada al nostre treball. Així doncs, és possible que siguin necessàries unes dosis més altes dels flavanols del cacau i uns períodes d'intervenció més llargs que els utilitzats en el nostre estudi per tal de tenir un impacte significatiu en el rendiment motor. Malgrat això, en el present estudi es van identificar canvis estructurals positius en el sistema neuromuscular, així com en les vies d'energia i de regeneració musculars, un clar indicatiu de l'impacte positiu que tenen els compostos que nosaltres hem testat sobre el múscul esquelètic.

6. Les dietes enriquides amb te verd i amb cacau reverteixen alguns dels canvis que els músculs esquelètics dels ratolins experimenten amb l'edat

En el present estudi, no vam observar cap efecte de la suplementació amb extracte del te verd o amb cacau en la massa, la mida o la densitat de les fibres o el percentatge de teixit connectiu en els músculs dels animals vells. No obstant això, ambdós suplementos dietètics van prevenir la disminució del nombre d'SCs associada amb l'edat (Brack *et al.*, 2005; Chakkalakal *et al.*, 2012; Blasco *et al.*, 2020), van reduir la densitat de les fibres amb nuclis centrals (pres com un indicador del procés de degeneració-regeneració muscular) (Folker and Baylies, 2013; Sacco and Puri, 2015; Kougiyas *et al.*, 2018; Blasco *et al.*, 2020) i van atenuar l'acumulació de lipofuscina, el pigment de l'edat, a les miofibres (Blasco *et al.*, 2020) de forma significativa. Les SCs són essencials per a la regeneració dels músculs esquelètics (Lepper *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2011; Sambasivan *et al.*, 2011), i la disminució del nombre

i el deteriorament de les funcions de les SCs relacionats amb l'edat afecta negativament la capacitat de substituir i/o reparar les miofibres malmeses (Alway, Myers, *et al.*, 2014; Sousa-Victor *et al.*, 2015). Tanmateix, tot i que les SCs són crucials per a la formació de noves fibres durant el procés regeneratiu dels músculs envellits, aquestes no semblen tenir cap tipus d'impacte en la mida de les fibres durant l'envelliment (Fry *et al.*, 2015). Això es correlaciona amb el fet que no s'observin canvis significatius en l'àrea de les seccions transversals de les miofibres en els animals que havien rebut una suplementació amb flavonoides, tot i que sí que es va observar un augment en la proporció d'SCs als músculs. Estudis anteriors han demostrat que l'RC és capaç d'impedir la pèrdua de miofibres relacionada amb l'edat (Valdez *et al.*, 2010) i de millorar la funció de les SCs i la reparació muscular (Cerletti *et al.*, 2012). Això indica que els factors metabòlics són crítics en la regulació del renovament de les miofibres i de l'activitat miogènica de les SCs. Els efectes beneficiosos de l'RC sobre els músculs vells semblen estar associats a la millora de la biogènesi mitocondrial i del consum d'oxigen resultants d'aquesta intervenció dietètica (Cerletti *et al.*, 2012). D'altra banda, ha estat descrit que l'extracte del te verd promou de forma significativa la proliferació i la diferenciació de les SCs després d'un període de desús muscular (Alway, Bennett, *et al.*, 2014). Aquesta acció, que sembla estar mitjançada principalment per la inhibició de l'estrès oxidatiu, és capaç d'atenuar la pèrdua de massa muscular, però no de millorar la recuperació muscular després de la inactivitat física (Alway, Bennett, *et al.*, 2014). També s'ha demostrat que l'extracte del te verd promou l'activació de les SCs tant en ratolins com en humans d'edat avançada, tot i que aquest efecte ha estat atribuït principalment a la reducció dels nivells de miostatina induïda pel compost (Gutierrez-Salmean *et al.*, 2014). En aquest estudi, també hem confirmat l'eficàcia de l'extracte del te verd en el manteniment de la població d'SCs en ratolins vells i també s'han proporcionat proves que evidencien que els flavanols del cacau tenen un impacte similar en la prevenció de la pèrdua d'SCs relacionada amb l'edat. Els beneficis d'aquests flavonoides sobre els músculs envellits podrien ser una conseqüència de la millora i de l'acceleració del renovament o de la reparació de les miofibres, i això podria estar promogut per l'augment de la proliferació de les SCs, tal i com ha estat descrit anteriorment per a les catequines del te verd

(Alway *et al.*, 2014). No obstant això, cal tenir en compte la possibilitat que els suplementes dietètics que s'han testat en aquest estudi promoguin una acció benèfica alentint el procés d'envelliment dels músculs i, d'aquesta manera, disminuint el nombre d'SCs utilitzades per a la regeneració muscular. De fet, els músculs envellits dels animals que van rebre els flavonoides van mostrar un augment significatiu en la proporció de fibres aparentment joves, amb una reducció de l'acumulació de lipofuscina i una disminució de la proporció de nuclis localitzats en el centre. Les propietats antioxidants que han estat atribuïdes als flavonoides (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005; Malaguti *et al.*, 2013; Magrone *et al.*, 2017) plantegen la possibilitat que els beneficis de l'extracte del te verd i del cacau puguin ser deguts als seus efectes protectors vers les ROS. Les ROS són subproductes resultants de la fosforilació oxidativa mitocondrial que es troben augmentats als músculs envellits a causa de la disfunció mitocondrial (Chabi *et al.*, 2008). D'altra banda, els mitocondris tenen un paper crucial en la regulació de l'apoptosi als músculs senescents (Dirks and Leeuwenburgh, 2002; Marzetti *et al.*, 2008). Per tant, la desregulació mitocondrial relacionada amb l'edat sembla ser un factor crític que contribueix al desgast muscular en la gent gran (Hood *et al.*, 2019; Anagnostou and Hepple, 2020). El PGC-1 α es considera un factor de transcripció essencial en la biogènesi i la funció mitocondrials (Lin *et al.*, 2013), i ha estat descrit que la seva sobre-expressió fa augmentar la massa mitocondrial (Wu *et al.*, 1999). A més, el PGC-1 α també és fonamental per regular un gran nombre de gens implicats en la morfologia i les funcions musculars a través de les seves interaccions amb vies de senyalització que controlen l'homeòstasi mitocondrial i l'equilibri proteic (Ji and Kang, 2015). Ha estat demostrat que tant els nivells com l'activitat del PGC-1 α es troben reduïts als músculs envellits, tot i que aquestes troballes no estan lliures de certa controvèrsia (Ji and Kang, 2015). La regulació redox és un mecanisme important per al control de l'activitat del PGC-1 α . De fet, les ROS podrien regular negativament el PGC-1 α als músculs esquelètics envellits, tal com ha estat descrit en els miòcits cardíacs (Álvarez-Guardia *et al.*, 2010). D'altra banda, hi ha evidències que indiquen que el PGC-1 α és capaç d'activar l'expressió de proteïnes antioxidants endògenes (incloent la superòxid dismutasa i la glutatió peroxidasa), d'exercir efectes antiinflamatoris, de promoure la neovascularització i de protegir els músculs

senescents de l'augment de processos destructius com ara la proteòlisi, l'autofàgia o l'apoptosi (St-Pierre *et al.*, 2006; Arany *et al.*, 2008; Wenz *et al.*, 2009). L'entrenament físic crònic fa augmentar els nivells de PGC-1 α al múscul esquelètic (Derbré *et al.*, 2012; Ruas *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013). En aquest estudi, vam veure que els animals alimentats tant amb flavanols de l'extracte del te verd com del cacau mostraven un augment en el contingut muscular de PGC-1 α en comparació amb els controls. Aquest augment en els nivells de PGC-1 α al final del període de suplementació amb qualsevol de les dues dietes provades es va observar tant al múscul ràpid TA com al múscul lent soli, tot i que els efectes sobre l'expressió d'aquest factor de transcripció van ser lleugerament més notoris amb l'extracte del te verd que no pas amb la suplementació amb cacau. De fet, no vam trobar canvis significatius en el contingut muscular de PGC-1 α entre el grup control i el del cacau, si bé aquest últim sí que va mostrar un augment notable de l'expressió del factor de transcripció tant al múscul TA com al soli. Tal com s'ha mencionat anteriorment, les reduccions en l'expressió de PGC-1 α perjudiquen la dinàmica, l'estructura i la funció mitocondrials als músculs (Hood *et al.*, 2019). Tot i que diversos reguladors metabòlics, a més del PGC-1 α , podrien estar implicats en el manteniment de l'homeòstasi mitocondrial, els resultats aquí mostrats suggereixen que l'efecte beneficiós de les suplementacions amb extracte del te verd o amb cacau sobre el contingut mitocondrial als músculs envellits podria ser degut, almenys en part, a la seva capacitat per restablir els nivells de PGC-1 α .

7. Les dietes enriquides amb te verd o amb cacau són capaces de pal·liar algunes de les alteracions observades en les NMJs dels animals vells

L'envelliment s'acompanya de canvis tant estructurals com moleculars a les NMJs (Larsson *et al.*, 2019). Tot i que encara no està clar si aquests canvis es donen com a conseqüència d'alteracions progressives relacionades amb l'edat ja sigui a les MNs o bé a les fibres musculars, ha estat demostrat sense cap tipus d'ambigüitat que hi ha una proporció important d'NMJs en models murins d'envelliment que mostren signes de denervació parcial o completa i canvis compatibles amb una remodelació estructural (Valdez *et al.*, 2010, 2012; Chai *et al.*, 2011; Willadt *et al.*, 2016, 2018; Blasco *et al.*, 2020). En aquest treball,

s'ha vist que algunes de les alteracions que s'observen a les NMJs dels ratolins vells podrien ser mitigades amb qualsevol de les dues dietes enriquides amb flavanols que han estat testades. De fet, en comparació amb els controls, els músculs dels animals alimentats tant amb els suplementos d'extracte del te verd com del flavanol del cacau van mostrar una reducció significativa de la proporció d'NMJs denervades o parcialment innervades. A més, també es va veure que els músculs dels grups de l'extracte del te verd o del cacau mostraven una disminució significativa del nombre de terminals nerviosos motors fragmentats, amb un augment del nombre de plaques amb un aspecte semblant a un *pretzel*, indicatiu d'un major grau de maduresa. No obstant això, cal tenir en ment que alguns estudis indiquen que, en comparació amb les NMJs dels ratolins, les dels humans són estructuralment més estables al llarg de tota la vida adulta, mostrant escassos signes de degeneració o remodelació amb l'edat (Jones *et al.*, 2017). Aquest aspecte s'ha de tenir en compte pel que fa a l'aplicabilitat en humans dels resultats obtinguts en rosegadors.

Aquestes millores promogudes pels suplementos dietètics sobre les alteracions en les NMJs amb l'edat no s'acompanyen de canvis significatius en l'expressió de CGRP, GAP-43 o agrina, tres molècules regulades durant el desenvolupament i que estan implicades en el desenvolupament, el manteniment i la plasticitat de les NMJs. Totes tres proteïnes es sintetitzen als cossos cel·lulars de les MNs i són transportades axonalment i alliberades als terminals nerviosos.

El CGRP és un neuropèptid que és altament expressat a les NMJs durant el desenvolupament; tot i que el seu contingut disminueix amb la maduració sinàptica, d'altra banda, es troba sobre-expressat durant l'*sprouting* nerviós i la reinnervació muscular (Matteoli *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1995; Tarabal, 1996; Tarabal *et al.*, 1996). L'agrina, a través de l'agrupament dels AChRs, juga un paper essencial en la iniciació de la formació de les NMJs i, més tard, en el manteniment i la regeneració de les NMJs adultes (Samuel *et al.*, 2012). La GAP-43 s'expressa als cons de creixement i el seu contingut augmenta durant el creixement i la plasticitat dels axons motors i en la regeneració que es dona després d'una lesió axonal (Holahan, 2017). Nosaltres hem posat de manifest que el contingut d'aquestes proteïnes sinàptiques disminueix durant el curs del

desenvolupament postnatal, amb unes NMJs als ratolins adults que presenten uns nivells de proteïna significativament més baixos que els dels animals joves; no obstant això, la seva expressió augmenta de nou a les NMJs dels ratolins vells, el que suggereix un paper d'aquestes molècules en la promoció de l'*sprouting* nerviós compensatori i en la reinnervació dels músculs denervats en l'envelliment (Blasco *et al.*, 2020). Vam observar que els flavanols de l'extracte del te verd i del cacau només van promoure petits augments en els nivells de CGRP i d'agrina que es troben de forma regular a les NMJs dels animals vells. A més, no es van observar diferències significatives en l'expressió de GAP-43 a les NMJs dels animals suplementats amb flavonoides, tot i que es van evidenciar reduccions moderades en la quantitat d'aquesta proteïna quan es va determinar en extractes de múscul total per *western blot*. En general, aquests resultats indiquen que, almenys a les concentracions i els règims dietètics utilitzats en el nostre estudi, aquests suplementos no són capaços de modular significativament l'expressió d'aquestes proteïnes relacionades amb el manteniment de les NMJs. La modesta disminució del contingut de GAP-43 que es dona als músculs dels grups de l'extracte del te verd i del cacau es correlaciona, d'alguna manera, amb la reducció de l'*sprouting* dels terminals nerviosos observada a les NMJs després de la suplementació dietètica i suggereix que, en aquelles condicions en què les NMJs dels ratolins vells són més estables, els nervis intramusculars tenen una necessitat disminuïda de fer *sprouting* per tal de mantenir uns nivells adients d'innervació.

Segons el nostre coneixement, aquest és el primer estudi que informa de l'atenuació de les alteracions a les NMJs associades a l'edat promoguda per dietes enriquides amb flavonoides.

En resum, la ingesta dietètica dels flavonoides del te verd o del cacau va ser capaç d'augmentar de manera significativa la taxa de supervivència dels ratolins vells i de prevenir alguns dels canvis estructurals regressius que es donen durant la senescència en el múscul esquelètic i l'NMJ (Figura D-1 i Figura D-2). Ambdues dietes van preservar la innervació i el nivell de maduració de les NMJs, van frenar el progrés de la senescència dels músculs esquelètics i van millorar la seva capacitat regenerativa, tal i com es dedueix pel fenotip cel·lular d'aspecte jove de les miofibres, la reducció aparent dels

cicles de degeneració-regeneració de les miofibres, la preservació de la població d'SCs miogèniques i l'augment de l'expressió de PGC-1 α .

Les diferències entre els efectes induïts per les dietes suplementades amb l'extracte del te verd i amb cacau sobre els canvis que es donen en el múscul amb l'edat (Blasco *et al.*, 2020) suggereixen que hi podria haver un major benefici amb la combinació de diferents flavonoides per contrarestar les alteracions derivades de l'envelliment en el sistema neuromuscular. A més, l'associació de la suplementació amb flavonoides junt amb l'exercici físic s'hauria de tenir en consideració en la teràpia de la sarcopènia. Cal realitzar més investigacions en el futur per tal d'estudiar si dosis més altes dels flavonoides i/o si unes intervencions a terminis més llargs podrien ser més eficaces en la restauració de les funcions motrius alterades per l'envelliment. En tot cas, els resultats que aquí es mostren obren una porta a l'ús dels flavonoides com a possibles estratègies nutricionals per al tractament dels canvis neuromusculars relacionats amb la senescència responsables de la sarcopènia.

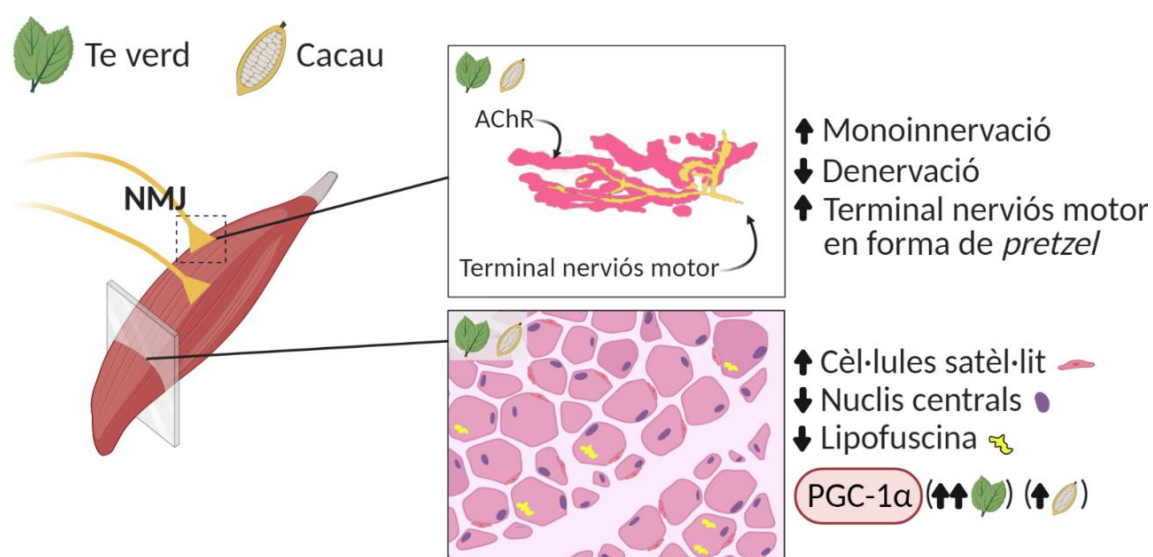


Figura D-2. Visió general dels principals beneficis promoguts per la suplementació dietètica amb extracte del te verd i amb cacau sobre els canvis relacionats amb l'envelliment al sistema neuromuscular dels ratolins C57BL/6JRj. Els suplementes de l'extracte del te verd i del cacau fan disminuir significativament la denervació muscular i els signes de degeneració de les NMJs; ambdós suplementes fan augmentar la proporció d'NMJs que presenten una única innervació, fan disminuir la fragmentació dels terminals nerviosos motors i fan augmentar el nombre dels que presenten un aspecte més

saludable, en forma de *pretzel*. A més, les dietes enriquides amb extracte del te verd i cacau provoquen un augment de la densitat d'SCs i una reducció tant dels dipòsits de lipofuscina a les miofibres com de la proporció d'aquestes que mostren nuclis centrals. Els nivells de PGC-1 α , un factor regulador clau per a la biogènesi mitocondrial, es mostren augmentats en els animals alimentats amb les dietes suplementades amb extracte del te verd o amb cacau. Imatge creada amb BioRender.

CONCLUSIONS

1. Les unions neuromusculars (NMJs) dels animals vells experimenten processos de denervació-reinnervació, a més d'un fenomen d'*sprouting* dels terminals nerviosos, com a mecanisme compensatori per tal de mantenir la força muscular.
2. Els músculs dels animals vells presenten un augment significatiu de CGRP, FGFBP1, TGF- β 1, GAP-43 i agrina, molècules relacionades amb els processos de desenvolupament, maduració, plasticitat i estabilitat de les NMJs.
3. L'envelliment muscular s'acompanya de signes de degeneració-regeneració muscular de les fibres musculars, d'una disminució de la proporció de cèl·lules satèl·lit (SCs), que intervenen en la regeneració de les miofibres danyades, i d'un augment del contingut de teixit connectiu, indicatiu de fibrosi muscular.
4. Els músculs dels ratolins vells mostren acumulacions de lipofuscina, el pigment de l'edat, al citosol de les miofibres, essent més abundants en els múscul de contracció ràpida que en els de contracció lenta.
5. La conducció dels impulsos nerviosos es troba reduïda en edats avançades.
6. Amb l'envelliment, es produeix una reducció del nombre de fibres mielinitzades als nervis perifèrics.

7. Els suplementes d'extracte del te verd o cacau, rics en flavonoides, fan augmentar la taxa de supervivència dels ratolins.
8. Ambdós suplementes dietètics analitzats prevenen la disminució del nombre d'SCs associada amb l'edat, redueixen la densitat de les fibres que mostren signes de degeneració-regeneració i atenuen l'acumulació de lipofuscina a les miofibres.
9. Els animals vells alimentats tant amb flavonoides derivats del te verd com del cacau mostren un augment en el contingut muscular de PGC-1 α , un regulador transcripcional de la biogènesi mitocondrial, en comparació amb els controls.
10. Els animals vells alimentats tant amb els suplementes d'extracte del te verd com del cacau mostren un augment del nombre d'NMJs innervades i del seu grau de maduresa en comparació amb els animals sotmesos a una dieta estàndard.
11. Malgrat els efectes beneficiosos dels flavonoides derivats del te verd i del cacau sobre els canvis regressius que presenta el sistema neuromuscular durant l'envelliment, les millores estructurals observades en les NMJs i la musculatura esquelètica no s'acompanyen d'una millora del deteriorament motor ni de les alteracions electrofisiològiques associats a la senescència.

BIBLIOGRAFIA

Aagaard, P., Suetta, C., Caserotti, P., Magnusson, S.P. and Kjær, M. (2010) 'Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure', 20(1), pp. 49–64. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.01084.x>.

Abellan Van Kan, G. (2009) 'Epidemiology and consequences of sarcopenia', *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 13(8), pp. 708–712. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12603-009-0201-z>.

Abuharbeid, S., Czubyko, F. and Aigner, A. (2006) 'The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(9), pp. 1463–1468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.10.017>.

Akaaboune, M., Culican, S.M., Turney, S.G. and Lichtman, J.W. (1999) 'Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo', *Science*, 286(5439), pp. 503–507. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.503>.

Allen, D.L., Roy, R.R. and Reggie Edgerton, V. (1999) 'Myonuclear domains in muscle adaptation and disease', *Muscle and Nerve*, 22(10), pp. 1350–1360. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199910\)22:10<1350::aid-mus3>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199910)22:10<1350::aid-mus3>3.0.co;2-8).

Allen, D.L., Yasui, W., Tanaka, T., Ohira, Y., Nagaoka, S., Sekiguchi, C., Hinds, W.E., Roy, R.R. and Edgerton, V.R. (1996) 'Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight', *Journal of Applied Physiology*, 81(1), pp. 145–151. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.1.145>.

Almada, A.E. and Wagers, A.J. (2016) 'Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing, and disease', *Physiology & behavior*, 17(5), pp. 267–279. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.7>.

Álvarez-Guardia, D., Palomer, X., Coll, T., Davidson, M.M., Chan, T.O., Feldman, A.M., Laguna, J.C. and Vázquez-Carrera, M. (2010) 'The p65 subunit of NF- κ B binds to PGC-1, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells', *Cardiovascular Research*, 87(3), pp. 449–458. Available at: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq080>.

Alway, S.E., Bennett, B.T., Wilson, J.C., Edens, N.K. and Pereira, S.L. (2014) 'Epigallocatechin-3-gallate improves plantaris muscle recovery after disuse in aged rats', *Experimental Gerontology*, 50(1), pp. 82–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.011>.

Alway, S.E., Bennett, B.T., Wilson, J.C., Sperringer, J., Mohamed, J.S., Edens, N.K. and Pereira, S.L. (2015) 'Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats', *Journal of Applied Physiology*, 118(3), pp. 319–330. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00674.2014>.

Alway, S.E., Myers, M.J. and Mohamed, J.S. (2014) 'Regulation of satellite cell function in sarcopenia', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(246), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00246>.

Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S. and Evans, R.M. (1982) 'Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products', *Nature*, 298(5871), pp. 240–244. Available at: <https://doi.org/10.1038/298240a0>.

Amenta, A.R., Creely, H.E., Mercado, M.L.T., Hagiwara, H., Mckechnie, B.A., Lechner, B.E., Rossi, S.G., Wang, Q., Owens, R.T., Marrero, E., Mei, L., Hoch, W., Young, M.F., Mcquillan, D.J., Rotundo, R.L. and Fallon, J.R. (2012) 'Biglycan Is an Extracellular MuSK Binding Protein Important for Synapse Stability', 32(7), pp. 2324–2334. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4610-11.2012>.

Anagnostou, M.E. and Hepple, R.T. (2020) 'Mitochondrial Mechanisms of Neuromuscular Junction Degeneration with Aging', *Cells*, 9(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9010197>.

Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. and Kurland, C.G. (1998) 'The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria', *Nature*, 396(6707), pp. 133–140. Available at: <https://doi.org/10.1038/24094>.

Andreose, J.S., Sala, C. and Fumagalli, G. (1994) 'Immunolocalisation of chromogranin B, secretogranin II, calcitonin gene-related peptide and substance P at developing and adult neuromuscular synapses', *Neuroscience Letters*, 174(2), pp. 177–180. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90015-9).

Andrews, L.D. and Brizzee, K.R. (1986) 'Lipofuscin in Retinal Pigment Epithelium of Rhesus Monkey: Lack of Diminution With Centrophenoxine Treatment', *Neurobiology of Aging*, 7, pp. 107–113. Available at: [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(86\)90148-x](https://doi.org/10.1016/0197-4580(86)90148-x).

Angaut-Petit, D., Molgó, J., Comella, J.X., Faille, L. and Tabti, N. (1990) 'Terminal

sprouting in mouse neuromuscular junctions poisoned with botulinum type a toxin: Morphological and electrophysiological features', *Neuroscience*, 37(3), pp. 799–808. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90109-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90109-H).

Ansved, T. and Larsson, L. (1989) 'Effects of ageing on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat', *Journal of Biomechanics*, 22(10), p. 981. Available at: [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(89\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0021-9290(89)90103-6).

Ansved, T. and Larsson, L. (1990) 'Quantitative and qualitative morphological properties of the soleus motor nerve and the L5 ventral root in young and old rats. Relation to the number of soleus muscle fibres', *Journal of the Neurological Sciences*, 96(2–3), pp. 269–282. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(90\)90138-D](https://doi.org/10.1016/0022-510X(90)90138-D).

Ansved, T. and Larsson, L. (1994) 'Histochemical properties of aging rat skeletal muscle', *Pathobiology of the Aging Rat*, pp. 521–534.

Ansved, T., Wallner, P. and Larsson, L. (1991) 'Spatial distribution of motor unit fibres in fast-and slow-twitch rat muscles with special reference to age', *Acta Physiologica Scandinavica*, 143(3), pp. 345–354. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1991.tb09242.x>.

Arany, Z., Foo, S.Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., Baek, K.H., Rosenzweig, A. and Spiegelman, B.M. (2008) 'HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α ', *Nature*, 451(7181), pp. 1008–1012. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature06613>.

Arany, Z., Lebrasseur, N., Morris, C., Smith, E., Yang, W., Ma, Y., Chin, S. and Spiegelman, B.M. (2007) 'The Transcriptional Coactivator PGC-1 β Drives the Formation of Oxidative Type IIX Fibers in Skeletal Muscle', *Cell Metabolism*, 5(1), pp. 35–46. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.12.003>.

Arent, S.M., Senso, M., Golem, D.L. and McKeever, K.H. (2010) 'The effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: A randomized, double-blind, crossover study', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 7, pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/1550-2783-7-11>.

Arimura, S., Okada, T., Tezuka, T., Chiyo, T., Kasahara, Y., Yoshimura, T., Motomura, M., Yoshida, N., Beeson, D., Takeda, S. and Yamanashi, Y. (2014) 'DOK7 gene

therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction', *Science*, 345(6203), pp. 1505–1508. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1250744>.

Armstrong, D. and Koppang, N. (1981) 'Ceroid-lipofuscinosis, a model for aging', *Age Pigments*, pp. 355–382.

Arvidsson, U., Johnson, H., Piehl, F., Cullheim, S., Hökfelt, T., Risling, M., Terenius, L. and Ulfhake, B. (1990) 'Peripheral nerve section induces increased levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in axotomized motoneurons', *Journal of Sound and Vibration*, 141(3), p. 537. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-460x\(90\)90652-g](https://doi.org/10.1016/0022-460x(90)90652-g).

Ascenzi, F., Barberi, L., Dobrowolny, G., Villa Nova Bacurau, A., Nicoletti, C., Rizzuto, E., Rosenthal, N., Scicchitano, B.M. and Musarò, A. (2019) 'Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia', *Aging Cell*, 18(3), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12954>.

Ash, C.E. and Merry, B.J. (2011) 'The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation', *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(1–2), pp. 43–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.12.001>.

Augusto, V., Padovani, C.R. and Campos, G.E.R. (2004) 'Skeletal Muscle Fiber Types in C57BL6J Mice', *Brazilian Journal of Morphological Science*, 21(2), pp. 89–94.

Azzouz, M., Leclerc, N., Gurney, M., Warter, J.-M., Poindron, P. and Borg, J. (1997) 'Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis', *Muscle & Nerve*, 20(1), pp. 45–51. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199701\)20:1<45::aid-mus6>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199701)20:1<45::aid-mus6>3.0.co;2-h).

Bacchi, S., Kramer, P. and Chalk, C. (2018) 'Autoantibodies to Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 4 in Double Seronegative Myasthenia Gravis: A Systematic Review', *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 45(1), pp. 62–67. Available at: <https://doi.org/10.1017/cjn.2017.253>.

Balagopal, P., Schimke, J.C., Ades, P., Adey, D. and Nair, K.S. (2001) 'Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280(2), pp. 203–208. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.2.e203>.

Baldwin, K.M. and Haddad, F. (2002) 'Effects of different activity and inactivity

paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle', *Journal of Applied Physiology*, 90(1), pp. 345–357.

Ballice-Gordon, R.J. and Lichtman, J.W. (1994) 'Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors', *Nature*, pp. 519–524. Available at: <https://doi.org/10.1038/372519a0>.

Ballak, S.B., Busé-Pot, T., Harding, P.J., Yap, M.H., Deldicque, L., de Haan, A., Jaspers, R.T. and Degens, H. (2016) 'Blunted angiogenesis and hypertrophy are associated with increased fatigue resistance and unchanged aerobic capacity in old overloaded mouse muscle', *Age*, 38(2). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9894-1>.

Ballak, S.B., Degens, H., de Haan, A. and Jaspers, R.T. (2014) 'Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: A comparison of muscle aging in men and male rodents', *Ageing Research Reviews*, 14(1), pp. 43–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.005>.

Ballak, S.B., Jaspers, R.T., Deldicque, L., Chalil, S., Peters, E.L., de Haan, A. and Degens, H. (2015) 'Blunted hypertrophic response in old mouse muscle is associated with a lower satellite cell density and is not alleviated by resveratrol', *Experimental Gerontology*, 62, pp. 23–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.12.020>.

Barik, A., Lu, Y., Sathyamurthy, A., Bowman, A., Shen, C., Li, L., Xiong, W.C. and Mei, L. (2014) 'LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance', *Journal of Neuroscience*, 34(42), pp. 13892–13905. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1733-14.2014>.

Barker, D. and Ip, M.C. (1966) 'Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and de-afferentated skeletal muscle', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 163(993), pp. 538–554. Available at: <https://doi.org/10.1098/rspb.1966.0008>.

Barnéoud, P., Lolivier, J., Sanger, D.J., Scatton, B. and Moser, P. (1997) 'Quantitative motor assessment in FALS mice: A longitudinal study', *NeuroReport*, 8(13), pp. 2861–2865. Available at: <https://doi.org/10.1097/00001756-199709080-00012>.

Barthó, L., Lembeck, F. and Holzer, P. (1987) 'Calcitonin gene-related peptide is a potent relaxant of intestinal muscle', *European Journal of Pharmacology*, 135(3), pp. 449–451. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(87\)90699-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90699-6).

Bass, A., Gutmann, E. and Hanzlíková, V. (1975) 'Biochemical and histochemical

changes in energy supply enzyme pattern of muscles of the rat during old age', *Gerontologia*, 21(1), pp. 31–45. Available at: <https://doi.org/10.1159/000212028>.

Bassey, E.J., Fiatarone, M.A., O'Neill, E.F., Kelly, M., Evans, W.J. and Lipsitz, L.A. (1992) 'Leg extensor power and functional performance in very old men and women', *Clinical Science*, 82(3), pp. 321–327. Available at: <https://doi.org/10.1042/cs0820321>.

Basu, S., Sladeczek, S., Martinez, I., Peña, D., Akaaboune, M. and Martin, T.F.J. (2015) 'CLASP2-dependent microtubule capture at the neuromuscular junction membrane requires LL5 β and actin for focal delivery of acetylcholine receptor vesicles', *Molecular Biology of the Cell*, 26(5), pp. 938–951. Available at: <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-06-1158>.

Baumer, A., Zhang, C., Linnane, A.W. and Nagley, P. (1994) 'Age-related human mtDNA deletions: A heterogeneous set of deletions arising at a single pair of directly repeated sequences', *American Journal of Human Genetics*, 54(4), pp. 618–630.

Bayat, V., Jaiswal, M. and Bellen, H.J. (2011) 'The BMP signaling pathway at the Drosophila neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases', *Current Opinion in Neurobiology*, 21(1), pp. 182–188. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.014>.The.

Belluardo, N., Westerblad, H., Mudó, G., Casabona, A., Bruton, J., Caniglia, G., Pastoris, O., Grassi, F. and Ibáñez, C.F. (2001) 'Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(1), pp. 56–67. Available at: <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1001>.

Benowitz, L.I. and Routtenberg, A. (1987) 'A membrane phosphoprotein associated with neural development, axonal regeneration, phospholipid metabolism, and synaptic plasticity', *Trends in Neurosciences*, 10(12), pp. 527–532. Available at: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(87\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0166-2236(87)90135-4).

Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A. and Gori, Z. (2003) 'The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically', *Biomedicine ann Pharmacotherapy*, 57(5–6), pp. 203–208. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00048-9).

Berger, A., Mayr, J.A., Meierhofer, D., Fötschl, U., Bittner, R., Budka, H., Grethen, C., Huemer, M., Kofler, B. and Sperl, W. (2003) 'Severe depletion of mitochondrial DNA in spinal muscular atrophy', *Acta Neuropathologica*, 105(3), pp. 245–251. Available at:

<https://doi.org/10.1007/s00401-002-0638-1>.

Berger, M.J. and Doherty, T.J. (2010) 'Sarcopenia: Prevalence, mechanisms, and functional consequences', *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, 37, pp. 94–114. Available at: <https://doi.org/10.1159/000319997>.

Between, A.R., Diameter, A. and Determined, N. (1934) 'A relation between axon diameter and myelination determined by measurement of myelinated root fibres', *The Journal of Comparative Neurology*, 60(3), pp. 437–471. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.900600305>.

Beyer, K., Stout, K., Fukuda, D., Jajtner, A., Townsend, J., Church, D., Wang, R., Riffe, J., Muddle, T., Herrlinger, K. and Hoffman, J. (1999) 'Impact of Polyphenol Supplementation on Acute and Chronic Response to Resistance Training', *Journal of Strength and Conditioning Research*, 31(11), pp. 2945–2954. Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002104>.

Biral, D., Betto, R., Danieli-Betto, D. and Salviati, G. (1988) 'Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle', *Biochemical Journal*, 250(1), pp. 307–308. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2500307>.

Bishop, D.L., Misgeld, T., Walsh, M.K., Gan, W.B. and Lichtman, J.W. (2004) 'Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding', *Neuron*, 44(4), pp. 651–661. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.026>.

Blake, A.J., Morgan, K., Bendall, M.J., Dallosso, H., Ebrahim, S.B., Arie, T.H., Fentem, P.H. and Bassey, E.J. (1988) 'Falls by elderly people at home: prevalence and associated factors', *Age and Ageing*, 17(6), pp. 365–372. Available at: <https://doi.org/10.1093/ageing/17.6.365>.

Blasco, A., Gras, S., Mòdol-Caballero, G., Tarabal, O., Casanovas, A., Piedrafita, L., Barranco, A., Das, T., Pereira, S.L., Navarro, X., Rueda, R., Esquerda, J.E. and Calderó, J. (2020) 'Motoneuron deafferentation and gliosis occur in association with neuromuscular regressive changes during ageing in mice', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 11(6), pp. 1628–1660. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12599>.

Blough, E.R. and Linderman, J.K. (2000) 'Lack of skeletal muscle hypertrophy in very aged male Fischer 344 x Brown Norway rats', *Journal of Applied Physiology*, 88(4), pp. 1265–1270. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1265>.

Böök, S., Goldstein, M., Fischer-Colbrie, R. and Dahlström, A. (1989) 'Calcitonin gene-

related peptide and chromogranin a: Presence and intra-axonal transport in lumbar motor neurons in the rat, a comparison with synaptic vesicle antigens in immunohistochemical studies', *Neuroscience*, 30(2), pp. 479–501. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90267-4).

Boreham, C.A.G., Watt, P.W., Williams, P.E., Merry, B.J., Goldspink, G. and Goldspink, D.F. (1988) 'Effects of ageing and chronic dietary restriction on the morphology of fast and slow muscles of the rat', *Journal of Anatomy*, 157, pp. 111–125. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1261945/>.

Borgesius, N.Z., de Waard, M.C., van der Pluijm, I., Omrani, A., Zondag, G.C.M., van der Horst, G.T.J., Melton, D.W., Hoeijmakers, J.H.J., Jaarsma, D. and Elgersma, Y. (2011) 'Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair', *Journal of Neuroscience*, 31(35), pp. 12543–12553. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1589-11.2011>.

Bowtell, J.L., Sumners, D.P., Dyer, A., Fox, P. and Mileva, K.N. (2011) 'Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 43(8), pp. 1544–1551. Available at: <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31820e5adc>.

Brack, A.S., Bildsoe, H. and Hughes, S.M. (2005) 'Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy', *Journal of Cell Science*, 118(20), pp. 4813–4821. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.02602>.

Brack, A.S. and Muñoz-Cánoves, P. (2016) 'The ins and outs of muscle stem cell aging', *Skeletal Muscle*, 6(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0072-z>.

Bradford, M.M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>.

Bradlee, M.L., Mustafa, J., Singer, M.R. and Moore, L.L. (2017) 'High-protein foods and physical activity protect against age-related muscle loss and functional decline', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(1), pp. 88–94. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glx070>.

Brewer, P.A. and Lynch, K. (1986) 'Stimulation-associated changes in frog neuromuscular junctions. A quantitative ultrastructural comparison of rapid-frozen and

chemically fixed nerve terminals', *Neuroscience*, 17(3), pp. 881–895. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90052-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90052-7).

Brocca, L., McPhee, J.S., Longa, E., Canepari, M., Seynnes, O., De Vito, G., Pellegrino, M.A., Narici, M. and Bottinelli, R. (2017) 'Structure and function of human muscle fibres and muscle proteome in physically active older men', *Journal of Physiology*, 595(14), pp. 4823–4844. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP274148>.

Brody, I.A. (1976) 'Regulation of isometric contraction in skeletal muscle', *Experimental Neurology*, 50(3), pp. 673–683. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90036-4).

Brooks, N.E., Schuenke, M.D. and Hikida, R.S. (2009) 'Ageing influences myonuclear domain size differently in fast and slow skeletal muscle of rats', *Acta Physiologica*, 197(1), pp. 55–63. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01983.x>.

Brooks, S., Kaur, S., Starr, B.S. and Starr, M.S. (1996) 'Motor actions of eliprodil in the normal and monoamine-depleted mouse: a role in the treatment of Parkinson's disease?', *Journal of Neural Transmission*, 103(6), pp. 737–748. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01271233>.

Brooks, S. V. and Faulkner, J.A. (1994) 'Isometric, shortening, and lengthening contractions of muscle fiber segments from adult and old mice', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 267(2 Pt 1), pp. 507–513. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.2.c507>.

Brooks, S.P. and Dunnett, S.B. (2009) 'Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide', *Nature Reviews Neuroscience*, 10(7), pp. 519–529. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2652>.

Brown, M. and Hasser, E.M. (1996) 'Complexity of age-related change in skeletal muscle', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 51(2). Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/51A.2.B117>.

Brown, M.C. (1984) 'Sprouting of motor nerves in adult muscles: a recapitulation of ontogeny', *Trends in Neurosciences*, 7(1), pp. 10–14. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(84\)80180-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(84)80180-0).

Brown, M.C., Holland, R.L. and Hopkins, W.G. (1981) 'Motor nerve sprouting', *Annual review of neuroscience*, 4(1953), pp. 17–42. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.04.030181.000313>.

Brown, M.C., Hopkins, W.G. and Keynes, R.J. (1982) 'Comparison of effects of

denervation and botulinum toxin paralysis on muscle properties in mice', *The Journal of Physiology*, 327(1), pp. 29–37. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014217>.

Brun, A. and Brunk, U. (1970) 'Histochemical indications for lysosomal localization of heavy metals in normal rat brain and liver', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18(11), pp. 820–827. Available at: <https://doi.org/10.1177/18.11.820>.

Bruna, J., Udina, E., Alé, A., Vilches, J.J., Vynckier, A., Monbaliu, J., Silverman, L. and Navarro, X. (2010) 'Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice', *Experimental Neurology*, 223(2), pp. 599–608. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.02.006>.

Brunetti, M., Miscena, A., Salviati, A. and Gaiti, A. (1987) 'Effect of aging on the rate of axonal transport of choline-phosphoglycerides', *Neurochemical Research*, 12(1), pp. 61–65. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00971365>.

Brunk, U. (1989) 'On the origin of lipofuscin; the iron content of residual bodies, and the relation of these organelles to the lysosomal vacuome. A study on cultured human glial cells', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 266, pp. 313–320. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-5339-1>.

Brunk, U. and Ericsson, J.L. (1972) 'Electron Microscopical Studies on Rat Brain Neurons. Localization of Acid Phosphatase and Mode of Formation of Lipofuscin Bodies', *Journal of Ultrastructure Research*, 38(1), pp. 1–15. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(72\)90080-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(72)90080-9).

Brunk, U., Ericsson, J.L.E., Pontén, J. and Westermarck, B. (1973) 'Residual bodies and "aging" in cultured human glia cells. Effect of entrance into phase 3 and prolonged periods of confluence', *Experimental Eye Research*, 79(1), pp. 1–14.

Brunk, Ulf T. and Terman, A. (2002) 'Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function', *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), pp. 611–619. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00959-0).

Brunk, Ulf T and Terman, A. (2002) 'The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis', *European Journal of Biochemistry*, 269(8), pp. 1996–2002. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x>.

Bruusgaard, J.C., Johansen, I.B., Egner, I.M., Rana, Z.A. and Gundersen, K. (2010) 'Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on

detraining', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), pp. 15111–15116. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913935107>.

Bruusgaard, J.C., Liestø, K. and Gundersen, K. (2006) 'Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice', *Journal of Applied Physiology*, 100(6), pp. 2024–2030. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00913.2005>.

Bruusgaard, J.C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K. and Gundersen, K. (2003) 'Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo', *Journal of Physiology*, 551(2), pp. 467–478. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045328>.

Bua, E., Johnson, J., Herbst, A., DeLong, B., McKenzie, D., Salamat, S. and Aiken, J.M. (2006) 'Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers', *American Journal of Human Genetics*, 79(3), pp. 469–480. Available at: <https://doi.org/10.1086/507132>.

Buchthal, F., Rosenfalck, A. and Behse, F. (1984) 'Sensory potentials of normal and diseased nerves', *Peripheral Neuropathy*, pp. 981–1105.

Buetler, T.M., Renard, M., Offord, E.A., Schneider, H. and Ruegg, U.T. (2002) 'Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species', *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), pp. 749–753. Available at: <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.4.749>.

Burgess, R.W., Nguyen, Q.T., Son, Y., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. and Louis, S. (1999) 'Alternatively Spliced Isoforms of Nerve- and Muscle-Derived Agrin: Their Roles at the Neuromuscular Junction', *Neuron*, 23(1), pp. 33–44. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80751-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80751-5).

Burkholder, T., Foltz, C.J., Karlsson, E., Linton, G.C. and Smith, J.M. (2012) 'Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice', *Current Protocols in Mouse Biology*, 2, pp. 145–165. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217.Health>.

Burks, T.N. and Cohn, R.D. (2011) 'Role of TGF- β 1 signaling in inherited and acquired myopathies', *Skeletal Muscle*, 1(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-19>.

Cabe, P.A., Tilson, H.A., Mitchell, C.L. and Dennis, R. (1978) 'A simple recording grip strength device', *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 8(1), pp. 101–102.

Available at: [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(78\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0091-3057(78)90131-4).

Caccia, M.R., Harris, J.B. and Johnson, M.A. (1979) 'Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents', *Muscle & Nerve*, 2(3), pp. 202–212. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.880020308>.

Calderó, J., Casanovas, A., Sorribas, A. and Esquerda, J.E. (1992) 'Calcitonin gene-related peptide in rat spinal cord motoneurons: Subcellular distribution and changes induced by axotomy', *Neuroscience*, 48(2), pp. 449–461. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90504-U](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90504-U).

Call, J.A., Voelker, K.A., Wolff, A. V., McMillan, R.P., Evans, N.P., Hulver, M.W., Talmadge, R.J. and Grange, R.W. (2008) 'Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract', *Journal of Applied Physiology*, 105(3), pp. 923–932. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00028.2008>.

Campo, A. del, Contreras-Hernández, I., Castro-Sepúlveda, M., Campos, C.A., Figueroa, R., Tevy, M.F., Eisner, V., Casas, M. and Jaimovich, E. (2018) 'Muscle function decline and mitochondria changes in middle age', *Aging*, 10(1), pp. 34–55. Available at: <https://doi.org/10.18632/aging.101358>.

Canepari, M., Pellegrino, M.A., D'Antona, G. and Bottinelli, R. (2010) 'Single muscle fiber properties in aging and disuse', *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 20(1), pp. 10–19. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.00965.x>.

Cantó, C., Jiang, L.Q., Deshmukh, A.S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., Zierath, J.R. and Auwerx, J. (2010) 'Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle', *Cell Metabolism*, 11(3), pp. 213–219. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.006>.

Cantor, S., Zhang, W., Delestrée, N., Remédio, L., Mentis, G.Z. and Burden, S.J. (2018) 'Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody', *eLife*, 7, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.34375>.

Cardasis, C.A. and Padykula, H.A. (1981) 'Ultrastructural evidence indicating reorganization at the neuromuscular junction in the normal rat soleus muscle', *The Anatomical Record*, 200(1), pp. 41–59. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1092000105>.

Carlson, B.M. (1973) 'The regeneration of skeletal muscle - a review', *American Journal of Anatomy*, 137(2), pp. 119–149. Available at: <https://doi.org/10.1002/aja.1001370202>.

Carlson, B.M. (2004) 'Denervation and the Aging of Skeletal Muscle', *Basic Appl Myol*, 14(3), pp. 135–139.

Carlson, M.E., Conboy, M.J., Hsu, M., Barchas, L., Jeong, J., Agrawal, A., Mikels, A.J., Schaffer, D. V and Conboy, I.M. (2009) 'Relative roles of TGF- β 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses', *Aging Cell*, 8(6), pp. 676–689. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00517.x>.

Carnio, S., LoVerso, F., Baraibar, M.A., Longa, E., Khan, M.M., Maffei, M., Reischl, M., Canepari, M., Loeffler, S., Kern, H., Blaauw, B., Friguet, B., Bottinelli, R., Rudolf, R. and Sandri, M. (2014) 'Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging', *Cell Reports*, 8(5), pp. 1509–1521. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.061>.

Caroni, P. and Becker, M. (1992) 'The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF 1', *Journal of Neuroscience*, 12(10), pp. 3849–3861. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-10-03849.1992>.

Carter, E.E., Thomas, M.M., Murynka, T., Rowan, S.L., Wright, K.J., Huba, E. and Hepple, R.T. (2010) 'Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats', *Experimental Gerontology*, 45(9), pp. 662–670. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.04.001>.

Carter, R.J., Lione, L.A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G.P., Dunnett, S.B. and Jennifer Morton, A. (1999) 'Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation', *Journal of Neuroscience*, 19(8), pp. 3248–3257. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-08-03248.1999>.

Carvalho, M. De, Dengler, R., Eisen, A., England, J.D., Kaji, R., Kimura, J., Mills, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J. and Swash, M. (2008) 'Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS', *Clinical Neurophysiology*, 119(3), pp. 497–503. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.09.143>.

Casarin, A., Giorgi, G., Pertegato, V., Siviero, R., Cerqua, C., Doimo, M., Basso, G., Sacconi, S., Cassina, M., Rizzuto, R., Brosel, S., M Davidson, M., Dimauro, S., Schon,

E.A., Clementi, M., Trevisson, E. and Salviati, L. (2012) 'Copper and bezafibrate cooperate to rescue cytochrome c oxidase deficiency in cells of patients with sco2 mutations', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), pp. 2–9. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-21>.

Ceballos, D., Cuadras, J., Verdú, E. and Navarro, X. (1999) 'Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve', *Journal of Anatomy*, 195(Pt 4), pp. 563–576. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19540563.x>.

Ceccarelli, B. and Hurlbut, W.P. (1980) 'Vesicle hypothesis of the release of quanta of acetylcholine', *Physiological Reviews*, 60(2), pp. 396–441. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.2.396>.

Cerletti, M., Jang, Y.C., Finley, L.W.S., Haigis, M.C. and Wagers, A.J. (2012) 'Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function', *Cell Stem Cell*, 10(5), pp. 515–519. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.002>.

Cerutti, R., Pirinen, E., Lamperti, C., Marchet, S., Sauve, A.A., Li, W., Leoni, V., Schon, E.A., Dantzer, F., Auwerx, J., Viscomi, C. and Zeviani, M. (2014) 'NAD⁺-dependent activation of Sirt1 corrects the phenotype in a mouse model of mitochondrial disease', *Cell Metabolism*, 19(6), pp. 1042–1049. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.001>.

Cerveró, C., Montull, N., Tarabal, O., Piedrafita, L., Esquerda, J.E. and Calderó, J. (2016) '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', *Neurotherapeutics*, 13(1), pp. 198–216. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0399-x>.

Chabi, B., Ljubicic, V., Menzies, K.J., Huang, J.H., Saleem, A. and Hood, D.A. (2008) 'Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle', *Aging Cell*, 7(1), pp. 2–12. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x>.

Chai, R.J., Vukovic, J., Dunlop, S., Grounds, M.D. and Shavlakadze, T. (2011) 'Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle', *PLoS ONE*, 6(12), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028090>.

Chakkalakal, J. V., Jones, K.M., Basson, M.A. and Brack, A.S. (2012) 'The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence', *Nature*, 490(7420), pp. 355–360. Available at:

<https://doi.org/10.1038/nature11438>.

Changeux, J., Duclert, A. and Sekine, S. (1992) 'Calcitonin Gene-Related Peptides and Neuromuscular Interactions', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 657(1), pp. 361–378. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb22783.x>.

Cheek, D.B. (1985) 'The control of cell mass and replication. The DNA unit - a personal 20-year study', *Early Human Development*, 12(3), pp. 211–239. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(85\)90144-6](https://doi.org/10.1016/0378-3782(85)90144-6).

Chernov, A. V., Dolkas, J., Hoang, K., Angert, M., Srikrishna, G., Vogl, T., Baranovskaya, S., Strongin, A.Y. and Shubayev, V.I. (2015) 'The calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 initiate the early inflammatory program in injured peripheral nerves', *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), pp. 11771–11784. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.622316>.

Chopek, J.W. and Gardiner, P.F. (2010) 'Life-long caloric restriction: Effect on age-related changes in motoneuron numbers, sizes and apoptotic markers', *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(10), pp. 650–659. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.09.001>.

Chung, A.M. (2018) 'Calcitonin gene-related peptide (CGRP): Role in peripheral nerve regeneration', *Reviews in the Neurosciences*, 29(4), pp. 369–376. Available at: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0060>.

Chung, T., Park, J.S., Kim, S., Montes, N., Walston, J. and Höke, A. (2017) 'Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline', *Muscle and Nerve*, 55(6), pp. 894–901. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.25267>.

Collins, V., Arborgh, B., Brunk, U. and Schellens, J. (1980) 'Phagocytosis and degradation of rat liver mitochondria by cultivated human glial cells', *Laboratory Investigation*, 42(2), pp. 209–216.

Cosgrove, B.D., Gilbert, P.M., Porpiglia, E., Mourkioti, F., Lee, S.P., Corbel, S.Y., Llewellyn, M.E., Delp, S.L., Blau, H.M. and Author, N.M. (2014) 'Rejuvenation of the aged muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles', *Nature Medicine*, 20(3), pp. 255–264. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3464.Rejuvenation>.

Cottrell, L. (1940) 'Histologic variations with age in apparently normal peripheral nerve trunks', *Archives of Neuropsychology*, 43(6), pp. 1138–1150. Available at: <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1940.02280060083004>.

Cristea, A., Qaisar, R., Edlund, P.K., Lindblad, J., Bengtsson, E. and Larsson, L. (2010) 'Effects of aging and gender on the spatial organization of nuclei in single human skeletal muscle cells', *Aging Cell*, 9(5), pp. 685–697. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00594.x>.

Crosbie, R.H., Lebakken, C.S., Holt, K.H., Venzke, D.P., Straub, V., Lee, J.C., Grady, R.M., Chamberlain, J.S., Sanes, J.R. and Campbell, K.P. (1999) 'Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex', *Journal of Cell Biology*, 145(1), pp. 153–165. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.145.1.153>.

Crusio, W.E. (2001) 'Genetic dissection of mouse exploratory behaviour', *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), pp. 127–132. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00280-7).

Cuervo, A.M. (2003) 'Autophagy and aging--when "all you can eat" is yourself', *Science of aging knowledge environment*, 2003(36), p. 25. Available at: <https://doi.org/10.1126/sageke.2003.36.pe25>.

Cuervo, A.M., Palmer, A., Rivettz, A.J. and Knecht, E. (1995) 'Degradation of proteasomes by lysosomes in rat liver', *European Journal of Biochemistry*, 227(3), pp. 792–800. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20203.x>.

D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Adami, R., Rossi, R., Naccari Carlizzi, C., Canepari, M., Saltin, B. and Bottinelli, R. (2003) 'The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres', *Journal of Physiology*, 552(2), pp. 499–511. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046276>.

Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P. and Robitaille, R. (2014) 'Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions', *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), pp. 703–718. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn3821>.

Davoodi, J., Markert, C.D., Voelker, K.A., Hutson, S.M. and Grange, R.W. (2012) 'Nutrition Strategies to Improve Physical Capabilities in Duchenne Muscular Dystrophy', *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 23(1), pp. 187–199. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2011.11.010>.

Day, K., Gabi, S., Shearer, A. and Yablonka-Reuveni, Z. (2011) 'The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny', *Developmental Biology*, 340(2), pp. 330–343. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.006>.The.

Decary, S., Ben Hamida, C., Mouly, V., Barbet, J.P., Hentati, F. and Butler-Browne,

G.S. (2000) 'Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children', *Neuromuscular Disorders*, 10(2), pp. 113–120. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(99\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(99)00093-0).

DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M. V, Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., Smith, C., Distefano, P.S., Glass, D.J., Burden, S.J. and Yancopoulos, G.D. (1996) 'The Receptor Tyrosine Kinase MuSK Is Required for Neuromuscular Junction Formation In Vivo', *Cell*, 85(4), pp. 501–512. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81251-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81251-9).

Degens, H. (2010) 'The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting', *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 20(1), pp. 28–38. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2009.01018.x>.

Degens, H. and Alway, S.E. (2003) 'Skeletal muscle function and hypertrophy are diminished in old age', *Muscle and Nerve*, 27(3), pp. 339–347. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.10314>.

Degens, H. and Alway, S.E. (2006) 'Control of Muscle Size During Disuse, Disease, and Aging', *International Journal of Sports Medicine*, 27(2), pp. 94–99. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2005-837571>.

Derbré, F., Gomez-Cabrera, M.C., Nascimento, A.L., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V.E., Tresguerres, J.A.F., Fuentes, T., Gratas-Delamarche, A., Monsalve, M. and Viña, J. (2012) 'Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise training', *Age*, 34(3), pp. 669–679. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9264-y>.

Deschenes, M.R., Roby, M.A., Eason, M.K. and Harris, M.B. (2010) 'Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers', *Experimental Gerontology*, 45(5), pp. 389–393. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.007>.

Deveci, D. and Egginton, S. (2002) 'Muscle ischaemia in rats may be relieved by overload-induced angiogenesis', *Experimental Physiology*, 87(4), pp. 479–488. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2002.tb00061.x>.

Dillin, A., Hsu, A.L., Arantes-Oliveira, N., Lehrer-Graiwer, J., Hsin, H., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Kenyon, C. (2002) 'Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development', *Science*, 298(5602), pp. 2398–2401. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1077780>.

Dirks, A. and Leeuwenburgh, C. (2002) 'Apoptosis in skeletal muscle with aging', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(2), pp. 519–527. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00458.2001>.

Dirks, A.J. and Leeuwenburgh, C. (2006) 'Caloric restriction in humans: Potential pitfalls and health concerns', *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(1), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.09.001>.

Distefano, G., Standley, R.A., Zhang, X., Carnero, E.A., Yi, F., Cornell, H.H. and Coen, P.M. (2018) 'Physical activity unveils the relationship between mitochondrial energetics, muscle quality, and physical function in older adults', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9(2), pp. 279–294. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12272>.

Doherty, T.J., Vandervoort, A.A. and Brown, W.F. (1995) 'Effects of ageing on the motor unit', *Progress in Neurobiology*, 45(5). Available at: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)98601-Z](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)98601-Z).

Dong, X., Milholland, B. and Vijg, J. (2016) 'Evidence for a limit to human lifespan', *Nature*, 538(7624), pp. 257–259. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19793>.

Dorchies, O.M., Wagner, S., Vuadens, O., Waldhauser, K., Buetler, T.M., Kucera, P. and Ruegg, U.T. (2006) 'Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 290(2), pp. 616–625. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00425.2005>.

Dorfman, L.J. and Bosley, T.M. (1979) 'Age-related changes in peripheral and central nerve conduction man', *Neurology*, 29(1), pp. 38–44. Available at: <https://doi.org/10.1212/wnl.29.1.38>.

Drai, D., Kafkafi, N., Benjamini, Y., Elmer, G. and Golani, I. (2001) 'Rats and mice share common ethologically relevant parameters of exploratory behavior', *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), pp. 133–140. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00290-x](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00290-x).

Drey, M., Sieber, C.C., Degens, H., Mcphee, J., Korhonen, M.T. and Ganse, B. (2014) 'Relation between muscle mass, motor units and type of training in master athletes', *Clinical P*, 36(1), pp. 70–76. Available at: <https://doi.org/10.1111/cpf.12195>.

Dunham, N.W. and Miya, T.S. (1957) 'A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice', *journal of the American Pharmaceutical*

Association, 46(3), pp. 208–209. Available at: <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>.

Edgerton, V.R. and Roy, R.R. (1991) 'Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function', *Journal of Biomechanics*, 24(SUPPL. 1), pp. 123–133. Available at: [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(91\)90383-X](https://doi.org/10.1016/0021-9290(91)90383-X).

Edington, D.W., Cosmas, A.C. and McCafferty, W.B. (1972) 'Exercise and longevity: evidence for a threshold age', *Journal of gerontology*, 27(3), pp. 341–343. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/27.3.341>.

Edström, L. and Larsson, L. (1987) 'Effects of age on contractile and enzyme-histochemical properties of fast- and slow-twitch single motor units in the rat', *Optometry and Vision Science*, 34(9), pp. 463–477. Available at: <https://doi.org/10.1097/00006324-195709000-00001>.

Einsiedel, L.J. and Luff, A.R. (1992) 'Effect of partial denervation on motor units in the ageing rat medial gastrocnemius', *Journal of the Neurological Sciences*, 112(1–2), pp. 178–184. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(92\)90148-E](https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90148-E).

Elleder, M., Sokolová, J. and Hřebíček, M. (1997) 'Follow-up study of subunit c of mitochondrial ATP synthase (SCMAS) in Batten disease and in unrelated lysosomal disorders', *Acta Neuropathologica*, 93(4), pp. 379–390. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004010050629>.

Emma, F., Montini, G., Parikh, S.M. and Salviati, L. (2016) 'Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury', *Nature Reviews Nephrology*, 12(5), pp. 267–280. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.214>.

Engel, A.G., Shen, X.M., Selcen, D. and Sine, S.M. (2015) 'Congenital myasthenic syndromes: Pathogenesis, diagnosis, and treatment', *The Lancet Neurology*, 14(4), pp. 420–434. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70201-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70201-7).

Englund, D.A., Kirn, D.R., Koochek, A., Zhu, H., Trivison, T.G., Reid, K.F., Von Berens, Å., Melin, M., Cederholm, T., Gustafsson, T. and Fielding, R.A. (2018) 'Nutritional supplementation with physical activity improves muscle composition in mobility-limited older adults, the VIVE2 study: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(1), pp. 95–101. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glx141>.

Eusebi, F., Farini, D., Grassi, F., Monaco, L. and Ruzzier, F. (1988) 'Effects of calcitonin gene-related peptide on synaptic acetylcholine receptor-channels in rat muscle fibres', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 234(1276), pp.

333–342. Available at: <https://doi.org/10.1098/rspb.1988.0052>.

Evans, W.J. (1993) 'Exercise and protein metabolism', *World review of nutrition and dietetics*, 71, pp. 21–33. Available at: <https://doi.org/10.1159/000422347>.

Evans, W.J. (1995) 'Exercise, Nutrition, and Aging', *Clinics in Geriatric Medicine*, 11(4), pp. 725–734. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0749-0690\(18\)30267-2](https://doi.org/10.1016/s0749-0690(18)30267-2).

Fagg, G.E., Scheff, S.W. and Cotman, C.W. (1981) 'Axonal sprouting at the neuromuscular junction of adult and aged rats', *Experimental Neurology*, 74(3), pp. 847–854. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90257-0](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90257-0).

Fahim, M.A., Holley, J.A. and Robbins, N. (1983) 'Scanning and light microscopic study of age changes at a neuromuscular junction in the mouse', *Journal of Neurocytology*, 12(1), pp. 13–25. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01148085>.

Faitg, J., Leduc-Gaudet, J.P., Reynaud, O., Ferland, G., Gaudreau, P. and Gouspillou, G. (2019) 'Effects of aging and caloric restriction on fiber type composition, mitochondrial morphology and dynamics in rat oxidative and glycolytic muscles', *Frontiers in Physiology*, 10(420), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00420>.

Farin, S. and Porta, E.A. (2002) 'Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life', *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3), pp. 219–231. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(01\)00223-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(01)00223-0).

Faulkner, J.A., Brooks, S. V. and Zerba, E. (1995) 'Muscle atrophy and weakness with aging: Contraction-induced injury as an underlying mechanism', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 50(SPEC. ISSUE), pp. 124–129. Available at: https://doi.org/10.1093/gerona/50a.special_issue.124.

Feng, H., Kang, C., Dickman, J.R., Koenig, R., Awoyinka, I., Zhang, Y. and Ji, L.L. (2013) 'Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , nuclear factor- κ B and β -blockade', *Experimental Physiology*, 98(3), pp. 784–795. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.069286>.

Fiatarone, M.A., Marks, E.C., Ryan, N.D., Meredith, C.N., Lipsitz, L.A. and Evans, W.J. (1990) 'High-Intensity Strength Training in Nonagenarians: Effects on Skeletal Muscle', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 263(22), pp. 3029–3034. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.1990.03440220053029>.

Filézac De L'Etang, A., Maharjan, N., Cordeiro Branã, M., Ruegsegger, C., Rehmann, R., Goswami, A., Roos, A., Troost, D., Schneider, B.L., Weis, J. and Saxena, S. (2015) 'Marinesco-Sjögren syndrome protein SIL1 regulates motor neuron subtype-selective ER stress in ALS', *Nature Neuroscience*, 18(2), pp. 227–238. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3903>.

Flanagan-Steet, H., Fox, M.A., Meyer, D. and Sanes, J.R. (2005) 'Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations', *Dermatologic clinics*, 132(20), pp. 4471–4481. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.02044>.

Flurkey, K., Curren, J.M. and Harrison, D.E. (2007) 'Mouse Models in Aging Research', *The Mouse in Biomedical Research*, 3, pp. 637–672. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50074-1>.

Fogarty, M.J., Porras, M.A.G., Mantilla, C.B. and Sieck, G.C. (2019) 'Diaphragm neuromuscular transmission failure in aged rats', *Journal of Neurophysiology*, 122(1), pp. 93–104. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.00061.2019>.

Folker, E.S. and Baylies, M.K. (2013) 'Nuclear positioning in muscle development and disease', *Frontiers in Physiology*, 4(363), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00363>.

Fontaine, B., Klarsfeld, A., Hökfelt, T. and Changeux, J.P. (1986) 'Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes', *Neuroscience Letters*, 71(1), pp. 59–65. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90257-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90257-0).

Fraga, C.G., Litterio, M.C., Prince, P.D., Calabró, V., Piotrkowski, B. and Galleano, M. (2011) 'Cocoa flavanols: Effects on vascular nitric oxide and blood pressure', *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1), pp. 63–67. Available at: <https://doi.org/10.3164/jcbtn.11-010FR>.

Frey, D., Schneider, C., Xu, L., Borg, J., Spooren, W. and Caroni, P. (2000) 'Early and Selective Loss of Neuromuscular Synapse Subtypes with Low Sprouting Competence in Motoneuron Diseases', *The Journal of Neuroscience*, 20(7), pp. 2534–2542. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02534.2000>.

Frontera, W.R., Hughes, V.A., Fielding, R.A., Fiatarone, M.A., Evans, W.J. and Roubenoff, R. (2000) 'Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study', *Journal of Applied Physiology*, 88(4), pp. 1321–1326. Available at:

<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.1321>.

Frontera, W.R., Meredith, C.N., O'Reilly, K.P., Knuttgen, H.G. and Evans, W.J. (1988) 'Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function', *Journal of Applied Physiology*, 64(3), pp. 1038–1044. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.3.1038>.

Fry, C.S., Lee, J.D., Jackson, J.R., Kirby, T.J., Stasko, S.A., Liu, H., Dupont-versteegden, E.E., McCarthy, J.J., Peterson, C.A. and Regulation, C.A. (2014) 'Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy', *The FASEB Journal*, 28(4), pp. 1654–1665. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.13-239426>.

Fry, C.S., Lee, J.D., Mula, J., Kirby, T.J., Jackson, J.R., Liu, F., Yang, L., Mendias, C.L., Dupont-Versteegden, E.E., McCarthy, J.J. and Peterson, C.A. (2015) 'Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia', *Nature Medicine*, 21(1), pp. 76–80. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3710>.

Funakoshi, H., Belluardo, N., Arenas, E., Yamamoto, Y., Casabona, A., Persson, H. and Ibáñez, C.F. (1995) 'Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons', *Science*, 268(5216), pp. 1495–1499. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.7770776>.

Galea, V. (1996) 'Changes in motor unit estimates with aging', *Journal of Clinical Neurophysiology*, 13(3), pp. 253–260. Available at: <https://doi.org/10.1097/00004691-199605000-00010>.

Gallegly, J.C., Turesky, N.A., Strotman, B.A., Gurley, C.M., Peterson, C.A. and Dupont-Versteegden, E.E. (2004) 'Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age', *Journal of Applied Physiology*, 97(3), pp. 1082–1090. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00006.2004>.

Galler, S., Hilber, K. and Pette, D. (1997) 'Stretch activation and myosin heavy chain isoforms of rat, rabbit and human skeletal muscle fibres', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 18(4), pp. 441–448. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1018646814843>.

Gardner, E. (1940) 'Decrease in human neurones with age', *Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 77(4), pp. 529–536. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1090770409>.

Gasperi, C., Melms, A., Schoser, B., Zhang, Y., Meltoranta, J., Risson, V., Schaeffer, L., Schalke, B. and Kröger, S. (2014) 'Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis', *Neurology*, 82(22), pp. 1976–1983. Available at: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000478>.

Gautam, M., Noakes, P.G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R.H., Merlie, J.P. and Sanes, J.R. (1996) 'Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice', *Cell*, 85(4), pp. 525–535. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81253-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81253-2).

Gava, P., Kern, H. and Carraro, U. (2015) 'Age-associated power decline from running, jumping, and throwing male masters world records', *Experimental Aging Research*, 41(2), pp. 115–135. Available at: <https://doi.org/10.1080/0361073X.2015.1001648>.

Ghazanfari, N., Linsao, E.L.T.B., Trajanovska, S., Morsch, M., Gregorevic, P., Liang, S.X., Reddel, S.W. and Phillips, W.D. (2015) 'Forced expression of muscle specific kinase slows postsynaptic acetylcholine receptor loss in a mouse model of musk myasthenia gravis', *Physiological Reports*, 3(12), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.14814/phy2.12658>.

Gibson, S.J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Sabate, I.M., Mulderry, P.M., Ghatei, M.A., McGregor, G.P., Morrison, J.F.B., Kelly, J.S., Evans, R.M. and Rosenfeld, M.G. (1984) 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species', *Journal of Neuroscience*, 4(12), pp. 3101–3111. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-12-03101.1984>.

Gill, J.F., Santos, G., Schnyder, S. and Handschin, C. (2018) 'PGC-1 α affects aging-related changes in muscle and motor function by modulating specific exercise-mediated changes in old mice', *Aging Cell*, 17(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12697>.

Glass, D.J., Bowen, D.C., Stitt, T.N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T.E., Gies, D.R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S.J., Distefano, P.S., Valenzuela, D.M., Dechiara, T.M. and Yancopoulos, G.D. (1996) 'Agrin Acts via a MuSK Receptor Complex', *Cell*, 85(4), pp. 513–523. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81252-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81252-0).

Glynn, D., Drew, C.J., Reim, K., Brose, N. and Morton, A.J. (2005) 'Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits', *Human Molecular Genetics*, 14(16), pp. 2369–2385. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi239>.

Goethals, S., Ydens, E., Timmerman, V. and Janssens, S. (2010) 'Toll-like receptor expression in the peripheral nerve', *Glia*, 58(14), pp. 1701–1709. Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.21041>.

Gogliotti, R.G., Quinlan, K.A., Barlow, C.B., Heier, C.R., Heckman, C.J. and DiDonato, C.J. (2012) 'Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction', *Journal of Neuroscience*, 32(11), pp. 3818–3829. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5775-11.2012>.

Goldberg, J., Currais, A., Prior, M., Fischer, W., Chiruta, C., Ratliff, E., Daugherty, D., Dargusch, R., Finley, K., Esparza-Moltó, P.B., Cuezva, J.M., Maher, P., Petrascheck, M. and Schubert, D. (2018) 'The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia', *Aging Cell*, 17(2), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12715>.

Goldspink, G., Scutt, A., Martindale, J., Jaenicke, T., Turay, L. and Gerlach, G.F. (1991) 'Stretch and force generation induce rapid hypertrophy and myosin isoform gene switching in adult skeletal muscle', *Biochemical Society Transactions*, 19(2), pp. 368–373. Available at: <https://doi.org/10.1042/bst0190368>.

Gomez, A. and Burden, S.J. (2011) 'The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation', *Developmental Dynamics*, 240(12), pp. 2626–2633. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.22772>.

Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Studenski, S.A. and Ferrucci, L. (2014) 'The neuromuscular junction: Aging at the crossroad between nerves and muscle', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(208), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00208>.

Gonzalez, M., Ruggiero, F.P., Chang, Q., Shi, Y.-J., Rich, M.M., Kraner, S. and Balice-Gordon, R.J. (1999) 'Disruption of TrkB-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions', *Neuron*, 24(3), pp. 567–583. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81113-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81113-7).

Gopinath, S.D. and Rando, T.A. (2008) 'Stem Cell Review Series: Aging of the skeletal muscle stem cell niche', *Aging Cell*, 7(4), pp. 590–598. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00399.x>.

Gray, D.A., Tsigotitis, M. and Woulfe, J. (2003) 'Ubiquitin, Proteasomes, and the Aging Brain', *Science of Aging Knowledge Environment*, 2003(34), pp. 1–7. Available at:

<https://doi.org/10.1126/sageke.2003.34.re6>.

Gray, D.A. and Woulfe, J. (2005) 'Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste', *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(5), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1126/sageke.2005.5.re1>.

Greenman, M.J. (1917) 'The number, size and axis-sheath relation of the large myelinated fibers in the peroneal nerve of the inbred albino rat under normal conditions, in disease and after stimulation', *Journal of Comparative Neurology*, 27, pp. 403–420.

de Grey, A.D.N.J. (2002) 'Bioremediation meets biomedicine therapeutic translation of microbial catabolism to the lysosome', *Trends in Biotechnology*, 20(11), pp. 452–455. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(02\)02062-0](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(02)02062-0).

Grune, T., Merker, K., Sandig, G. and Davies, K.J.A. (2003) 'Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(3), pp. 709–718. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00809-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00809-X).

Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K.J.A. (1996) 'Degradation of Oxidized Proteins in K562 Human Hematopoietic Cells by Proteasome *', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(26), pp. 15504–15509. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.26.15504>.

Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K.J.A. (1997) 'Degradation of oxidized proteins in mammalian cells', *FASEB Journal*, 11(7), pp. 526–534.

Grüsser, C. and Grüsser-Cornehls, U. (1998) 'Improvement in motor performance of Weaver mutant mice following lesions of the cerebellum', *Behavioural Brain Research*, 97(1–2), pp. 189–194. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(98\)00042-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(98)00042-4).

Gulbenkian, S., Merighi, A., Wharton, J., Varndell, I.M. and Polak, J.M. (1986) 'Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig', *Journal of Neurocytology*, 15(4), pp. 535–542. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01611735>.

Günther, S., Kim, J., Kostin, S., Lepper, C., Fan, C.-M. and Braun, T. (2012) 'Myf5-positive satellite cells contribute to Pax7-dependent long-term maintenance of adult muscle stem cells', *Bone*, 78(2), pp. 711–716. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.07.016>. Myf5-Positive.

Gutierrez-Salmean, G., Ciaraldi, T.P., Nogueira, L., Barboza, J., Taub, P.R., Hogan,

M.C., Henry, R.R., Meaney, E., Villarreal, F., Ceballos, G. and Ramirez-Sanchez, I. (2014) 'Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), pp. 91–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.007>.

Haas, C.A., Streit, W.J. and Kreutzberg, G.W. (1990) 'Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy', *Journal of Neuroscience Research*, 27(3), pp. 270–275. Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.490270305>.

von Haehling, S., Morley, J.E. and Anker, S.D. (2010) 'An overview of sarcopenia: Facts and numbers on prevalence and clinical impact', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 1(2), pp. 129–133. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13539-010-0014-2>.

Häkkinen, K., Newton, R.U., Gordon, S.E., McCormick, M., Volek, J.S., Nindl, B.C., Gotshalk, L.A., Campbell, W.W., Evans, W.J., Häkkinen, A., Humphries, B.J. and Kraemer, W.J. (1998) 'Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 53(6), pp. 415–424. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/53A.6.B415>.

Hall, Z.W. and Ralston, E. (1989) 'Nuclear domains in muscle cells', *Cell*, 59(5), pp. 771–772. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90597-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90597-7).

Hämäläinen, N. and Pette, D. (1993) 'The Histochemical Profiles of Fast Fiber Types IIB, ID, and IIA in Skeletal Muscles of Mouse, Rat, and Rabbit', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(5), pp. 733–743. Available at: <https://doi.org/10.1177/41.5.8468455>.

Harman, D. (1956) 'Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.', *Journal of gerontology*, 11(3), pp. 298–300. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.

Hartung, V. and Asmussen, G. (1988) 'The effect of age on the extra- and intrafusal muscle fibers in the soleus muscle of the rat', *Zeitschrift für Mikroskopisch-anatomische Forschung*, 102, pp. 677–693.

Hashizume, K. and Kanda, K. (1990) 'Neuronal dropout is greater in hindlimb motor nuclei than in forelimb motor nuclei in aged rats', *Neuroscience Letters*, 113(3), pp. 267–269. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90595-Z](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90595-Z).

Hashizume, K. and Kanda, K. (1995) 'Differential effects of aging on motoneurons and peripheral nerves innervating the hindlimb and forelimb muscles of rats', *Neuroscience Research*, 22(2), pp. 189–196. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00889-3](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00889-3).

Hashizume, K., Kanda, K. and Burke, R.E. (1988) 'Medial gastrocnemius motor nucleus in the rat: Age-related changes in the number and size of motoneurons', *Journal of Comparative Neurology*, 269(3), pp. 425–430. Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.902690309>.

Haus, J.M., Carrithers, J.A., Trappe, S.W. and Trappe, T.A. (2007) 'Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle', *Journal of Applied Physiology*, 103(6), pp. 2068–2076. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00670.2007>.

Hawke, T.J. and Garry, D. (2005) 'Myogenic satellite cells physiology to molecular biology', *Environmental Pollution*, 138(3), p. 377. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.10.021>.

Hawkins, P., Morton, D.B., Burman, O., Dennison, N., Honess, P., Jennings, M., Lane, S., Middleton, V., Roughan, J. V., Wells, S. and Westwood, K. (2011) 'A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: Eleventh report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement', *Laboratory Animals*, 45(1), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1258/la.2010.010031>.

Hebel, R. and Stromberg, M.W. (1977) 'Anatomy of the Laboratory Rat'. Available at: <https://doi.org/10.1002/food.19780220442>.

Hebert, S.L., Marquet-De Rougé, P., Lanza, I.R., McCrady-Spitzer, S.K., Levine, J.A., Middha, S., Carter, R.E., Klaus, K.A., Therneau, T.M., Highsmith, E.W. and Nair, K.S. (2015) 'Mitochondrial Aging and Physical Decline: Insights From Three Generations of Women', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(11), pp. 1409–1417. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glv086>.

Hegedus, J., Putman, C.T. and Gordon, T. (2007) 'Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*, 28(2), pp. 154–164. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.003>.

Hegedus, J., Putman, C.T., Tyreman, N. and Gordon, T. (2008) 'Preferential motor unit

loss in the SOD1 G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', 14, pp. 3337–3351. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149286>.

Heininger, K. (2002) 'Aging is a deprivation syndrome driven by a germ-soma conflict', *Ageing Research Reviews*, 1(3), pp. 481–536. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(02\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(02)00015-6).

Herrlinger, K.A., Chirouzes, D.M. and Ceddia, M.A. (2015) 'Supplementation with a polyphenolic blend improves post-exercise strength recovery and muscle soreness', *Food Nutrition Research*, 59(30034), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.30034>.

Hesser, B.A., Henschel, O. and Witzemann, V. (2006) 'Synapse disassembly and formation of new synapses in postnatal muscle upon conditional inactivation of MuSK', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(3), pp. 470–480. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.10.020>.

Hettwer, S., Lin, S., Kucsera, S., Haubitz, M., Oliveri, F., Fariello, R.G., Ruegg, M.A. and Vrijbloed, J.W. (2014) 'Injection of a soluble fragment of neural agrin (NT-1654) considerably improves the muscle pathology caused by the disassembly of the neuromuscular junction', *PLoS ONE*, 9(2), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088739>.

Hoh, J. (1992) 'Muscle fiber types and function', *Current Opinion in Rheumatology*, 4(6), pp. 801–808.

Holahan, M.R. (2017) 'A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(266), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00266>.

Holloway, G.P., Holwerda, A.M., Miotto, P.M., Dirks, M.L., Verdijk, L.B. and van Loon, L.J.C. (2018) 'Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle', *Cell Reports*, 22(11), pp. 2837–2848. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.069>.

Hood, D.A., Memme, J.M., Oliveira, A.N. and Triolo, M. (2019) 'Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging', *Annual Review of Physiology*, 81, pp. 19–41. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114310>.

Höök, P., Sriramoju, V. and Larsson, L. (2001) 'Effects of aging on actin sliding speed

on myosin from single skeletal muscle cells of mice, rats, and humans', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(4), pp. 782–788. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.4.c782>.

Hosokawa, H., Ishii, N., Ishida, H., Ichimori, K., Nakazawa, H. and Suzuki, K. (1994) 'Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant mev-1 of *Caenorhabditis elegans*', *Mechanisms of Ageing and Development*, 74(3), pp. 161–170. Available at: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)90087-6).

Hunter, S.K., Pereira, X.H.M. and Keenan, K.G. (2016) 'The aging neuromuscular system and motor performance', *Journal of Applied Physiology*, 121(4), pp. 982–995. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00475.2016>.

Hvid, L.G., Suetta, C., Nielsen, J.H., Jensen, M.M., Frandsen, U., Ørtenblad, N., Kjaer, M. and Aagaard, P. (2014) 'Aging impairs the recovery in mechanical muscle function following 4 days of disuse', *Experimental Gerontology*, 52, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.012>.

Ibebunjo, C., Chick, J.M., Kendall, T., Eash, J.K., Li, C., Zhang, Y., Vickers, C., Wu, Z., Clarke, B.A., Shi, J., Cruz, J., Fournier, B., Brachat, S., Gutzwiller, S., Ma, Q., Markovits, J., Broome, M., Steinkrauss, M., Skuba, E., Galarnau, J.-R., Gygi, S.P. and Glass, D.J. (2013) 'Genomic and Proteomic Profiling Reveals Reduced Mitochondrial Function and Disruption of the Neuromuscular Junction Driving Rat Sarcopenia', *Molecular and Cellular Biology*, 33(2), pp. 194–212. Available at: <https://doi.org/10.1128/mcb.01036-12>.

Imamura, K., Ashida, H., Ishikawa, T. and Fujii, M. (1983) 'Human major psoas muscle and sacrospinalis muscle in relation to age: A study by computed tomography', *Journals of Gerontology*, 38(6), pp. 678–681. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/38.6.678>.

Ingram, D.K. (2000) 'Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans', *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 32(9), pp. 1623–1629. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005768-200009000-00016>.

Ishihara, A., Naitoh, H. and Katsuta, S. (1987) 'Effects of ageing on the total number of muscle fibers and motoneurons of the tibialis anterior and soleus muscles in the rat', *Brain Research*, 435(1–2), pp. 355–358. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91624-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91624-6).

Jacob, J.M. (1998) 'Lumbar motor neuron size and number is affected by age in male

F344 rats', *Mechanisms of Ageing and Development*, 106(1–2), pp. 205–216. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(98\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(98)00117-1).

Jacob, J.M. and Robbins, N. (1990) 'Differential effects of age on neuromuscular transmission in partially denervated mouse muscle', *Journal of Neuroscience*, 10(5), pp. 1522–1529. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-05-01522.1990>.

Jacobs, J.M. and Love, S. (1985) 'Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages', *Brain*, 108(4), pp. 897–924. Available at: <https://doi.org/10.1093/brain/108.4.897>.

Jacobson, R.D., Virag, I. and Skene, J.H.P. (1986) 'A protein associated with axon growth, GAP-43, is widely distributed and developmentally regulated in rat CNS', *Journal of Neuroscience*, 6(6), pp. 1843–1855. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-06-01843.1986>.

Jakobsson, F., Borg, K., Edström, L. and Grimby, L. (1988) 'Use of motor units in relation to muscle fiber type and size in man', *Muscle & Nerve*, 11(12), pp. 1211–1218. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.880111205>.

Jang, Y.C. and Van Remmen, H. (2011) 'Age-associated alterations of the neuromuscular junction', *Experimental Gerontology*, 46(2–3), pp. 193–198. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.029>.

Janssen, I., Baumgartner, R.N., Ross, R., Rosenberg, I.H. and Roubenoff, R. (2004) 'Skeletal Muscle Cutpoints Associated with Elevated Physical Disability Risk in Older Men and Women', *American Journal of Epidemiology*, 159(4), pp. 413–421. Available at: <https://doi.org/10.1093/aje/kwh058>.

Janssen, I., Heymsfield, S.B., Wang, Z. and Ross, R. (2000) 'Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18 – 88 yr', *Journal of Applied Physiology*, 89(1), pp. 81–88. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>.

Jennings, C.G.B. and Mudge, A.W. (1989) 'Chick myotubes in culture express high-affinity receptors for calcitonin gene-related peptide', *Brain Research*, 504(2), pp. 199–205. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91357-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91357-7).

Ji, L.L. and Kang, C. (2015) 'Role of PGC-1 α in sarcopenia: Etiology and potential intervention - A mini-review', *Gerontology*, 61(2), pp. 139–148. Available at: <https://doi.org/10.1159/000365947>.

Jolly, R.D., Douglas, B.V., Davey, P.M. and Roiri, J.E. (1995) 'Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment', *Gerontology*, 41(Suppl 2), pp.

283–295. Available at: <https://doi.org/10.1159/000213750>.

Jones, B.J. and Roberts, D.J. (1968) 'A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 259(2), p. 211. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00537801>.

Jones, R.A., Harrison, C., Eaton, S.L., Llaverro Hurtado, M., Graham, L.C., Alkhamash, L., Oladiran, O.A., Gale, A., Lamont, D.J., Simpson, H., Simmen, M.W., Soeller, C., Wishart, T.M. and Gillingwater, T.H. (2017) 'Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction', *Cell Reports*, 21(9), pp. 2348–2356. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>.

Joseph, J.A., Roth, G.S. and Lippa, A.S. (1986) 'Reduction of motor behavioral deficits in senescent animals via chronic prolactin administration I. Rotational behavior', *Neurobiology of Aging*, 7(1), pp. 31–35. Available at: [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(86\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0197-4580(86)90023-0).

Kadi, F., Charifi, N. and Denis, C. (2004) 'Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men', *Muscle & Nerve*, 29(1), pp. 120–127. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.10510>.

Kalinkovich, A. and Livshits, G. (2015) 'Sarcopenia - The search for emerging biomarkers', *Ageing Research Reviews*, 22, pp. 58–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.05.001>.

Kanda, K. and Hashizume, K. (1989) 'Changes in properties of the medial gastrocnemius motor units in aging rats', *Journal of Neurophysiology*, 61(4), pp. 737–746. Available at: <https://doi.org/10.1152/jn.1989.61.4.737>.

Kang, H. and Lichtman, J.W. (2013) 'Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals', *Journal of Neuroscience*, 33(50), pp. 19480–19491. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4067-13.2013>.

Kang, H., Tian, L., Mikesch, M., Lichtman, J.W. and Thompson, W.J. (2014) 'Terminal schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury', *Journal of Neuroscience*, 34(18), pp. 6323–6333. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014>.

Kang, H., Tian, L., Son, Y.J., Zuo, Y., Procaccino, D., Love, F., Hayworth, C., Trachtenberg, J., Mikesch, M., Sutton, L., Ponomareva, O., Mignone, J., Enikolopov, G., Rimer, M. and Thompson, W. (2007) 'Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity', *Journal of*

Neuroscience, 27(22), pp. 5948–5957. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0621-07.2007>.

Kang, I., Chu, C.T. and Kaufman, B.A. (2018) 'The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms', *FEBS Letters*, 592(5), pp. 793–811. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12989>.

Kaplan, A., Spiller, K.J., Towne, C., Kanning, K.C., Choe, G.T., Geber, A., Akay, T., Aebischer, P. and Henderson, C.E. (2014) 'Neuronal Matrix Metalloproteinase-9 Is a Determinant of Selective Neurodegeneration', *Neuron*, 81(2), pp. 333–348. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.009>.

Karns, L.R., Ng, S.C., Freeman, J.A. and Fishman, M.C. (1987) 'Cloning of complementary DNA for GAP-43, a neuronal growth-related protein', *Science*, 236(4801), pp. 597–600. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.2437653>.

Kashihara, Y., Sakaguchi, M. and Kuno, M. (1989) 'Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve', *Journal of Neuroscience*, 9(11), pp. 3796–3802. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-11-03796.1989>.

Kasper, C.E. and Xun, L. (1996) 'Cytoplasm-to-myonucleus ratios in plantaris and soleus muscle fibres following hindlimb suspension', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 17(5), pp. 603–610. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00124358>.

Katayama, M., Tanaka, M., Yamamoto, H., Ohbayashi, T., Nimura, Y. and Ozawa, T. (1991) 'Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 25(1), pp. 47–56.

Katz, M.L. (2002) 'Potential reversibility of lipofuscin accumulation', *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3), pp. 311–317. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0167-4943\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/s0167-4943(02)00008-0).

Katz, M.L. and Robison, W.G. (1983) 'Lipofuscin Response to the " Aging-Reversal " Drug Centrophenoxine in Rat Retinal Pigment Epithelium and Frontal Cortex', *Journal of Gerontology*, 38(5), pp. 525–531. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/38.5.525>.

Kennel, P.F., Fonteneau, P., Martin, E., Schmidt, J., Azzouz, M., Borg, J., Guenet, J. and Schmalbruch, H. (1996) 'Electromyographical and Motor Performance Studies in the pmn Mouse Model of Neurodegenerative Disease', *Neurobiology of Disease*, 3(2), pp. 137–147. Available at: <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0014>.

Khosa, S., Trikamji, B., Khosa, G.S., Khanli, H.M. and Mishra, S.K. (2019) 'An Overview of Neuromuscular Junction Aging Findings in Human and Animal Studies', *Current Aging Science*, 12(1), pp. 28–34. Available at: <https://doi.org/10.2174/1874609812666190603165746>.

Kiernan, B.W., Garcion, E., Ferguson, J., Frost, E.E., Torres, E.M., Dunnett, S.B., Saga, Y., Aizawa, S., Faissner, A., Kaur, R., Franklin, R.J.M. and Ffrench-Constant, C. (1999) 'Myelination and behaviour of tenascin-C null transgenic mice', *European Journal of Neuroscience*, 11(9), pp. 3082–3092. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00729.x>.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. and Lemasters, J.J. (2007) 'Selective degradation of mitochondria by mitophagy', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), pp. 245–253. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.034>.

Kim, J.-H., Torgerud, W.S. and Mosser, K.H.H. (2012) 'Myosin light chain 3f attenuates age-induced decline in contractile velocity in MHC type II single muscle fibers', *Aging Cell*, 11(2), pp. 203–212. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00774.x>.Myosin.

Kim, J.K., Caine, C., Awano, T., Herbst, R. and Monani, U.R. (2017) 'Motor neuronal repletion of the NMJ organizer, Agrin, modulates the severity of the spinal muscular atrophy disease phenotype in model mice', *Human Molecular Genetics*, 26(13), pp. 2377–2385. Available at: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx124>.

Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., Hallock, P.T., Gomez, A.M., Huang, J.H., Hubbard, S.R., Dustin, M.L. and Burden, S.J. (2008) 'Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK', *Cell*, 135(2), pp. 334–342. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.002>.

Kirkwood, T.B.L. (2002) 'Evolution of ageing', *Mechanisms of Ageing and Development*, 123(7), pp. 737–745. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00419-5](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00419-5).

Klitgaard, H., Mantoni, M., Schiaffino, S., Ausoni, S., Gorza, L., Laurent-Winter, C., Schnohr, P. and Saltin, B. (1990) 'Function, morphology and protein expression of ageing skeletal muscle: A cross-sectional study of elderly men with different training backgrounds', *Acta Physiologica Scandinavica*, 140(1), pp. 41–54. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1990.tb08974.x>.

Knox, C.A., Kokmen, E. and Dyck, P.J. (1989) 'Morphometric alteration of rat

myelinated fibers with aging', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 48(2), pp. 119–139. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005072-198903000-00001>.

Kong, X.C., Barzaghi, P. and Ruegg, M.A. (2004) 'Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference', *EMBO Reports*, 5(2), pp. 183–188. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400065>.

Korhonen, M.T., Cristea, A., Alén, M., Häkkinen, K., Sipilä, S., Mero, A., Viitasalo, J.T., Larsson, L. and Suominen, H. (2006) 'Aging, muscle fiber type, and contractile function in sprint-trained athletes', *Journal of Applied Physiology*, 101(3), pp. 906–917. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00299.2006>.

Kougias, D.G., Das, T., Perez, A.B. and Pereira, S.L. (2018) 'A role for nutritional intervention in addressing the aging neuromuscular junction', *Nutrition Research*, 53, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.02.006>.

Kovanen, V. and Suominen, H. (1987) 'Effects of age and life-time physical training on fibre composition of slow and fast skeletal muscle in rats', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 408(6), pp. 543–551. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00581154>.

Krarup, C. (2011) 'Lower motor neuron involvement examined by quantitative electromyography in amyotrophic lateral sclerosis', *Clinical Neurophysiology*, 122(2), pp. 414–422. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.06.027>.

Kujoth, G.C., Leeuwenburgh, C. and Prolla, T.A. (2006) 'Mitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging', *Cancer Research*, 66(15), pp. 7386–7389. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4670>.

Kummer, T.T., Misgeld, T. and Sanes, J.R. (2006) 'Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost', *Current Opinion in Neurobiology*, 16(1), pp. 74–82. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.003>.

Kuo, Y.T., Shih, P.H., Kao, S.H., Yeh, G.C. and Lee, H.M. (2015) 'Pyrroloquinoline Quinone Resists Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy by Activating PGC-1 α and Integrating Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes', *PLoS ONE*, 10(12), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143600>.

Lago, N., Udina, E., Ramachandran, A. and Navarro, X. (2007) 'Neurobiological Assessment of Regenerative Electrodes for Bidirectional Interfacing Injured Peripheral Nerves', *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 54(6), pp. 1129–1137.

Available at: <https://doi.org/10.1109/TBME.2007.891168>.

Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A.I., Andrés-Lacueva, C. and Tornero, A. (2005) 'Review: Health effects of cocoa flavonoids', *Food Science and Technology International*, 11(3), pp. 159–176. Available at: <https://doi.org/10.1177/1082013205054498>.

Landing, B.H., Dixon, L.G. and Wells, T.R. (1974) 'Studies on isolated human skeletal muscle fibers. Including a proposed pattern of nuclear distribution and a concept of nuclear territories', *Human Pathology*, 5(4), pp. 441–461. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(74\)80023-7](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(74)80023-7).

Lanza, I.R., Short, D.K., Short, K.R., Raghavakaimal, S., Basu, R., Joyner, M.J., Mcconnell, J.P. and Nair, K.S. (2008) 'Endurance Exercise as a Countermeasure for Aging', *Diabetes*, 57(11), pp. 2933–2942. Available at: <https://doi.org/10.2337/db08-0349.I.R.L>.

Lanza, I.R., Zabielski, P., Klaus, K.A., Morse, D.M., Heppelmann, C.J., Bergen III, H.R., Surendra, D., Walrand, S., Short, K.R., Johnson, M.L., Robinson, M.M., Schimke, J.M., Jakaitis, D.R., Asmann, Y.W., Sun, Z. and Nair, K.S. (2012) 'Chronic Caloric Restriction Preserves Mitochondrial Function in Senescence Without Increasing Mitochondrial Biogenesis', *AIDS and Behavior*, 23(1), pp. 1031–1043. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.003>.

Larrick, James W., Larrick, Jasmine W. and Mendelsohn, A.R. (2018) 'ATP Synthase, a Target for Dementia and Aging?', *Rejuvenation Research*, 21(1), pp. 61–66. Available at: <https://doi.org/10.1089/rej.2018.2056>.

Larsson, L. (1978) 'Morphological and functional characteristics of the ageing skeletal muscle in man. A cross-sectional study', *Acta Physiologica Scandinavica*, 457, pp. 1–36.

Larsson, L. (1982a) 'Ageing in mammalian skeletal muscles', *Advances in Neurogerontology*, pp. 60–97.

Larsson, L. (1982b) 'Physical training effects on muscle morphology in sedentary males at different ages', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 14(3), pp. 203–206. Available at: <https://doi.org/10.1249/00005768-198203000-00009>.

Larsson, L. (1983) 'Histochemical characteristics of human skeletal muscle during aging', *Acta Physiologica Scandinavica*, 117(3), pp. 469–471. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1983.tb00024.x>.

Larsson, L. and Ansved, T. (1988) 'A Study on Single Motor Units in the Rat', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 515(1), pp. 303–313. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb33000.x>.

Larsson, L. and Ansved, T. (1995) 'Effects of ageing on the motor unit', *Progress in Neurobiology*, 45(5), pp. 397–458. Available at: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)98601-Z](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)98601-Z).

Larsson, L., Biral, D., Campione, M. and Schiaffino, S. (1993) 'An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle', *Acta Physiologica Scandinavica*, 147(2), pp. 227–234. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09493.x>.

Larsson, L., Degens, H., Li, M., Salviati, L., Lee, Y. II, Thompson, W., Kirkland, J.L. and Sandri, M. (2019) 'Sarcopenia: Aging-related loss of muscle mass and function', *Physiological Reviews*, 99(1), pp. 427–511. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017>.

Larsson, L. and Edström, L. (1986) 'Effects of age on enzyme-histochemical fibre spectra and contractile properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat', *Journal of the Neurological Sciences*, 76(1), pp. 69–89. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(86\)90143-7](https://doi.org/10.1016/0022-510X(86)90143-7).

Larsson, L., Edström, L., Lindgren, B., Gorza, L. and Schiaffino, S. (1991) 'MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 261(1 Pt 1). Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.261.1.c93>.

Larsson, L., Li, X. and Frontera, W.R. (1997) 'Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 272(2 Pt 1). Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.2.c638>.

Larsson, L., Müller, U., Li, X. and Schiaffino, S. (1995) 'Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin', *Acta Physiologica Scandinavica*, 153(2), pp. 109–116. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1995.tb09841.x>.

Larsson, L., Sjödin, B. and Karlsson, J. (1978) 'Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22–65 years', *Acta Physiologica Scandinavica*, 103(1), pp. 31–39. Available at:

<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1978.tb06187.x>.

Larsson, L. and Yu, F. (1997) 'Gender-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the expression of myosin isoforms in young and old rats', *Acta Physiologica Scandinavica*, 159(1), pp. 81–89. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1997.559328000.x>.

Leduc-Gaudet, J.P., Picard, M., Pelletier, F.S.J., Sgarioto, N., Auger, M.J., Vallée, J., Robitaille, R., St-Pierre, D.H. and Gouspillou, G. (2015) 'Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice', *Oncotarget*, 6(20), pp. 17923–17937. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4235>.

Lee, C.K., Klopp, R.G., Weindruch, R. and Prolla, T.A. (1999) 'Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction', *Science*, 285(5432), pp. 1390–1393. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.285.5432.1390>.

Lee, C.W., Han, J., Bamburg, J.R., Han, L., Lynn, R. and Zheng, J.Q. (2009) 'Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF / cofilin-directed vesicular trafficking', *Nature Publishing Group*, 12(7), pp. 848–856. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2322>.

Lee, S.S., Lee, R.Y.N., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J. and Ruvkun, G. (2003) 'A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity', *Nature Genetics*, 33(1), pp. 40–48. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng1056>.

Lee, Y. il, Mikesh, M., Smith, I., Rimer, M. and Thompson, W. (2011) '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', *Developmental Biology*, 356(2), pp. 432–444. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.667>.

Lehmann, H.D. and Kretzschmar, R. (1983) 'Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice', *Anesthesia and Analgesia*, 62(11), pp. 1048–1051. Available at: <https://doi.org/10.1213/00000539-198311000-00028>.

Leonibus, E. De, Pascucci, T., Lopez, S., Oliverio, A., Amalric, M. and Mele, A. (2007) 'Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease', *Psychopharmacology*, 194(4), pp. 517–525. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0862-4>.

Lepore, E., Casola, I., Dobrowolny, G. and Musarò, A. (2019) 'Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication', *Cells*, 8(8), p. 906. Available at:

<https://doi.org/10.3390/cells8080906>.

Lepper, C., Partridge, T.A. and Fan, C.M. (2011) 'An absolute requirement for pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration', *Development*, 138(17), pp. 3639–3646. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.067595>.

Lewis, S.E.M., Kelly, F.J. and Goldspink, D.F. (1984) 'Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat', *Biochemical Journal*, 217(2), pp. 517–526. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj2170517>.

Lexell, J., Taylor, C.C. and Sjöström, M. (1988) 'What is the cause of the ageing atrophy?. Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men', *Journal of the Neurological Sciences*, 84(2–3), pp. 275–294. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(88\)90132-3](https://doi.org/10.1016/0022-510X(88)90132-3).

Li, C., White, S.H., Warren, L.K. and Wohlgemuth, S.E. (2018) 'Skeletal muscle from aged American Quarter Horses shows impairments in mitochondrial biogenesis and expression of autophagy markers', *Experimental Gerontology*, 102, pp. 19–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.022>.

Li, J. and Dahlström, A.B. (1992) 'Development of calcitonin-gene-related peptide, chromogranin a, and synaptic vesicle markers in rat motor endplates, studied using immunofluorescence and confocal laser scanning', *Muscle & Nerve*, 15(9), pp. 984–992. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.880150903>.

Li, L., Xiong, W.C. and Mei, L. (2018) 'Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders', *Annual Review of Physiology*, 80, pp. 159–188. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>.

Li, Y., Lee, Y. II and Thompson, W.J. (2011) 'Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse', *Journal of Neuroscience*, 31(42), pp. 14910–14919. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3590-11.2011>.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Dubyk, R. and Spiegelman, B.M. (2013) 'Transcriptional co-activator PGC-1a drives the formation of slow-twitch muscle fibres', *Journal of International Agricultural and Extension Education*, 20(2), pp. 110–112.

Available at: <https://doi.org/10.1038/nature00904>.

Lin, S., Xing, H., Zang, T., Ruan, X., Wo, L. and He, M. (2018) 'Sirtuins in mitochondrial stress: Indispensable helpers behind the scenes', *Ageing Research Reviews*, 44, pp. 22–32. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.03.006>.

Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, B., Pfaff, S.L., Sanes, J.R. and Lee, K. (2001) 'Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse', *Nature*, 410(6832), pp. 1057–1064. Available at: <https://doi.org/10.1038/35074025>.

Lin, W., Dominguez, B., Yang, J., Aryal, P., Brandon, E.P., Gage, F.H., Lee, K. and Jolla, L. (2005) 'Neurotransmitter Acetylcholine Negatively Regulates Neuromuscular Synapse Formation by a Cdk5-Dependent Mechanism', 46, pp. 569–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.002>.

Ling, C., Poulsen, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Almgren, P., Wojtaszewski, J., Beck-Nielsen, H., Groop, L. and Vaag, A. (2004) 'Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 α and PGC-1 β gene expression in twins', *Journal of Clinical Investigation*, 114(10), pp. 1518–1526. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI21889>.

Lionikas, A., Blizard, D.A., Gerhard, G.S., Vandenberg, D.J., Stout, J.T., Vogler, G.P., McClearn, G.E. and Larsson, L. (2005) 'Genetic determinants of weight of fast- and slow-twitch skeletal muscle in 500-day-old mice of the C57BL/6J and DBA/2J lineage', *Physiological Genomics*, 21(29), pp. 184–192. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00209.2004>.

Lionikas, A., Blizard, D.A., Vandenberg, D.J., Glover, M.G., Stout, J.T., Vogler, G.P., McClearn, G.E. and Larsson, L. (2003) 'Genetic architecture of fast- and slow-twitch skeletal muscle weight in 200-day-old mice of the C57BL/6J and DBA/2J lineage', *Physiological Genomics*, 16(1), pp. 141–152. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00103.2003>.

Lionikas, A., Blizard, D.A., Vandenberg, D.J., Stout, J.T., Vogler, G.P., McClearn, G.E. and Larsson, L. (2006) 'Genetic determinants of weight of fast- and slow-twitch skeletal muscles in old mice', *Mammalian Genome*, 17(6), pp. 615–628. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00335-005-0177-x>.

Liu, J.X., Höglund, A.S., Karlsson, P., Lindblad, J., Qaisar, R., Aare, S., Bengtsson, E. and Larsson, L. (2009) 'Myonuclear domain size and myosin isoform expression in

muscle fibres from mammals representing a 100 000-fold difference in body size', *Experimental Physiology*, 94(1), pp. 117–129. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.043877>.

López, S., Miró, Ò., Martínez, E., Pedrol, E., Rodríguez-Santiago, B., Milinkovic, A., Soler, A., García-Viejo, M.A., Nunes, V., Casademont, J., Gatell, J.M. and Cardellach, F. (2004) 'Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients', *Antiviral Therapy*, 9(1), pp. 47–55.

Lowe, D.A., Surer, J.T., Thomas, D.D. and Thompson, L. V. (2001) 'Electron paramagnetic resonance reveals age-related myosin structural changes in rat skeletal muscle fibers', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(3), pp. 540–547. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.3.c540>.

Lu, B., Fu, W., Greengard, P. and Poo, M. (2010) 'Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction', *Journal of the American Chemical Society*, 132(29), pp. 2517–2528. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.3.C540>.

Ma, M., Basso, D.M., Walters, P., Stokes, B.T. and Jakeman, L.B. (2001) 'Behavioral and Histological Outcomes Following Graded Spinal Cord Contusion Injury in the C57Bl/6 Mouse', *Experimental Neurology*, 169(2), pp. 239–254. Available at: <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7679>.

Machin, D.R., Christmas, K.M., Chou, T.-H., Hill, S.C., Van Pelt, D.W., Trombold, J.R. and Coyle, E.F. (2014) 'Effects of Differing Dosages of Pomegranate Juice Supplementation after Eccentric Exercise', *Physiology Journal*, 2014, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/271959>.

Magrone, T., Russo, M.A. and Jirillo, E. (2017) 'Cocoa and dark chocolate polyphenols: From biology to clinical applications', *Frontiers in Immunology*, 8(677), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00677>.

Malaguti, M., Angeloni, C. and Hrelia, S. (2013) 'Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1155/2013/825928>.

von Maltzahn, J., Chang, N.C., Bentzinger, C.F. and Rudnicki, M.A. (2015) 'Wnt Signaling in Myogenesis', *Gerontology*, 61(6), pp. 515–525. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.008.Wnt>.

von Maltzahn, J., Jones, A.E., Parks, R.J. and Rudnicki, M.A. (2013) 'Pax7 is critical for

the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), pp. 16474–16479. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1307680110>.

Man, L.L., Liu, F., Wang, Ying Jie, Song, H.H., Xu, H.B., Zhu, Z.W., Zhang, Q. and Wang, Yong Jun (2015) 'The HMGB1 signaling pathway activates the inflammatory response in Schwann cells', *Neural Regeneration Research*, 10(10), pp. 1706–1712. Available at: <https://doi.org/10.4103/1673-5374.167773>.

Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R. and Navarro, X. (2011) 'Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease', *Clinical Neurophysiology*, 122(8), pp. 1660–1670. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.01.045>.

Mansueto, G., Armani, A., Viscomi, C., D'Orsi, L., De Cegli, R., Polishchuk, E. V., Lamperti, C., Di Meo, I., Romanello, V., Marchet, S., Saha, P.K., Zong, H., Blaauw, B., Solagna, F., Tezze, C., Grumati, P., Bonaldo, P., Pessin, J.E., Zeviani, M., Sandri, M. and Ballabio, A. (2017) 'Transcription Factor EB Controls Metabolic Flexibility during Exercise', *Cell Metabolism*, 25(1), pp. 182–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.003>.

Manta, P., Vassilopoulos, D. and Spengos, M. (1987) 'Nucleo-cytoplasmic ratio in ageing skeletal muscle', *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, 236(4), pp. 235–236. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00383854>.

March, P.A., Wurzelmann, S. and Walkley, S.U. (1995) 'Morphological alterations in neocortical and cerebellar GABAergic neurons in a canine model of juvenile Batten disease', *American Journal of Medical Genetics*, 57(2), pp. 204–212. Available at: <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320570219>.

Marika, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A., Kaltsatou, A. and Cicchella, A. (2019) 'Effect of cocoa products and its polyphenolic constituents on exercise performance and exercise-induced muscle damage and inflammation: A review of clinical trials', *Nutrients*, 11(7), pp. 1–15. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11071471>.

Marmigère, F. and Erfors, P. (2007) 'Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage', *Nature Reviews Neuroscience*, 8(2), pp. 114–127. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn2057>.

Marques, M.J., Conchello, J.A. and Lichtman, J.W. (2000) 'From plaque to pretzel: Fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction',

Journal of Neuroscience, 20(10), pp. 3663–3675. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-10-03663.2000>.

Martinez-Lopez, N., Tarabra, E., Toledo, M., Garcia-Macia, M., Sahu, S., Coletto, L., Batista-Gonzalez, A., Barzilai, N., Pessin, J.E., Schwartz, G.J., Kersten, S. and Singh, R. (2016) 'System-wide benefits of intermeal fasting by autophagy', *Physiology & behavior*, 176(3), pp. 139–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.020>.System-wide.

Marzetti, E. and Leeuwenburgh, C. (2006) 'Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age', *Experimental Gerontology*, 41(12), pp. 1234–1238. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.011>.

Marzetti, E., Wohlgemuth, S.E., Lees, H.A., Chung, H.Y., Giovannini, S. and Leeuwenburgh, C. (2008) 'Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle', *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(9), pp. 542–549. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.05.005>.

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2009) 'Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass', *Cell Metabolism*, 10(6), pp. 507–515. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>.

Matteoli, M., Balbi, S., Sala, C., Chini, B., Cimino, M., Vitadello, M. and Fumagalli, G. (1990) 'Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction', *Journal of Molecular Neuroscience*, 2(3), pp. 175–184. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF02896842>.

Matteoli, M., Haimann, C., Torri-Tarelli, F., Polak, J.M., Ceccarelli, B. and De Camilli, P. (1988) 'Differential effect of α -latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(19), pp. 7366–7370. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.19.7366>.

Matteoli, M., Torri-Tarelli, F. and Haimann, C. (1988) 'Coexistence of acetylcholine and calcitonin gene-related peptides at the frog neuromuscular junction: a model for the study of differential secretion of classical neurotransmitters and peptides', *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 24(4), pp. 527–530.

Maxwell, N., Castro, R.W., Sutherland, N.M., Vaughan, K.L., Szarowicz, M.D., de Cabo, R., Mattison, J.A. and Valdez, G. (2018a) 'α-Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice', *Aging Cell*, 17(2). Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12726>.

Maxwell, N., Castro, R.W., Sutherland, N.M., Vaughan, K.L., Szarowicz, M.D., de Cabo, R., Mattison, J.A. and Valdez, G. (2018b) 'α-Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice', *Aging Cell*, 17(2), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12726>.

McCulloch, J., Uddman, R., Kingman, T.A. and Edvinsson, L. (1986) 'Calcitonin gene-related peptide: Functional role in cerebrovascular regulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(15), pp. 5731–5735. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5731>.

McKiernan, S.H., Bua, E., McGorray, J. and Aiken, J. (2004) 'Early-onset calorie restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle', *The FASEB Journal*, 18(3), pp. 580–581. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.03-0667fje>.

McKinnon, N.B., Connelly, D.M., Rice, C.L., Hunter, S.W. and Doherty, T.J. (2017) 'Neuromuscular contributions to the age-related reduction in muscle power: Mechanisms and potential role of high velocity power training', *Ageing Research Reviews*, 35, pp. 147–154. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.003>.

McKinnon, N.B., Montero-Odasso, M. and Doherty, T.J. (2015) 'Motor unit loss is accompanied by decreased peak muscle power in the lower limb of older adults', *Experimental Gerontology*, 70, pp. 111–118. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.07.007>.

Mcmartin, D.N. and Connor, J.A.O. (1979) 'Effect of age on axoplasmic transport of cholinesterase in rat sciatic nerves', *Mechanisms of Ageing and Development*, 10(3–4), pp. 241–248. Available at: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(79\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0047-6374(79)90038-1).

Mcphee, J.S., French, D.P., Jackson, D., Nazroo, J., Pendleton, N. and Degens, H. (2016) 'Physical activity in older age: perspectives for healthy ageing and frailty', *Biogerontology*, 17(3), pp. 567–580. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10522-016-9641-0>.

Meador, B.M., Mirza, K.A., Tian, M., Skelding, M.B., Reaves, L.A., Edens, N.K., Tisdale, M.J. and Pereira, S.L. (2015) 'the Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate (Egcg) Attenuates Skeletal Muscle Atrophy in a Rat Model of Sarcopenia',

Journal of Frailty & Aging, 4(4), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.14283/jfa.2015.58>.

Meiri, K.F., Pfenninger, K.H. and Willard, M.B. (1986) 'Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(10), pp. 3537–3541. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.83.10.3537>.

Meissner, C., Bruse, P. and Oehmichen, M. (2006) 'Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age', *Experimental Gerontology*, 41(5), pp. 518–524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.03.010>.

Menalled, L.B., Sison, J.D., Wu, Y., Olivieri, M., Li, X., Li, H. and Zeitlin, S. (2002) 'Early Motor Dysfunction and Striosomal Distribution of Huntingtin Microaggregates in Huntington's Disease Knock-In Mice', *The Journal of Neuroscience*, 22(18), pp. 8266–8276. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-08266.2002>.

Menshikova, E. V., Ritov, V.B., Dube, J.J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G.S., Coen, P.M. and Goodpaster, B.H. (2018) 'Calorie Restriction-induced Weight Loss and Exercise Have Differential Effects on Skeletal Muscle Mitochondria Despite Similar Effects on Insulin Sensitivity', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(1), pp. 81–87. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glw328>.

Messi, M.L. and Delbono, O. (2003) 'Target-derived trophic effect on skeletal muscle innervation in senescent mice', *Journal of Neuroscience*, 23(4), pp. 1351–1359. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-04-01351.2003>.

Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M. and Nourhashemi, F. (2013) 'Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases', *Journal of the American Medical Directors Association*, 14(12), pp. 877–882. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>.

Miller, R.A. (2006) 'Principles of Animal Use for Gerontological Research', *Handbook of Models for Human Aging*, 55(3), pp. 21–31. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012369391-4/50004-7>.

Miller, S.L. and Wolfe, R.R. (2008) 'The danger of weight loss in the elderly', *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 12(7), pp. 487–491. Available at:

<https://doi.org/10.1007/BF02982710>.

Minnaard, R., Drost, M.R., Wagenmakers, A.J.M., Van Kranenburg, G.P., Kuipers, H. and Hesselink, M.K.C. (2005) 'Skeletal muscle wasting and contractile performance in septic rats', *Muscle and Nerve*, 31(3), pp. 339–348. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.20268>.

Misgeld, T., Kummer, T.T., Lichtman, J.W. and Sanes, J.R. (2005) 'Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), pp. 11088–11093. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0504806102>.

Mito, T., Ishizaki, H., Suzuki, M., Morishima, H., Ota, A., Ishikawa, K., Nakada, K., Maeno, A., Shiroishi, T. and Hayashi, J.I. (2015) 'Transmitochondrial mito-mice Δ and mtDNA mutator mice, but not aged mice, share the same spectrum of musculoskeletal disorders', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(4), pp. 933–937. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.009>.

Mitsumoto, H., Uluğ, A.M., Pullman, S.L., Gooch, C.L., Chan, S., Tang, M.X., Mao, X., Hays, A.P., Floyd, A.G., Battista, V., Montes, J., Hayes, S., Dashnaw, S., Kaufmann, P., Gordon, P.H., Hirsch, J., Levin, B., Rowland, L.P. and Shungu, D.C. (2007) 'Quantitative objective markers for upper and lower motor neuron dysfunction in ALS', *Neurology*, 68(17), pp. 1402–1410. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260065.57832.87>.

Mittal, K.R. and Logmani, F.H. (1987) 'Age-related reduction in 8th cervical ventral nerve root myelinated fiber diameters and numbers in man', *Journals of Gerontology*, 42(1), pp. 8–10. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/42.1.8>.

Miyagishi, T., Takahata, N. and Iizuka, R. (1967) 'Electron microscopic studies on the lipo-pigments in the cerebral cortex nerve cells of senile and vitamin E deficient rats', *Acta Neuropathologica*, 9(1), pp. 7–17. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00688154>.

Moloney, E.B., de Winter, F. and Verhaagen, J. (2014) 'ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease', *Frontiers in Neuroscience*, 8(252), pp. 1–18. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00252>.

Monemi, M., Eriksson, P.O., Eriksson, A. and Thornell, L.E. (1998) 'Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during

aging', *Journal of the Neurological Sciences*, 154(1), pp. 35–48. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00208-6](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00208-6).

Monserrat, A.J., Benavides, S.H., Berra, A., Fariña, S., Vicario, S.C. and Porta, E.A. (1995) 'Lectin histochemistry of lipofuscin and certain ceroid pigments', *Histochemistry and Cell Biology*, 103(6), pp. 435–445. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01457543>.

Monville, C., Torres, E.M. and Dunnett, S.B. (2006) 'Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model', *Journal of Neuroscience Methods*, 158(2), pp. 219–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.06.001>.

Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D.G. (1991) 'Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase: A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion', *European Journal of Biochemistry*, 199(3), pp. 691–697. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16172.x>.

Moore, T. and Wang, Y.L. (1947) 'Formation of Fluorescent Pigment in Vitamin E Deficiency', *British Journal of Nutrition*, 1(1), pp. 53–64. Available at: <https://doi.org/10.1079/bjn19470007>.

Mora, M., Marchi, M., Polak, J.M., Gibson, S.J. and Cornelio, F. (1989) 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity at the human neuromuscular junction', *Brain Research*, 492(1–2), pp. 404–407. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90930-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90930-X).

Moscoso, L.M., Merlie, J.P. and Sanes, J.R. (1995) 'N-CAM, 43K-rapsyn, and s-laminin mRNAs are concentrated at synaptic sites in muscle fibers', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 6(1), pp. 80–89. Available at: <https://doi.org/10.1006/mcne.1995.1008>.

Mosole, S., Carraro, U., Kern, H., Loeffler, S., Fruhmann, H., Vogelauer, M., Burggraf, S., Mayr, W., Krenn, M., Paternostro-sluga, T., Hamar, D., Cvecka, J., Sedliak, M., Sandri, M., Tirpakova, V., Sarabon, N., Musaro, A., Protasi, F., Nori, A., Pond, A. and Zampieri, S. (2014) 'Long-Term High-Level Exercise Promotes Muscle Reinnervation With Age', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 73(4), pp. 284–294. Available at: <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000032>.

Mouchiroud, L., Houtkooper, R.H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y., Viswanathan, M., Schoonjans, K., Guarente, L. and Auwerx, J.

(2014) 'The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling', *Cell*, 154(2), pp. 430–441. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.016>.The.

Mulle, C., Benoit, P., Pinset, C., Roa, M. and Changeux, J.P. (1988) 'Calcitonin gene-related peptide enhances the rate of desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor in cultured mouse muscle cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), pp. 5728–5732. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5728>.

Munguia, L., Rubio-Gayosso, I., Ramirez-Sanchez, I., Ortiz, A., Hidalgo, I., Gonzalez, C., Meaney, E., Villarreal, F., Najera, N. and Ceballos, G. (2019) 'High flavonoid cocoa supplement ameliorates plasma oxidative stress and inflammation levels while improving mobility and quality of life in older subjects: A double-blind randomized clinical trial', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 74(10), pp. 1620–1627. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/glz107>.

Munnell, J.F. and Getty, R. (1968) 'Rate of Accumulation of Cardiac Lipofuscin in the Aging Canine', *Journal of Gerontology*, 23(2), pp. 154–158. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/23.2.154>.

Murase, T., Haramizu, S., Ota, N. and Hase, T. (2008) 'Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice', *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 295(1), pp. 281–289. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00880.2007>.

Murdock, D.G., Christacos, N.C. and Wallace, D.C. (2000) 'The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method', *Nucleic Acids Research*, 28(21), pp. 4350–4355. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/28.21.4350>.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A. and Kardon, G. (2011) 'Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration', *Development*, 138(17), pp. 3625–3637. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.064162>.

Nakae, Y. and Stoward, P.J. (2016) 'The high correlation between counts and area fractions of lipofuscin granules, a biomarker of oxidative stress in muscular dystrophies', *Histochemistry and Cell Biology*, 146(5), pp. 627–634. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1462-3>.

Nakae, Y., Stoward, P.J., Kashiya, T., Shono, M., Akagi, A., Matsuzaki, T. and Nonaka, I. (2004) 'Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice', *Journal of Molecular Histology*, 35(5), pp. 489–499. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000045947.83628.a7>.

Nakano, M. and Gotoh, S. (1992) 'Accumulation of Cardiac Lipofuscin Depends on Metabolic Rate of Mammals', *Journal of Gerontology*, 47(4), pp. 126–129. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/47.4.b126>.

Nandy, K. and Bourne, G.H. (1966) 'Effect of centrophenoxine on the lipofuscin pigments in the neurones of senile guinea-pigs', *Nature*, 210(5033), pp. 313–314. Available at: <https://doi.org/10.1038/210313a0>.

Navarro, X. and Udina, E. (2009) 'Methods and Protocols in Peripheral Nerve Regeneration Experimental Research: Part III-Electrophysiological Evaluation', *International Review of Neurobiology*. 1st edn, 87(09), pp. 105–126. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)87006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87006-2).

Navarro, X., Udina, E., Ceballos, D. and Gold, B.G. (2001) 'Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps', *Muscle & Nerve*, 24(7), pp. 905–915. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.1088.abs>.

Navarro, X., Verdú, E. and Butí, M. (1994) 'Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fiber', *Experimental Neurology*, 129(2), pp. 217–224. Available at: <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1163>.

Nelson, R.B., Linden, D.J., Hyman, C., Pfenninger, K.H. and Routtenberg, A. (1989) 'The two major phosphoproteins in growth cones are probably identical to two protein kinase C substrates correlated with persistence of long-term potentiation', *Journal of Neuroscience*, 9(2), pp. 381–389. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-02-00381.1989>.

Neufeld, E.F. (1991) 'Lysosomal storage diseases', *Annual Review of Biochemistry*, 60, pp. 257–280. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001353>.

Neve, R.L. and Bear, M.F. (1989) 'Visual experience regulates gene expression in the developing striate cortex', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(12), pp. 4781–4784. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4781>.

Neve, R.L., Finch, E.A., Bird, E.D. and Benowitz, L.I. (1988) 'Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain',

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(10), pp. 3638–3642. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3638>.

New, H. V. and Mudge, A.W. (1986) 'Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis', *Nature*, 323(6091), pp. 809–811. Available at: <https://doi.org/10.1038/323809a0>.

Nguyen, Q.T., Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (2002) 'Pre-existing pathways promote precise projection patterns', *Nature Neuroscience*, 5(9), pp. 861–867. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn905>.

Nijssen, J., Comley, L.H. and Hedlund, E. (2017) 'Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neuropathologica*, 133(6), pp. 863–885. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1708-8>.

Nogueira, L., Ramirez-Sanchez, I., Perkins, G.A., Murphy, A., Taub, P.R., Ceballos, G., Villarreal, F.J., Hogan, M.C. and Malek, M.H. (2011) '(-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle', *Journal of Physiology*, 589(18), pp. 4615–4631. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209924>.

van Norren, K., Rusli, F., Dijk, M. van, Lute, C., Nagel, J., Dijk, F.J., Dwarkasing, J., Boekschoten, M. V., Luiking, Y., Witkamp, R.F., Müller, M. and Steegenga, W.T. (2015) 'Behavioural changes are a major contributing factor in the reduction of sarcopenia in caloric-restricted ageing mice', *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 6(3), pp. 253–268. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcsm.12024>.

Notes, S. and Oppermann, H. (1976) 'Decrease in number of myelinated fibers in human spinal roots with age', *The Anatomical Record*, 68(1), pp. 63–74. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.1090680105>.

O'Donnell, K.C., Vargas, M.E. and Sagasti, A. (2013) 'Wlds and PGC-1 α regulate mitochondrial transport and oxidation state after axonal injury', *Journal of Neuroscience*, 33(37), pp. 14778–14790. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1331-13.2013>.

O'Sullivan, D.J. and Swallow, M. (1968) 'The fibre size and content of the radial and sural nerves.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 31(5), pp. 464–470. Available at: <https://doi.org/10.1136/jnnp.31.5.464>.

Ochala, J., Gustafson, A.M., Diez, M.L., Renaud, G., Li, M., Aare, S., Qaisar, R., Banduseela, V.C., Hedström, Y., Tang, X., Dworkin, B., Ford, G.C., Nair, K.S., Perera, S., Gautel, M. and Larsson, L. (2011) 'Preferential skeletal muscle myosin loss in

response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: Underlying mechanisms', *Journal of Physiology*, 589(8), pp. 2007–2026. Available at: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202044>.

Ochoa, J. and Mair, W.G.P. (1969) 'The normal sural nerve in man - II. Changes in the axons and Schwann cells due to ageing', *Acta Neuropathologica*, 13(3), pp. 217–239. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00690643>.

Oertel, G. (1986) 'Changes in human skeletal muscles due to ageing. Histological and histochemical observations on autopsy material', *Acta Neuropathologica*, 69(3–4), pp. 309–313. Available at: <https://doi.org/10.1007/bf00688309>.

Ohhashi, T. and Jacobowitz, D.M. (1988) 'Effects of calcitonin gene-related peptide on neuromuscular transmission in the isolated rat diaphragm', *Peptides*, 9(3), pp. 613–617. Available at: [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(88\)90172-6](https://doi.org/10.1016/0196-9781(88)90172-6).

Oldfors, A., Moslemi, A., Jonasson, L., Ohlsson, M. and Kollberg, G. (2006) 'Mitochondrial abnormalities in inclusion-body myositis', *Neurology*, 66(2 Suppl 1), pp. 49–55. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192127.63013.8d>.

Park, S.J., Gavrilova, O., Brown, A.L., Soto, J.E., Bremner, S., Kim, J., Xu, X., Yang, S., Um, J.H., Koch, L.G., Britton, S.L., Lieber, R.L., Philp, A., Baar, K., Kohama, S.G., Abel, E.D., Kim, M.K. and Chung, J.H. (2017) 'DNA-PK Promotes the Mitochondrial, Metabolic, and Physical Decline that Occurs During Aging', *Cell Metabolism*, 25(5), pp. 1135–1146.e7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.008>.

Patel, S.A., Chaudhari, A., Gupta, R., Velingkaar, N. and Kondratov, R. V. (2016) 'Circadian clocks govern calorie restriction-mediated life span extension through BMAL1- and IGF-1-dependent mechanisms', *FASEB Journal*, 30(4), pp. 1634–1642. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.15-282475>.

Pauff, S.M. and Miller, S.C. (2012) 'STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair', *Bone*, 78(2), pp. 711–716. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3656.STAT3>.

Pavlati, G., Rich, K., Webster, S. and Blau, H. (1989) 'Localization of muscle gene products in nuclear domains', *Nature*, 337(6207), pp. 570–573. Available at: <https://doi.org/10.1038/337570a0>.

Pérez-García, M.J. and Burden, S.J. (2012) 'Increasing MuSK Activity Delays Denervation and Improves Motor Function in ALS Mice', *Cell Reports*, 2(3), pp. 497–502. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.004>.

Pestronk, A., Drachman, D.B. and Griffin, J.W. (1980) 'Effects of aging on nerve sprouting and regeneration', *Experimental Neurology*, 70(1), pp. 65–82. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(80\)90006-0](https://doi.org/10.1016/0014-4886(80)90006-0).

Petrella, J.K., Kim, J.S., Cross, J.M., Kosek, D.J. and Bamman, M.M. (2006) 'Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women', *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 291(5), pp. 937–946. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00190.2006>.

Pette, D. and Staron, R.S. (2000) 'Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions', *Microscopy Research and Technique*, 50(6), pp. 500–509. Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7).

Pette, D. and Staron, R.S. (2001) 'Transitions of muscle fiber phenotypic profiles', *Histochemistry and Cell Biology*, 115(5), pp. 359–372. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004180100268>.

Pettigrew, F.P. and Gardiner, P.F. (1987) 'Changes in rat plantaris motor unit profiles with advanced age', *Mechanisms of Ageing and Development*, 40(3), pp. 243–259. Available at: [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(87\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0047-6374(87)90022-4).

Pevzner, A., Schoser, B., Peters, K., Cosma, N.C., Karakatsani, A., Schalke, B., Melms, A. and Kröger, S. (2012) 'Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibodynegative myasthenia gravis', *Journal of Neurology*, 259(3), pp. 427–435. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6194-7>.

Phillips, B.E., Williams, J.P., Greenhaff, P.L., Smith, K. and Atherton, P.J. (2017) 'Physiological adaptations to resistance exercise as a function of age', *JCI Insight*, 2(17), pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.95581>.

Phillips, T. and Leeuwenburgh, C. (2005) 'Muscle fiber-specific apoptosis and TNF- α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction', *The FASEB Journal*, 19(6), pp. 1–33. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.04-2870fje>.

Phillips, W.D. and Vincent, A. (2016) 'Pathogenesis of myasthenia gravis: Update on disease types, models, and mechanisms', *F1000Research*, 5(F1000), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8206.1>.

Piasecki, M., Ireland, A., Coulson, J., Stashuk, D.W., Hamilton-wright, A., Swiecicka, A., Rutter, M.K., Mcphee, J.S. and Jones, D.A. (2016) 'Motor unit number estimates and neuromuscular transmission in the tibialis anterior of master athletes: evidence that

athletic older people are not spared from age-related motor unit remodeling', *Physiological Reports*, 4(19), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.14814/phy2.12987>.

Piehl, F., Arvidsson, U., Johnson, H., Cullheim, S., Villar, M., Dagerlind, Å., Terenius, L., Hökfelt, T. and Ulfhake, B. (1991) 'Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)-like Immunoreactivity and CGRP mRNA in Rat Spinal Cord Motoneurons after Different Types of Lesions', *European Journal of Neuroscience*, 3(8), pp. 737–757. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb01670.x>.

Popper, P. and Micevych, P.E. (1989) 'Localization of calcitonin gene-related peptide and its receptors in a striated muscle', *Brain Research*, 496(1–2), pp. 180–186. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91064-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91064-0).

Power, G.A., Dalton, B.H., Behm, D.G., Vandervoort, A.A., Doherty, T.J. and Rice, C.L. (2010) 'Motor unit number estimates in masters runners: Use it or lose it?', *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(9), pp. 1644–1650. Available at: <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181d6f9e9>.

Price, F.D., Maltzahn, J. Von, Bentzinger, C.F., Nicolas, A., Yin, H., Chang, N.C., Wilson, D.H., Frenette, J. and Rudnicki, M.A. (2015) 'Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function', *Nature Medicine*, 20(10), pp. 1174–1181. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3655.Inhibition>.

Putman, C.T., Sultan, K.R., Wassmer, T., Bamford, J.A., SÅkorjanc, D. and Pette, D. (2001) 'Fiber-type transitions and satellite cell activation in low-frequency-stimulated muscles of young and aging rats', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(12), pp. B510–B519. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/56.12.B510>.

Qaisar, R., Renaud, G., Morine, K., Barton, E.R., Sweeney, H.L. and Larsson, L. (2012) 'Is functional hypertrophy and specific force coupled with the addition of myonuclei at the single muscle fiber level?', *The FASEB Journal*, 26(3), pp. 1077–1085. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.11-192195>.

Ralston, E., Lu, Z., Biscocho, N., Soumaka, E., Mavroidis, M., Prats, C., LØmo, T., Capetanaki, Y. and Ploug, T. (2006) 'Blood vessels and desmin control the positioning of nuclei in skeletal muscle fibers', *Journal Cellular Physiology*, 209(3), pp. 874–882. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCP>.

Ramamurthy, B., Höök, P., Jones, A.D. and Larsson, L. (2001) 'Changes in myosin

structure and function in response to glycation', *The FASEB Journal*, 15(13), pp. 2415–2422. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.01-0183com>.

Ramiro-Puig, E., Casadesús, G., Lee, H.G., Zhu, X., McShea, A., Perry, G., Pérez-Cano, F.J., Smith, M.A. and Castell, M. (2009) 'Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress', *European Journal of Nutrition*, 48(1), pp. 54–61. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0761-4>.

Reist, N.E., Magill, C. and McMahan, U.J. (1987) 'Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles', *Journal of Cell Biology*, 105(6 Pt 1), pp. 2457–2469. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2457>.

Rexed, B. (1944) 'Contribution to the knowledge of the postnatal development of the peripheral nervous system in man', *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 33, pp. 121–193.

Rich, M. and Lichtman, J.W. (1989) 'Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers', *Neuron*, 3(6), pp. 677–688. Available at: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90236-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90236-5).

Rich, M.M. and Lichtman, J.W. (1989) 'In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle', *Journal of Neuroscience*, 9(5), pp. 1781–1805. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-05-01781.1989>.

Riezen, H. van and Boersma, L. (1969) 'A new method for quantitative grip strength evaluation', *European Journal of Pharmacology*, 6(3), pp. 353–356. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(69\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(69)90197-6).

Roa, M. and Changeux, J.P. (1991) 'Characterization and developmental evolution of a high-affinity binding site for calcitonin gene-related peptide on chick skeletal muscle membrane', *Neuroscience*, 41(2–3), pp. 563–570. Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90349-S](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90349-S).

Robbins, N. and Fahim, M.A. (1985) 'Progression of age changes in mature mouse motor nerve terminals and its relation to locomotor activity', *Journal of Neurocytology*, 14(6), pp. 1019–1036. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01224810>.

Robinson, M.M., Dasari, S., Konopka, A.R., Johnson, M.L., Manjunatha, S., Esponda, R.R., Carter, R.E., Lanza, I.R. and Nair, K.S. (2017) 'Enhanced Protein Translation Underlies Improved Metabolic and Physical Adaptations to Different Exercise Training Modes in Young and Old Humans', *Cell Metabolism*, 25(3), pp. 581–592. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.009>.

Rodrigo, J., Polak, J.M., Fernandez, L., Ghatei, M.A., Mulderry, P. and Bloom, S.R. (1985) 'Calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory and motor nerves of the rat, cat, and monkey esophagus', *Gastroenterology*, 88(2), pp. 444–451. Available at: [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(85\)90505-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(85)90505-0).

Rodrigo, J., Polak, J.M., Terenghi, G., Cervantes, C., Ghatei, M.A., Mulderry, P.K. and Bloom, S.R. (1985) 'Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive sensory and motor nerves of the mammalian palate', *Histochemistry*, 82(1), pp. 67–74. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00502092>.

Rosenfeld, M.G., Mermod, J.J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W. and Evans, R.M. (1983) 'Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing', *Nature*, 304(5922), pp. 129–135. Available at: <https://doi.org/10.1038/304129a0>.

Rowan, S.L., Purves-Smith, F.M., Solbak, N.M. and Hepple, R.T. (2011) 'Accumulation of severely atrophic myofibers marks the acceleration of sarcopenia in slow and fast twitch muscles', *Experimental Gerontology*, 46(8), pp. 660–669. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.03.005>.

Rowan, S.L., Rygiel, K., Purves-Smith, F.M., Solbak, N.M., Turnbull, D.M. and Hepple, R.T. (2012) 'Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle', *PLoS ONE*, 7(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029082>.

Rowe, G.C., El-Khoury, R., Patten, I.S., Rustin, P. and Arany, Z. (2012) 'PGC-1 α is dispensable for exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle', *PLoS ONE*, 7(7), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041817>.

Roy, R.R., Monke, S.R., Allen, D.L. and Edgerton, V.R. (1999) 'Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers', *Journal of Applied Physiology*, 87(2), pp. 634–642. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.2.634>.

Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A., Lanza, I.R., Rasbach, K.A., Okutsu, M., Nair, K.S., Yan, Z., Leinwand, L.A. and Spiegelman, B.M. (2012) 'A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy', *Cell*, 151(6), pp. 1319–1331. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.050>.

Rudolf, H. and Akaaboune, M. (2014) 'Recycling of acetylcholine receptors at ectopic

postsynaptic clusters induced by exogenous agrin in living rats', *Developmental Biology*, 394(1), pp. 122–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.018>.

Ruegg, M.A., Bixby, J.L. and Ruegg, M.A. (1998) 'Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction', *Trends in Neurosciences*, 18(97), pp. 22–27. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01154-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01154-5).

Rygiel, K.A., Picard, M. and Turnbull, D.M. (2016) 'The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective', *Journal of Physiology*, 594(16), pp. 4499–4512. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP271212>.

Sacco, A. and Puri, P.L. (2015) 'Regulation of Muscle Satellite Cell Function in Tissue Homeostasis and Aging', *Cell Stem Cell*, 16(6), pp. 585–587. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.007>.

Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M. and Tarnopolsky, M.A. (2011) 'Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis', *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), pp. 10605–10617. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211466>.

Sager, M., Dunham, N.C. and Johnson, J. (1994) 'Risk of Falls after Hospital Discharge', *Journal of the American Geriatrics Society*, 42(3), pp. 269–274. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1994.tb01750.x>.

Sala, C., Andreose, J.S., Fumagalli, G. and Lomo, T. (1995) 'Calcitonin gene-related peptide: Possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions', *Journal of Neuroscience*, 15(1), pp. 520–528. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-01-00520.1995>.

Salmons, S. and Henriksson, J. (1981) 'The adaptive response of skeletal muscle to increased use', *Muscle & Nerve*, 4(2), pp. 94–105. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.880040204>.

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S. and Galy, A. (2011) 'Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration', *Development*, 138(17), pp. 3647–3656. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.073601>.

Samorajski, T. (1974) 'Age differences in the morphology of posterior tibial nerves of mice', *Journal of Comparative Neurology*, 157(4), pp. 439–451. Available at:

<https://doi.org/10.1002/cne.901570406>.

Samuel, M.A., Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W. and Sanes, J.R. (2012) 'Agrin and Synaptic Laminin Are Required to Maintain Adult Neuromuscular Junctions', *PLoS ONE*, 7(10), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046663>.

Samuelson, U.E., Dalsgaard, C.-J., Lundberg, J.M. and Hökfelt, T. (1985) 'Calcitonin gene-related peptide inhibits spontaneous contractions in human uterus and fallopian tube', *Neuroscience Letters*, 62(2), pp. 225–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90359-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90359-3).

Sanders, D.B., El-Salem, K., Massey, J.M., McConville, J. and Vincent, A. (2003) 'Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG', *Neurology*, 60(12), pp. 1978–1980. Available at: <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000065882.63904.53>.

Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R. and Sandri, M. (2009) 'Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296(6), pp. 1248–1257. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2009>.

Sato, A., Sato, Y. and Suzuki, H. (1985) 'Aging effects on conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of peripheral nerves', *Neuroscience Letters*, 53(1), pp. 15–20. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90090-4).

Scelsi, R., Marchetti, C. and Poggi, P. (1980) 'Histochemical and ultrastructural aspects of M. vastus lateralis in sedentary old people (age 65-89 years)', *Acta Neuropathologica*, 51(2), pp. 99–105. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00690450>.

Schiaffino, S. (2018) 'Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies', *FEBS Journal*, 285(20), pp. 3688–3694. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.14502>.

Schiaffino, S., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B. and Sandri, M. (2013) 'Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy', *FEBS Journal*, 280(17), pp. 4294–4314. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.12253>.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1994) 'Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle', *Journal of Applied Physiology*, 77(2), pp. 493–501. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1996) 'Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance', *Physiological Reviews*, 76(2), pp. 371–423.

Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.1996.76.2.371>.

Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011) 'Fiber types in Mammalian skeletal muscles', *Physiological Reviews*, 91(4), pp. 1447–1531. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.

Schinder, A.F. and Poo, M. ming (2000) 'The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity', *Trends in Neurosciences*, 23(12), pp. 639–645. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01672-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01672-6).

Schmelzer, J.D. and Low, P.A. (1987) 'Electrophysiological Studies on the Effect of Age on Caudal Nerve of the Rat', *Experimental Neurology*, 96(3), pp. 612–620. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90223-8).

Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M. and DiMauro, S. (1988) 'A Direct Repeat Is a Hotspot for Large-Scale Deletion of Human Mitochondrial DNA', *Science*, 244(4902), pp. 346–349. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.2711184>.

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M.A. (2000) 'Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells', *Cell*, 102(6), pp. 777–786. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00066-0).

Sepharose, P.G., Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. and Puigserver, P. (2005) 'Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1', *Nature*, 434(7029), pp. 113–118. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03314.1>.

Serrano, A.L. and Muñoz-Cánoves, P. (2010) 'Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle', *Experimental Cell Research*, 316(18), pp. 3050–3058. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.035>.

Sharma, A.K., Bajada, S. and Thomas, P.K. (1980) 'Age changes in the tibial and plantar nerves of the rat', *Journal of anatomy*, 130(2), pp. 417–428.

Sheard, P.W. and Anderson, R.D. (2012) 'Age-related loss of muscle fibres is highly variable amongst mouse skeletal muscles', *Biogerontology*, 13(2), pp. 157–167. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10522-011-9365-0>.

Sheehy, M.R.J., Greenwood, J.G. and Fielder, D.R. (1995) 'Lipofuscin as a Record of " Rate of Living " in an Aquatic Poikilotherm', *Journal of Gerontology*, 50(6), pp. 327–336. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/50a.6.b327>.

Shefner, J.M., Cudkowicz, M. and Brown, R.H. (2006) 'Motor unit number estimation predicts disease onset and survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Muscle and Nerve*, 34(5), pp. 603–607. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.20628>.

Shefner, J.M., Cudkowicz, M.E. and Brown, R.H. (2002) 'Comparison of incremental with multipoint MUNE methods in transgenic ALS mice', *Muscle and Nerve*, 25(1), pp. 39–42. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.10000>.

Shen, C., Lu, Y., Zhang, B., Figueiredo, D., Bean, J., Jung, J., Wu, H., Barik, A., Yin, D.M., Xiong, W.C. and Mei, L. (2013) 'Antibodies against low-Density lipoprotein receptor-Related protein 4 induce myasthenia gravis', *Journal of Clinical Investigation*, 123(12), pp. 5190–5202. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI66039>.

Shi, L., Fu, A.K.Y. and Ip, N.Y. (2012) 'Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction', *Trends in Neurosciences*, 35(7), pp. 441–453. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.005>.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A. and Wallace, D.C. (1989) 'Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip-replication model and metabolic therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), pp. 7952–7956. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.20.7952>.

Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S. and Nair, K.S. (2005) 'Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), pp. 5618–5623. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501559102>.

Short, K.R., Vittone, J.L., Bigelow, M.L., Proctor, D.N., Coenen-Schimke, J.M., Rys, P. and Nair, K.S. (2005) 'Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training', *Journal of Applied Physiology*, 99(1), pp. 95–102. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00129.2005>.

Shringarpure, R., Grune, T. and Davies, K.J.A. (2001) 'Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(10), pp. 1442–1450. Available at: <https://doi.org/10.1007/PL00000787>.

Si, Hongwei, Wang, X., Zhang, Longyun, Parnell, L.D., Admed, B., LeRoith, T., Ansah, T.A., Zhang, Lijuan, Li, J., Ordovas, J.M., Si, Hongzong, Liu, D. and Lai, C.Q. (2019) 'Dietary epicatechin improves survival and delays skeletal muscle degeneration in aged mice', *FASEB Journal*, 33(1), pp. 965–977. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.201800554RR>.

Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W., Zglinicki, T. Von and Davies, K.J.A. (2000) 'Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts', *The FASEB Journal*, 14(11), pp. 1490–1498. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.99-0843com>.

Skene, J.H.P., Jacobson, R.D., Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J. and Freeman, J.A. (1986) 'A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes', *Science*, 233(4765), pp. 783–786. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.3738509>.

Skofitsch, G. and Jacobowitz, D.M. (1985) 'Calcitonin gene-related peptide: Detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system', *Peptides*, 6(4), pp. 721–745. Available at: [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(85\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0196-9781(85)90178-0).

Snow, M.H. (1977) 'The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats', *Cell and Tissue Research*, 185(3), pp. 399–408. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00220299>.

Son, Y.J. and Thompson, W.J. (1995a) 'Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by schwann cells', *Neuron*, 14(1), pp. 133–141. Available at: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90247-3).

Son, Y.J. and Thompson, W.J. (1995b) 'Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons', *Neuron*, 14(1), pp. 125–132. Available at: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90246-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90246-5).

Sousa-Victor, P., García-Prat, L., Serrano, A.L., Perdiguero, E. and Muñoz-Cánoves, P. (2015) 'Muscle stem cell aging: Regulation and rejuvenation', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(6), pp. 287–296. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.006>.

Spendiff, S., Vuda, M., Gouspillou, G., Aare, S., Perez, A., Morais, J.A., Jagoe, R.T., Fillion, M.E., Glicksman, R., Kapchinsky, S., MacMillan, N.J., Pion, C.H., Aubertin-Leheudre, M., Hettwer, S., Correa, J.A., Taivassalo, T. and Hepple, R.T. (2016) 'Denervation drives mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of octogenarians',

Journal of Physiology, 594(24), pp. 7361–7379. Available at: <https://doi.org/10.1113/JP272487>.

St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R. and Spiegelman, B.M. (2006) 'Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators', *Cell*, 127(2), pp. 397–408. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>.

Staron, R.S., Kraemer, W.J., Hikida, R.S., Fry, A.C., Murray, J.D. and Campos, G.E.R. (1999) 'Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats', *Histochemistry and Cell Biology*, 111(2), pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1007/s004180050341>.

Staron, R.S. and Pette, D. (1993) 'The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle', *Histochemistry*, 100(2), pp. 149–153. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00572901>.

Van Steenis, G. and Kroes, R. (1971) 'Changes in the nervous system and musculature of old rats.', *Veterinary pathology*, 8(4), pp. 320–332. Available at: <https://doi.org/10.1177/030098587100800404>.

Stiles, A.R., Simon, M.T., Stover, A., Eftekharian, S., Khanlou, N., Wang, H.L., Magaki, S., Lee, H., Partynski, K., Dorrani, N., Chang, R., Martinez-Agosto, J.A. and Abdenur, J.E. (2016) 'Mutations in TFAM, encoding mitochondrial transcription factor A, cause neonatal liver failure associated with mtDNA depletion', *Molecular Genetics and Metabolism*, 119(1–2), pp. 91–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.07.001>.

Stojanovic, A., Roher, A.E. and Ballb, M.J. (1994) 'Quantitative Analysis of Lipofuscin and Neurofibrillary Tangles in the Hippocampal Neurons of Alzheimer Disease Brains', *Dementia*, 5(5), pp. 229–233. Available at: <https://doi.org/10.1159/000106728>.

Strehler, B.L., Mark, D.D., Mildvan, A.S. and Gee, M. V (1959) 'Rate of magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium', *Journal of Gerontology*, 14, pp. 430–439. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/14.4.430>.

Streit, W.J., Dumoulin, F.L., Raivich, G. and Kreutzberg, G.W. (1989) 'Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection', *Neuroscience Letters*, 101(2), pp. 143–148. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90521-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90521-1).

Sturman, O., Germain, P.L. and Bohacek, J. (2018) 'Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test', *Stress*, 21(5), pp. 443–452. Available at: <https://doi.org/10.1080/10253890.2018.1438405>.

Sugiura, T., Matoba, H., Miyata, H., Kaeai, Y. and Murakami, N. (1992) 'Myosin heavy chain isoform transition in ageing fast and slow muscles of the rat', *Acta Physiologica Scandinavica*, 144(4), pp. 419–423. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1992.tb09315.x>.

Sullivan, P.G., Dragicevic, N.B., Deng, J., Bai, Y., Dimayuga, E., Ding, Q., Chen, Q., Bruce-keller, A.J. and Keller, J.N. (2004) 'Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover', *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp. 20699–20707. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M313579200>.

Sultan, K.R., Dittrich, B.T., Leisner, E., Paul, N. and Pette, D. (2001) 'Fiber type-specific expression of major proteolytic systems in fast- to slow-transforming rabbit muscle', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 280(2), pp. 239–247. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.2.c239>.

Swallow, M. (1966) 'Fibre size and content of the anterior tibial nerve of the foot.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 29(3), pp. 205–213. Available at: <https://doi.org/10.1136/jnnp.29.3.205>.

Taetzsch, T., Brayman, V.L. and Valdez, G. (2018) 'FGF binding proteins (FGFBPs): Modulators of FGF signaling in the developing, adult, and stressed nervous system', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(9), pp. 2983–2991. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.009>.

Taetzsch, T., Tenga, M.J. and Valdez, G. (2017) 'Muscle fibers secrete FGFBP1 to slow degeneration of neuromuscular synapses during aging and progression of ALS', *Journal of Neuroscience*, 37(1), pp. 70–82. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2992-16.2016>.

Taetzsch, T. and Valdez, G. (2018) 'NMJ maintenance and repair in aging', *Current Opinion in Physiology*, 4, pp. 57–64. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.05.007>.

Takami, K., Kawai, Y., Shiosaka, S., Lee, Y., Girgis, S., Hillyard, C.J., Macintyre, I., Emson, P.C. and Tohyama, M. (1985) 'Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide- and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei', *Brain*

Research, 328(2), pp. 386–389. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)91055-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91055-8).

Takami, Kenji, Kawai, Y., Uchida, S., Tohyama, M., Shiotani, Y., Yoshida, H., Emson, P.C., Girgis, S., Hillyard, C.J. and MacIntyre, I. (1985) 'Effect of calcitonin gene-related peptide on contraction of striated muscle in the mouse', *Neuroscience Letters*, 60(2), pp. 227–230. Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90248-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90248-4).

Tamaki, T., Hirata, M. and Uchiyama, Y. (2014) 'Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(296), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00296>.

Tarabal, O. (1996) 'Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats', *European Journal of Neuroscience*, 8(4), pp. 829–836. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01269.x>.

Tarabal, O., Calderó, J. and Esquerda, J.E. (1996) 'Intramuscular nerve sprouting induced by CNTF is associated with increases in CGRP content in mouse motor nerve terminals', *Neuroscience Letters*, 219(1), pp. 60–64. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13174-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13174-8).

Tassi, E., Al-Attar, A., Aigner, A., Swift, M.R., McDonnell, K., Karavanov, A. and Wellstein, A. (2001) 'Enhancement of Fibroblast Growth Factor (FGF) Activity by an FGF-binding Protein', *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), pp. 40247–40253. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104933200>.

Taylor, P.K. (1984) 'Non-linear effects of age on nerve conduction in adults', *Journal of the Neurological Sciences*, 66(2–3), pp. 223–234. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(84\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(84)90011-X).

Tengan, C.H. and Moraes, C.T. (1998) 'Duplication and triplication with staggered breakpoints in human mitochondrial DNA', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1406(1), pp. 73–80. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00087-2).

Terenghi, G., Polak, J.M., Rodrigo, J., Mulderry, P.K. and Bloom, S.R. (1986) 'Calcitonin Gene-Related Peptide-Immunoreactive Nerves in the Tongue, Epiglottis and Pharynx of the Rat: Occurrence, Distribution and Origin', *Brain Research*, 365(1), pp. 1–14. Available at: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90716-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90716-X).

Terman, A. (2001) 'Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage?', *Redox Report*, 6(1), pp. 15–26. Available at: <https://doi.org/10.1179/135100001101535996>.

Terman, A., Abrahamsson, N. and Brunk, U.T. (1999) 'Ceroid/Lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress', *Experimental Gerontology*, 34(6), pp. 755–770. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(99\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(99)00045-5).

Terman, A. and Brunk, U.T. (1998) 'Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age', *Apmis*, 106(2), pp. 265–276. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x>.

Terman, A. and Sandberg, S. (2002) 'Proteasome inhibition enhances lipofuscin formation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973, pp. 309–312. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04657.x>.

Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Iwasaki, T., Lemckert, F.A., Arthur, P.G. and Grounds, M.D. (2013) 'Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: Focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies', *FEBS Journal*, 280(17), pp. 4149–4164. Available at: <https://doi.org/10.1111/febs.12142>.

Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M.A., Fadini, G.P., Albiero, M., Favaro, G., Ciciliot, S., Soriano, M.E., Morbidoni, V., Cerqua, C., Loeffler, S., Kern, H., Franceschi, C., Salvioi, S., Conte, M., Blaauw, B., Zampieri, S., Salviati, L., Scorrano, L. and Sandri, M. (2017) 'Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence', *Cell Metabolism*, 25(6), pp. 1374-1389.e6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.021>.

Thifault, S., Lalonde, R., Sanon, N. and Hamet, P. (2001) 'Longitudinal analysis of motor activity and coordination, anxiety, and spatial learning in mice with altered blood pressure', *Brain Research*, 910(1–2), pp. 99–105. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02658-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02658-0).

Thompson, L.D. V., Durand, D., Fugere, N.A. and Ferrington, D.A. (2006) 'Myosin and actin expression and oxidation in aging muscle', *Journal of Applied Physiology*, 101(6), pp. 1581–1587. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00426.2006>.

Tidball, J.G. (2017) 'Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 17(3), pp. 165–178. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>.

Tintignac, L.A., Brenner, H.R. and Rüegg, M.A. (2015) 'Mechanisms regulating

neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting', *Physiological Reviews*, 95(3), pp. 809–852. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014>.

Tohgi, H., Tsukagoshi, H. and Toyokura, Y. (1977) 'Quantitative changes with age in normal sural nerves', *Acta Neuropathologica*, 38(3), pp. 213–220. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00688067>.

Tomlinson, B.E. and Irving, D. (1977) 'The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life', *Journal of the Neurological Sciences*, 34(2), pp. 213–219. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(77\)90069-7](https://doi.org/10.1016/0022-510X(77)90069-7).

Tomlinson, D.J., Erskine, R.M., Morse, C.I., Winwood, K. and Onambélé-Pearson, G. (2016) 'The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age', *Biogerontology*, 17(3), pp. 467–483. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9626-4>.

Tomonaga, M. (1977) 'Histochemical and Ultrastructural Changes in Senile Human Skeletal Muscle', *Journal of the American Geriatrics Society*, 25(3), pp. 125–131. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1977.tb00274.x>.

Touvier, T., De Palma, C., Rigamonti, E., Scagliola, A., Incerti, E., Mazelin, L., Thomas, J.L., D'Antonio, M., Politi, L., Schaeffer, L., Clementi, E. and Brunelli, S. (2015) 'Muscle-specific Drp1 overexpression impairs skeletal muscle growth via translational attenuation', *Cell Death and Disease*, 6(2), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.595>.

Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S. and Glass, D.J. (2009) 'Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296(6), pp. 1258–1270. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00105.2009>.

Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., Spelbrink, J.N., Wibom, R., Jacobs, H.T. and Larsson, N.G. (2005) 'Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), pp. 17993–17998. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0508886102>.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H.T. and

Larsson, N.G. (2004) 'Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase', *Nature*, 429(6990), pp. 417–423. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02517>.

Trombold, J.R., Reinfeld, A.S., Casler, J.R. and Coyle, E.F. (2011) 'The effect of pomegranate juice supplementation on strength and soreness after eccentric exercise', *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(7), pp. 1782–1788. Available at: <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318220d992>.

Tsang, W.Y., Sayles, L.C., Grad, L.I., Pilgrim, D.B. and Lemire, B.D. (2001) 'Mitochondrial Respiratory Chain Deficiency in *Caenorhabditis elegans* Results in Developmental Arrest and Increased Life Span', *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), pp. 32240–32246. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M103999200>.

Tseng, B.S., Kasper, C.E. and Edgerton, V.R. (1994) 'Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers', *Cell and Tissue Research*, 275(1), pp. 39–49. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00305374>.

Tsujimoto, T. and Kuno, M. (1988) 'Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals', *Journal of Neuroscience*, 8(10), pp. 3951–3957. Available at: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-10-03951.1988>.

Tzekova, N., Heinen, A. and Küry, P. (2014) 'Molecules involved in the crosstalk between immune- and peripheral nerve Schwann cells', *Journal of Clinical Immunology*, 34(SUPPL. 1), pp. 86–104. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0015-6>.

Uchida, A., Tashiro, T., Komiya, Y., Yorifuji, H., Kishimoto, T. and Hisanaga, S.I. (2004) 'Morphological and biochemical changes of neurofilaments in aged rat sciatic nerve axons', *Journal of Neurochemistry*, 88(3), pp. 735–745. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02201.x>.

Uchida, A., Yorifuji, H., Lee, V.M.Y., Kishimoto, T. and Hisanaga, S.I. (1999) 'Neurofilaments of aged rats: The strengthened interneurofilament interaction and the reduced amount of NF-M', *Journal of Neuroscience Research*, 58(2), pp. 337–348. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19991015\)58:2<337::AID-JNR14>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19991015)58:2<337::AID-JNR14>3.0.CO;2-J).

Uchida, S., Yamamoto, H., Iio, S., Matsumoto, N., Wang, X. -B, Yonehara, N., Imai, Y., Inoki, R. and Yoshida, H. (1990) 'Release of Calcitonin Gene-Related Peptide-Like

Immunoreactive Substance from Neuromuscular Junction by Nerve Excitation and Its Action on Striated Muscle', *Journal of Neurochemistry*, 54(3), pp. 1000–1003. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02349.x>.

Udina, E., Ceballos, D., Gold, B.G. and Navarro, X. (2003) 'FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers', *Experimental Neurology*, 183(1), pp. 220–231. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00173-0).

Vainshtein, A., Desjardins, E.M.A., Armani, A., Sandri, M. and Hood, D.A. (2015) 'PGC-1 α modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle', *Skeletal Muscle*, 5(1), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0033-y>.

Valcic, S., Burr, J.A., Timmermann, B.N. and Liebler, D.C. (2000) 'Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals', *Chemical Research in Toxicology*, 13(9), pp. 801–810. Available at: <https://doi.org/10.1021/tx000080k>.

Valdez, G., Heyer, M.P., Feng, G. and Sanes, J.R. (2014) 'The role of muscle microRNAs in repairing the neuromuscular junction', *PLoS ONE*, 9(3), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093140>.

Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Lichtman, J.W. and Sanes, J.R. (2010) 'Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp. 14863–14868. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1002220107>.

Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A. and Sanes, J.R. (2012) 'Shared resistance to aging and als in neuromuscular junctions of specific muscles', *PLoS ONE*, 7(4), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034640>.

Valero-Cabré, A. and Navarro, X. (1993) 'H reflex restitution and facilitation after different types of peripheral nerve injury and repair', *Trends in Cell Biology*, 3(11), pp. 363–365. Available at: [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(93\)90083-D](https://doi.org/10.1016/0962-8924(93)90083-D).

Valsecchi, V., Boido, M., De Amicis, E., Piras, A. and Vercelli, A. (2015) 'Expression of muscle-specific MiRNA 206 in the progression of disease in a murine SMA model', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128560>.

Verdú, E., Butí, M. and Navarro, X. (1996) 'Functional changes of the peripheral

nervous system with aging in the mouse', *Neurobiology of Aging*, 17(1), pp. 73–77. Available at: [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02010-1](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02010-1).

Verdú, E., Vilches, J.J., Rodríguez, F.J., Ceballos, D., Valero, A. and Navarro, X. (1999) 'Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice', *Muscle and Nerve*, 22(3), pp. 329–340. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199903\)22:3<329::aid-mus5>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199903)22:3<329::aid-mus5>3.0.co;2-8).

Vermeij, W.P., Reiling, E., Jaarsma, D., Wu, H., Botter, S.M., Eerden, B.C. Van Der, Youssef, S.A., Kuiper, R. V., Nagarajah, B., Oostrom, C.T. Van, Barnhoorn, S., Bruin, A. De, Pothof, J., Vijg, J., Steeg, H. Van, Molecular, D. and Genetics, D.M. (2016) 'Diet restriction delays accelerated aging and genomic stress in DNA repair deficient mice', *Nature*, 537(7620), pp. 427–431. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19329>.Diet.

Viguie, C.A., Lu, D.A.X., Huang, S.K., Rengen, H. and Carlson, B.M. (1997) 'Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat', *Anatomical Record*, 248(3), pp. 346–354. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199707\)248:3<346::AID-AR7>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199707)248:3<346::AID-AR7>3.0.CO;2-N).

Vincent, A. (2002) 'Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis', *Nature Reviews Immunology*, 2(10), pp. 797–804. Available at: <https://doi.org/10.1038/nri916>.

Vinsant, S., Mansfield, C., Jimenez-moreno, R., Del, V., Moore, G., Yoshikawa, M., Hampton, T.G., Prevette, D., Caress, J., Oppenheim, R.W. and Milligan, C. (2013) 'Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion', *Brain Behavior*, 3(4), pp. 431–457. Available at: <https://doi.org/10.1002/brb3.142>.

Visser, L. De and Bos, R. Van Den (2006) 'Novel approach to the behavioural characterization of inbred mice: automated home cage observations', *Genes, Brain and Behavior*, 5(6), pp. 458–466. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00181.x>.

De Waard, M.C., Van Der Pluijm, I., Zuiderveen Borgesius, N., Comley, L.H., Haasdijk, E.D., Rijksen, Y., Ridwan, Y., Zondag, G., Hoeijmakers, J.H.J., Elgersma, Y., Gillingwater, T.H. and Jaarsma, D. (2010) 'Age-related motor neuron degeneration in DNA repair-deficient Ercc1 mice', *Acta Neuropathologica*, 120(4), pp. 461–475. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0715-9>.

Wachsmuth, M., Hübner, A., Li, M., Madea, B. and Stoneking, M. (2016) 'Age-Related

and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number', *PLoS Genetics*, 12(3), pp. 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005939>.

Wallace, J.E., Krauter, E.E. and Campbell, B.A. (1980) 'Motor and reflexive behavior in the aging rat', *Journals of Gerontology*, 35(3), pp. 364–370. Available at: <https://doi.org/10.1093/geronj/35.3.364>.

Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P. and Aiken, J.M. (2001) 'Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia', *The FASEB Journal*, 15(2), pp. 322–332. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.00-0320com>.

Welle, S., Bhatt, K. and Thornton, C.A. (2000) 'High-abundance mRNAs in human muscle: Comparison between young and old', *Journal of Applied Physiology*, 89(1), pp. 297–304. Available at: <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.297>.

Welle, S., Brooks, A.I., Delehanty, J.M., Needler, N. and Thornton, C.A. (2003) 'Gene expression profile of aging in human muscle', *Physiological Genomics*, 14(2), pp. 149–159. Available at: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00049.2003>.

Welle, S., Totterman, S. and Thornton, C. (1996) 'Effect of age on muscle hypertrophy induced by resistance training', *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 51(6), pp. 270–275. Available at: <https://doi.org/10.1093/gerona/51A.6.M270>.

Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M. and Moraes, C.T. (2009) 'Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48), pp. 20405–20410. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0911570106>.

Van Wessel, T., De Haan, A., Van Der Laarse, W.J. and Jaspers, R.T. (2010) 'The muscle fiber type-fiber size paradox: Hypertrophy or oxidative metabolism?', *European Journal of Applied Physiology*, 110(4), pp. 665–694. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1545-0>.

Wheeler, S.J. and Plummer, J.M. (1989) 'Age-related changes in the fibre composition of equine peripheral nerve', *Journal of the Neurological Sciences*, 90(1), pp. 53–66. Available at: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(89\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0022-510X(89)90045-2).

Wijesekera, L.C. and Leigh, P.N. (2009) 'Amyotrophic lateral sclerosis', *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(3), pp. 1–22. Available at: <https://doi.org/10.1186/1750->

1172-4-3.

Willadt, S., Nash, M. and Slater, C. (2018) 'Age-related changes in the structure and function of mammalian neuromuscular junctions', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1412(1), pp. 41–53. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.13521>.

Willadt, S., Nash, M. and Slater, C.R. (2016) 'Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm', *Scientific Reports*, 24849, pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep24849>.

Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R. and Olson, E.N. (2012) 'MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice', *Bone*, 23(1), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1181046>.MicroRNA-206.

Wollgast, J. and Anklam, E. (2000) 'Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification', *Food Research International*, 33(6), pp. 423–447. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5).

Wu, D., Kan, M., Sato, G.H., Okamoto, T. and Sato, J.D. (1991) 'Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors', *Journal of Biological Chemistry*, 266(25), pp. 16778–16785. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)55368-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)55368-0).

Wu, H., Xiong, W.C. and Mei, L. (2010) 'To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly', *Development*, 137(7), pp. 1017–1033. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.038711>.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C. and Spiegelman, B.M. (1999) 'Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1', *Cell*, 98(1), pp. 115–124. Available at: <https://doi.org/10.1109/freq.2001.956373>.

Wullems, J.A., Verschueren, S.M.P., Degens, H., Morse, C.I. and Onambélé, G.L. (2016) 'A review of the assessment and prevalence of sedentarism in older adults, its physiology/health impact and non-exercise mobility counter-measures', *Biogerontology*, 17(3), pp. 547–565. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10522-016-9640-1>.

Wüst, R.C.I., Morse, C.I., De Haan, A., Jones, D.A. and Degens, H. (2008) 'Sex

differences in contractile properties and fatigue resistance of human skeletal muscle', *Experimental Physiology*, 93(7), pp. 843–850. Available at: <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.041764>.

Xiaopeng, L.I. and Larsson, L. (1996) 'Maximum shortening velocity and myosin isoforms in single muscle fibers from young and old rats', *American Journal of Physiology*, 270(1 Pt 1). Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.1.C352>.

Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M.D., LeBrasseur, N.K. and Kirkland, J.L. (2015) 'JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), pp. 6301–6310. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>.

Yang, L., Licastro, D., Cava, E., Veronese, N., Spelta, F., Rizza, W., Bertozzi, B., Villareal, D.T., Hotamisligil, G.S., Holloszy, J.O. and Fontana, L. (2016) 'Long-Term Calorie Restriction Enhances Cellular Quality-Control Processes in Human Skeletal Muscle', *Cell Reports*, 14(3), pp. 422–428. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.042>.

Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T.M., Birchmeier, C. and Burden, S.J. (2001) 'Patterning of Muscle Acetylcholine Receptor Gene Expression in the Absence of Motor Innervation', *Neuron*, 30(2), pp. 399–410. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00287-2).

Yin, H., Price, F. and Rudnicki, M.A. (2013) 'Satellite cells and the muscle stem cell niche', *Physiological Reviews*, 93(1), pp. 23–67. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>.

Young, K. and Morrison, H. (2018) 'Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ', *Journal of Visualized Experiments*, 136(57648), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3791/57648>.

Zane, A.C., Reiter, D.A., Shardell, M., Cameron, D., Simonsick, E.M., Fishbein, K.W., Studenski, S.A., Spencer, R.G. and Ferrucci, L. (2017) 'Muscle strength mediates the relationship between mitochondrial energetics and walking performance', *Aging Cell*, 16(3), pp. 461–468. Available at: <https://doi.org/10.1111/accel.12568>.

Zechner, C., Lai, L., Zechner, J.F., Geng, T., Yan, Z., Rumsey, J.W., Colliá, D., Chen,

Z., Wozniak, D.F., Leone, T.C. and Kelly, D.P. (2010) 'Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity', *Cell Metabolism*, 12(6), pp. 633–642. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.11.008>.

Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W.C. and Mei, L. (2008) 'LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin', *Neuron*, 60(2), pp. 285–297. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.006>.

Zhang, B., Shen, C., Bealmear, B., Ragheb, S., Xiong, W.C., Lewis, R.A., Lisak, R.P. and Mei, L. (2014) 'Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients', *PLoS ONE*, 9(3), pp. 4–9. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091816>.








Zhang, B., Tzartos, J.S., Belimezi, M., Ragheb, S., Bealmear, B., Lewis, R.A., Xiong, W.C., Lisak, R.P., Tzartos, S.J. and Mei, L. (2012) 'Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis', *Archives of Neurology*, 69(4), pp. 445–451. Available at: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.2393>.

Zong, Y., Zhang, B., Gu, S., Lee, K., Zhou, J., Yao, G., Figueiredo, D., Perry, K., Mei, L. and Jin, R. (2012) 'Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling', *Genes and Development*, 26(3), pp. 247–258. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.180885.111.synapse>.

Zurcher, C. and Slagboom, P. (1994) 'Basic aspects of aging', *Pathology of the aging rat*, 2, pp. 573–586.

ARTICLES DERIVATS D'AQUESTA TESI

Motoneuron deafferentation and gliosis occur in association with neuromuscular regressive changes during ageing in mice

Alba Blasco^{1†} , Sílvia Gras^{1†} , Guillem Mòdol-Caballero² , Olga Tarabal¹ , Anna Casanovas¹ , Lúdia Piedrafita¹ , Alejandro Barranco³ , Tapas Das⁴ , Suzette L. Pereira⁴ , Xavier Navarro² , Ricardo Rueda³ , Josep E. Esquerda¹  & Jordi Calderó^{1*} 

¹Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Lleida, Spain, ²Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERNED, Bellaterra, Spain, ³Abbott Nutrition Research and Development, Granada, Spain, ⁴Abbott Nutrition Research and Development, Columbus, OH, USA

Abstract

Background The cellular mechanisms underlying the age-associated loss of muscle mass and function (sarcopenia) are poorly understood, hampering the development of effective treatment strategies. Here, we performed a detailed characterization of age-related pathophysiological changes in the mouse neuromuscular system.

Methods Young, adult, middle-aged, and old (1, 4, 14, and 24–30 months old, respectively) C57BL/6J mice were used. Motor behavioural and electrophysiological tests and histological and immunocytochemical procedures were carried out to simultaneously analyse structural, molecular, and functional age-related changes in distinct cellular components of the neuromuscular system.

Results Ageing was not accompanied by a significant loss of spinal motoneurons (MNs), although a proportion (~15%) of them in old mice exhibited an abnormally dark appearance. Dark MNs were also observed in adult (~9%) and young (~4%) animals, suggesting that during ageing, some MNs undergo early deleterious changes, which may not lead to MN death. Old MNs were depleted of cholinergic and glutamatergic inputs (~40% and ~45%, respectively, $P < 0.01$), suggestive of age-associated alterations in MN excitability. Prominent microgliosis and astrogliosis [~93% ($P < 0.001$) and ~100% ($P < 0.0001$) increase vs. adults, respectively] were found in old spinal cords, with increased density of pro-inflammatory M1 microglia and A1 astroglia (25-fold and 4-fold increase, respectively, $P < 0.0001$). Ageing resulted in significant reductions in the nerve conduction velocity and the compound muscle action potential amplitude (~30%, $P < 0.05$, vs. adults) in old distal plantar muscles. Compared with adult muscles, old muscles exhibited significantly higher numbers of both denervated and polyinnervated neuromuscular junctions, changes in fibre type composition, higher proportion of fibres showing central nuclei and lipofuscin aggregates, depletion of satellite cells, and augmented expression of different molecules related to development, plasticity, and maintenance of neuromuscular junctions, including calcitonin gene-related peptide, growth associated protein 43, agrin, fibroblast growth factor binding protein 1, and transforming growth factor- β 1. Overall, these alterations occurred at varying degrees in all the muscles analysed, with no correlation between the age-related changes observed and myofiber type composition or muscle topography.

Conclusions Our data provide a global view of age-associated neuromuscular changes in a mouse model of ageing and help to advance understanding of contributing pathways leading to development of sarcopenia.

Keywords Sarcopenia; Ageing; C57BL/6J mice; Motoneurons; Central synapses; Glia; Neuromuscular junction; Skeletal muscle

Received: 3 April 2020; Revised: 5 June 2020; Accepted: 15 June 2020

*Correspondence to: Jordi Calderó, Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida–Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Av. Rovira Roure 80, Lleida 25198, Spain. Phone: +34-973-702440, Email:jordi.caldero@udl.cat

[†]These authors contributed equally to this work.

Introduction

The rise of human life expectancy is a contributing factor of frailty, a common clinical syndrome in the elderly, which is characterized by a state of increased vulnerability to adverse outcomes with subsequent disability and morbidity. Frailty is considered a consequence of a collective age-related decline in the function and reserve of multiple organs, with particular involvement of the neuromuscular, endocrine, and immunological systems.^{1,2} Sarcopenia, defined as the progressive loss of muscle mass, strength, and function, is a key component of physical frailty. Sarcopenia leads to mobility impairments and falls in older adults, negatively affecting their quality of life.³ The prevalence of sarcopenia in people over age 60 years has been reported to be 8–40% depending on the sarcopenia definition used; starting about the age 50, humans lose 1–2% of muscle mass per year, with an annual decline in muscle strength of 1.5% between ages 50 and 60 and of 3% thereafter.^{4,5} Sarcopenia in the elderly has been proposed to have a multifactorial aetiology, which includes chronic inflammation ('inflammageing'), metabolic and endocrine alterations, poor nutrition, mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and neurogenic factors.^{6–8} Although notable progress has been made in the understanding of causative factors leading to ageing sarcopenia, the exact cellular and molecular mechanisms responsible for this process still remain elusive. Moreover, there is a remarkable divergence in reported results on the age-related changes observed in distinct components of the neuromuscular system and their contribution to progressive muscle wasting in the elderly. These differences are particularly noticeable when comparing data from different ageing animal models and, even more, when compared with neuromuscular changes reported in human studies. These differences could be due to the fact that many studies focus on specific components of the neuromuscular system rather than a more holistic analysis of the neuromuscular system in its entirety.

Some studies have provided information indicating that an impaired neuromuscular innervation could account for the loss of muscle mass in advanced ages⁹; in line with this, structural changes in both the presynaptic and postsynaptic portions of the neuromuscular junction (NMJ) have been reported to occur with age in both animals and humans.^{10–12} Other studies in aged rodents have reported morphological alterations in motor nerve terminals with increased extent and complexity of their arborization, accompanied by fragmentation of postsynaptic endplates. All these changes appear to reflect continuous cycles of muscle denervation and reinnervation with ageing.¹³ Overall, this process of NMJ remodelling is considered to be a consequence of motoneuron (MN) degeneration with age. Some investigations in humans have reported a significant decrease in the number of MNs in people over 60 years.¹⁴ Similarly, loss of MNs with advancing age has been reported in rodents as well.^{9,15–17} This MN

death could account for the age-associated loss of motor units, particularly of those innervating fast-twitch muscles, and the decrease in muscle power.^{8,18–20} However, the assumption that MN degeneration is the cause of age-related alterations in NMJs is controversial. Thus, some studies performed in murine models have not reported a significant loss of MNs with age.^{21,22} Whatever the case, the fact that age-related alterations in motor nerve terminals are a consequence of an intrinsic skeletal muscle pathology rather than a primary defect in MNs cannot be excluded. In fact, it is well known that muscle fibres play an important role in the maintenance of NMJs.^{23–27} Therefore, a retrograde process ('dying-back') leading to progressive NMJ disruption and MN dysfunction could result from a defect inherent to muscle fibres with the subsequent decline in muscle-derived trophic signals necessary to maintain the integrity and stability of the neuromuscular presynaptic components. This theory is, in part, strengthened by findings indicating that NMJs in humans are remarkably stable throughout the entire adult lifespan,²⁸ suggesting that the structural and functional neuromuscular alterations occurring in the elderly have their main cause in intrinsic muscle deficiencies.

To elucidate the mechanisms leading to age-associated neuromuscular alterations, we undertook a detailed characterization of the pathophysiological changes occurring in the mouse neuromuscular system over the course of ageing. Here, we examined, as a whole, the various distinct cellular components, which shape the neuromuscular system and are essential for proper motor function. We simultaneously analysed structural and molecular changes occurring with age in spinal cord MNs and glia, dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons, motor nerves, NMJs, and skeletal muscles of C57BL/6JRj mice. To assess whether age-related changes in muscles are influenced by their regional location (distal or proximal) and specific function, different hindlimb muscles with a distinct position and myofiber type composition were studied. Moreover, to examine *in vivo* the potential age-related changes in muscle innervation, an electrophysiological analysis using quantitative electromyography was performed. A better understanding of the neuromuscular changes occurring with ageing and the pathogenic mechanisms leading to sarcopenia is crucial towards development of effective interventions aimed at prevention and treatment.

Materials and methods

Animals

All animal handling and experimentation procedures were conducted in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments, the European Communities Council Directive 2010/63/EU for

the care and use of laboratory animals, and the norms established by the *Generalitat de Catalunya* [published in the *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* (DOGC) 2073, 1995]. All experiments were previously evaluated and approved by the Committee for Animal Care and Use of the *Universitat de Lleida* and the Committee for Ethics on Experimental Animal and Human Research of the *Universitat Autònoma de Barcelona*. All efforts were made to minimize suffering and reduce the number of animals in agreement with the European Communities Council Directive (24 November 1986; 86/609/EEC).

C57BL/6JRj mice were supplied by Janvier Labs (Saint Berthevin, France) and were included in four groups of age (young, adult, middle-aged, and old) according to previously defined criteria.²⁹ Briefly, young age was considered at 1–2 months, adult age at 4–10 months, middle age at 10–18 months, and old age at ~19 months and older. The animals used in the present study had the following ages: 1 month (young), 4 months (adult), 14 months (middle-aged), and 24–30 months (old). To avoid potential bias due to gender, only male animals were used in this study. Mice were housed (3 per cage) in the animal care facility of the *Universitat de Lleida* on a 12-h light/dark cycle, having *ad libitum* access to standard laboratory chow and water. According to previous defined criteria,^{30,31} mice displaying tumours, physical abnormalities, and/or evidence of disease were excluded from the study and euthanized by an overdose of pentobarbital (30 mg, intraperitoneally).

Motor behaviour tests

To evaluate the impact of age progression on motor skills, mice were periodically weighed and carefully examined. Open-field (for assessing locomotor activity) and rotarod and grip strength (for assessing motor coordination and balance) tests were subsequently performed every 4 weeks according to previously described guidelines.³² All tests were conducted by the same investigator. Except for open-field test, every mouse was evaluated 3 times with a 15 min recovery period between them; the value obtained in the best test performance was used as the final score. Open-field test was performed by the automated recording of mouse movements using Smart Video Tracking software (v2.5.21, Panlab Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA); different parameters such as time, distance, entries in zones, and average speed were measured.

Electrophysiology tests

Nerve conduction tests were performed in adult and old mice. For motor nerve conduction tests, the sciatic nerve was stimulated percutaneously by means of single pulses of

25 μ s duration delivered through a pair of needle electrodes placed at the sciatic notch. The compound muscle action potential (CMAP, M wave) and the H-reflex wave were recorded from tibialis anterior (TA) and plantar interossei (PL) muscles with microneedle electrodes.³³ The H/M ratio was calculated as the quotient of the maximal H wave and maximal M wave amplitude for each recorded muscle. For sensory nerve conduction tests, the recording electrodes are placed near the digital nerves of the fourth toe to record the compound sensory nerve action potential following stimulation of the sciatic nerve as mentioned previously. All potentials were amplified and displayed on a digital oscilloscope (Tektronix 450S, Tektronix, Beaverton, OR, USA) at appropriate settings to measure the amplitude from baseline to the maximal negative peak and the latency from stimulus to the maximal negative peak. To ensure reproducibility, the recording needles were placed under microscope to secure the same placement on all animals guided by anatomical landmarks. During the tests, the mice body temperature was maintained constant between 34°C and 36°C by means of a thermostat heating pad.

We also performed a motor unit number estimation (MUNE) test in the TA muscle, using the same setting as for the motor nerve conduction test. The protocol used was based on the incremental technique.³⁴ Starting from sub-threshold intensity, the sciatic nerve was stimulated with single pulses of gradually increased intensity until the first CMAP response appeared, representing the first motor unit recruited. With the next stimuli, quantal increases in the response were recorded. Increments $>50 \mu$ V were considered as the recruitment of an additional motor unit. The amplitude of a single motor unit was calculated as the mean of more than 15 consistent increases. The estimated number of motor units resulted from the equation: MUNE = CMAP maximal amplitude/mean amplitude of single motor unit action potentials.

Tissue sample preparation, histological analysis, and motoneuron counts

At chosen time points, mice were anaesthetized and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After animal perfusion, spinal cords, L4 DRGs and ventral nerve roots (VRs), and entire hindlimb skeletal muscles were rapidly dissected. Nerve roots were then immersed in 1% PFA and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB at pH 7.4 for 24 h. Muscle samples were processed for histology and further morphometry according to previously described procedures.³⁵ Muscles examined include the extensor digitorum longus (EDL), a fast-twitch muscle involved in the dorsiflexion of the foot and extension of toes during locomotion; the TA, a fast-twitch muscle, which helps with dorsiflexion and inversion of the foot; the soleus (Sol), a

relative slow-twitch muscle in mice, which plays an important function in maintaining the standing posture and is also utilized for plantarflexion during walking; and the gracilis (Gra), a fast-twitch, more proximal muscle, located in the medial side of the thigh, which is mainly involved in adduction of the limb and also assists knee flexion.³⁶

For histology and MN counts, the spinal cords surrounded by their vertebrae were maintained in Bouin's solution for 2 months and embedded in paraffin. Serial transverse sections (14 μm thick), obtained throughout the entire lumbar (L1–L5) segment, were stained with haematoxylin and eosin (H&E). α -MNs, located in the ventral horn, were identified by their size (soma diameter > 20 μm), morphology (multipolar appearance, prominent nucleolus, and abundant Nissl granules in cytoplasm), and topography in Lamina IX of grey matter. MNs were counted blindly on one side of every 10th section, according to previously described criteria.^{37,38} Briefly, only MNs with a large nucleus and a visible clump of nuclear material and a substantial intense basophilic cytoplasm were included in the counts. These stringent criteria make not necessary the use of a correction factor for double counting.³⁷ The number of cells counted was multiplied by 10 to obtain the total number of MNs per ventral horn.

Ventral nerve roots were postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) epoxy resin, following standard procedures. Semithin transversal sections (1 μm thick) were stained with methylene blue and imaged using an Olympus 60x/1.4NA PlanApo oil immersion objective (Olympus) and a DMX 1200 Nikon (Tokyo, Japan) digital camera.

Muscles were cleaned, cleared of the excess of connective tissue, blotted dry, and weighed. After this, muscles were postfixed in 4% PFA in 0.1 M PB (pH 7.4), cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PB, embedded in tissue freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA), and frozen. Cryostat transverse sections (16 μm thick), obtained from the mid-belly of the muscle, were stained with H&E.

Immunocytochemistry and imaging

For immunocytochemical analysis, lumbar spinal cords, L4 DRGs, and skeletal muscles were postfixed by immersion in 4% PFA in 0.1 M PB (pH 7.4), either overnight (for spinal cords and DRGs) or for 2 h (for muscles), and cryoprotected. Tissue samples were embedded in tissue freezing medium and frozen. Longitudinal (16 μm thick for muscles) and transverse (16 μm thick for muscles and 14 μm thick for spinal cords and DRGs) serial cryostat sections were obtained and stored at -80°C .

Tissue sections were sequentially rinsed in phosphate-buffered saline containing 0.1% Triton X-100 for 30 min, blocked in normal goat serum or normal horse serum, and subsequently incubated with the chosen primary

antibody. The primary antibodies used are indicated in *Table 1*.

After incubation with the primary antibody, sections were washed with phosphate-buffered saline and incubated for 1 h at room temperature with the appropriate secondary fluorescent antibodies labelled with one of the following fluorochromes (1:500): Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Cy3, or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). The spinal cord sections were finally counterstained with blue fluorescent NeuroTrace Nissl staining (1:100; Molecular Probes). Muscle sections were incubated with Alexa Fluor 555-conjugated α -bungarotoxin (α -Bgtx, 1:500; Molecular Probes) to identify postsynaptic acetylcholine receptors. Some sections were also stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 50 ng/mL; Molecular Probes) for DNA staining. To avoid lipofuscin-like autofluorescence, slides with sections of spinal cord from old mice were treated with the Autofluorescence Eliminator Reagent (Merck, Madrid, Spain), following incubation with the secondary antibodies. Some slides with DRG were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated *Bandeiraea simplicifolia* lectin [isolectin B₄ (IB4), 1:25; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA].

After washing, slides were coverslipped using an anti-fading medium containing 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 20% glycerol, 10% Mowiol, and 0.1% 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane. Slides were examined with and 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.

Electron microscopy

Ultrathin sections of L4 VRs embedded in Embed812 were obtained and counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were observed in a JEOL JEM 1400 (JEOL, Tokyo, Japan) transmission electron microscope.

Image analysis and morphometry

Image and morphometric examinations were performed on blinded images by two independent investigators. Digital images were analysed with ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Table 1 Primary antibodies used for immunocytochemistry

Target	Host species	Source/catalogue no.	Dilution
14-3-3	Mouse monoclonal	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA)/F46820	1:100
Agrin	Mouse monoclonal	Millipore (Temecula, CA)/MAB5204	1:100
Calcitonin gene-related peptide	Rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)/C8198	1:1000
CD206	Goat polyclonal	R&D Systems (Minneapolis, MN)/AF2535	1:100
Choline acetyltransferase	Goat polyclonal	Millipore/AB144	1:250
Fibroblast growth factor binding protein 1	Rabbit polyclonal	Bioss Antibodies, (Boston, MA)/bs-1768R	1:80
Glial fibrillary acidic protein	Chicken polyclonal	Abcam (Cambridge, UK)/ab4674	1:1000
Growth associated protein 43 (H-100)	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)/sc-10786	1:50
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Rabbit polyclonal	Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)/019-19,741	1:500
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Goat polyclonal	Abcam/ab5076	1:500
Laminin	Rabbit polyclonal	Abcam/ab30320	1:1000
Mac-2	Rat monoclonal	Cedarlane (Burlington, Canada)/CL8942AP	1:800
Matrix metalloproteinase-9	Goat polyclonal	Sigma-Aldrich/M9570	1:10
Myosin heavy chain I	Mouse monoclonal	Developmental Studies Hybridoma Bank [DSHB] (Iowa City, IA, USA)/A4-840	1:5
Myosin heavy chain IIA	Mouse monoclonal	DSHB/SC-71	1:20
Myosin heavy chain IIB	Mouse monoclonal	DSHB/BF-F3	1:20
Neurofilament 68 KDa	Chicken polyclonal	Abcam/ab72997	1:1000
Paired box protein 7	Mouse monoclonal	R&D Systems/MAB1675	1:50
Parvalbumin	Mouse monoclonal	Swant (Marly, Switzerland)/PV235	1:2000
S100β	Rabbit polyclonal	Abcam/ab41548	1:3000
Synaptic vesicle protein 2	Mouse monoclonal	DSHB/SV2	1:1000
Transforming growth factor-β1	Rabbit polyclonal	Abcam/ab92486	1:100
Vesicular acetylcholine transporter	Guinea pig polyclonal	Synaptic Systems (Gottingen, Germany)/#139105	1:500
Vesicular GABA transporter	Guinea pig polyclonal	Synaptic Systems/#131004	1:200
Vesicular glutamate transporter 1	Rabbit polyclonal	Synaptic Systems/#135302	1:1000
Vesicular glutamate transporter 2	Guinea pig polyclonal	Synaptic Systems/#135404	1:200

Myofiber cells counts and size measurements were performed in a single random image per muscle taken from its mid-belly and immunostained for laminin. Myofiber type composition of different muscles was examined in transversal sections immunostained with different isoform-specific anti-myosin heavy chain (I, IIA, and IIB) antibodies (for types 1, 2A, and 2B myofibers, respectively). Images were captured with a digital camera (Olympus DP30BW), and the number of types 1 (slow-twitch), 2A (fast-twitch fatigue-resistant), and 2B (fast-twitch fast-fatigable) myofibers was counted and expressed as a percentage of total myofiber number. The proportion of myofibers showing central nuclei was also counted on images from DAPI-stained sections. The percentage of myofibers showing lipofuscin aggregates and the number and the area of these aggregates were also measured using ImageJ.

The cytoarchitecture of the NMJs was assessed in longitudinal immunostained sections of muscles. Z-stack optical sections (1 μm thick) were obtained with the confocal microscope and projected to reconstruct NMJs; maximum intensity projections of stacks were created using the microscope software. Three to five sections were examined for each muscle, in which NMJs from different randomly selected visual fields were analysed. NMJ size was measured by determining the area of manually outlined α-Bgtx-labelled

postsynaptic site. Full or partial denervation is considered when the postsynaptic site was not completely apposed by the nerve terminal immunostained for both neurofilament 68 KDa (NF) and synaptic vesicle protein 2, as presynaptic marker. Single or polyinnervation was estimated counting the number of preterminal axons, stained with anti-NF antibody, entering a single postsynaptic site: an NMJ was defined as polyinnervated when it was occupied by two or more axons. Terminal sprouting was quantified by counting the number of NF-stained axonal processes coming from a nerve terminal that escaped from an α-Bgtx-labelled postsynaptic site; the number of sprouts per NMJ counted was referred as a percentage of the total number of NMJs examined per muscle. On the basis of the morphological appearance of the postsynaptic site, the degree of NMJ maturity was classified as plaque, folds, perforations, or pretzel-like (secondary) structure ranging from immature to mature, according to previously described criteria.³⁹ An NMJ was defined as fragmented when its postsynaptic site displayed a discontinued appearance, with five or more acetylcholine receptor (AChR) islands stained with α-Bgtx and/or unusually small and irregular clusters of AChR. Immunostaining for calcitonin gene-related peptide (CGRP), growth associated protein 43 (GAP-43), agrin, fibroblast growth factor binding protein 1

(FGFBP1), and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was estimated based on pixel intensity after background subtraction in NMJs, which postsynaptic site was visualized with α -Bgtx; an average of 50 NMJs per muscle was examined to assess the different morphometric parameters and the intensity of immunostaining. Any NMJ that was difficult to examine due to its location and/or orientation was excluded from the analysis. AChR extrasynaptic accumulations were quantified by estimating the number of α -Bgtx labelled spots in muscle sections after synaptic α -Bgtx exclusion; an average of 35 muscle sections from 3–5 animals per condition were analysed.

The analysis of central synapses, CGRP and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MNs, and glia in the ventral horn was performed on confocal images taken from every 30th section of the entire lumbar spinal cord. The number and area of vesicular acetylcholine transporter (VAcChT), vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1), VGluT 2, and vesicular GABA transporter (VGAT)-immunoreactive synaptic boutons on MN somata were counted and measured by delineating their periphery on the screen; only boutons that were in close contact with MNs displaying a large nucleus and visible nucleolus were included in the counts, and numbers were normalized to the perimeter of MN soma. Levels of immunoreactivity for ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba1), Mac-2, CD206, glial fibrillary acidic protein (GFAP), 14-3-3, and S100 β in the spinal cord and those of CGRP and MMP-9 in MNs were quantified by analysing pixel intensity following background subtraction. Spinal cord microglia morphology was quantified in confocal images from Iba1-immunostained sections by using an ImageJ software for skeleton analysis [AnalyzeSkeleton (2D/3D) from <http://imagej.net/AnalyzeSkeleton>]. Analysis was performed according to a previously described procedure.⁴⁰ For this, digital photomicrographs were transformed to 8-bit grayscale and then binarized to obtain a black and white image by means of a formerly established threshold. Every image was manually edited to obtain an image with a continuous set of pixels and gaps between processes belonging to neighbouring cells. The image was then saved, and the plugin AnalyzeSkeleton (2D/3D) was run. The accuracy of skeletonized images was assessed, by creating an overlay of the obtained skeleton with the corresponding original image.

The number and soma area of CGRP, IB4, and parvalbumin (PV)-immunolabelled sensory neurons in the DRGs were measured on digital images.

The number and diameter of healthy and degenerating myelinated axons were determined on $\times 60$ images taken from VR semithin cross sections stained with methylene blue. The images were joined together to obtain a whole picture of an entire nerve root transverse section; the diameter of the myelinated axons was measured by delineating the outer profile of the myelin sheath. Axon diameter and g -ratio measurements were performed on electron micrographs of VRs. ImageJ g -ratio plugin was used to obtain semiautomated

measurement of randomly selected nerve fibres; the axon diameter was divided by the outer diameter of the myelin sheath. At least 100 myelinated axons per mouse (4–5 mice per condition) were measured.

Statistical analysis

Data are reported as mean \pm standard error of the mean. The statistical analysis was performed by either one-way or two-way analysis of variance followed by *post hoc* Bonferroni's test or two-tailed Student's t -test when only two different groups were compared. The level of significance was established at $P \leq 0.05$. GraphPad Prism 6 software was used for statistical analysis and graph presentations of data.

Results

Reduction in the locomotor activity of mice during ageing

As expected, the body weight of animals was different with age. A gradual increase in growth-related weight was observed between 4 and 10 months of age (Supporting Information, *Figure S1A*). However, the older animals (19–28 months of age) had significant lower average weight than the adults (Supporting Information, *Figure S1A*). Moreover, as mice age, a gradual and significant decline in locomotor activity was detected with the open-field test, with this decline being markedly prominent from 24 months onwards (Supporting Information, *Figure S1B* and *C*). In our hands, rotarod and grip strength tests were not suitable for monitoring the age-associated progression of changes in motor skills; several confounds and challenges in the interpretation of results were found with these tests, particularly when performed in young and adult mice: a number of them fell soon after they were placed on either the rod or the wire grid, or refused the tests. This aspect is not unusual in longitudinal assessments or repetitive tests, as those performed in the present study: after test repetitions, the animals end up learning the innocuous consequences of falling.³² Although these mice were excluded from the analysis, we think that data from rotarod and grip strength tests were not reliable enough to be conclusive. For this reason, we preferred to focus in results from open-field test.

Age-related electrophysiological changes

Data from the nerve conduction tests are detailed in *Table 2*. Compared with adult mice, old (24 months) animals exhibited a reduction in conduction velocity, revealed by an increase in the latency time, in both motor and sensory nerves.

Table 2 Results from motor and sensory nerve conduction tests

Parameter	Adult (6 months, <i>n</i> = 10)	Old (24 months, <i>n</i> = 8)
TA Lat (ms)	1.48 ± 0.06	1.54 ± 0.08
TA CMAP (mV)	54.6 ± 1.9	50.7 ± 2.3
SMUA (µV)	1,572 ± 39	1,240 ± 109*
MUNE	42 ± 1.3	38 ± 1.7
PL Lat (ms)	1.89 ± 0.08	2.38 ± 0.17*
PL CMAP (mV)	7.51 ± 0.50	5.24 ± 0.68*
PL H wave Lat (ms)	5.5 ± 0.3	6.7 ± 0.3*
PL H/M ratio (%)	17 ± 3.4	32 ± 4.1*
DgN Lat (ms)	1.27 ± 0.06	1.41 ± 0.05*
DgN CNAP (µV)	31.6 ± 2.8	29.5 ± 2.5
Weight (g)	29.1 ± 0.6	29.5 ± 0.7

CMAP, compound muscle action potential; CNAP, compound nerve action potential; DgN, 4th digital nerve; Lat, latency at the peak of the wave; MUNE, motor unit number estimation; PL, plantar interosseous muscle; SMUA, single motor unit amplitude; TA, tibialis anterior muscle.

Statistical comparisons are made with Student's *t*-test and Sidak-Bonferroni's method for multiple comparisons.

**P* < 0.05 vs. adult group.

Moreover, a decline in the amplitude of the CMAP, which was more evident in the distal PL muscle than in the more proximal TA muscle, was observed. The CMAP amplitude decline was attributable to a slight decrease in both the number and size of motor units (MUNE and single motor unit amplitude, respectively). Interestingly, the sensory CNAP recorded in the toes did not decrease significantly in old mice, suggesting that the motor decline could be accounted, in part, to muscle loss and compressive forces on the foot sole occurring with age.

With regard to the H wave, the electrical counterpart of the spinal stretch reflex, the latency of the H wave in the PL muscle was found to be longer in old mice than in adult mice, although the mean amplitude was similar in both groups. The H/M ratio, indicative of the excitability of the Ia afferent synapses on spinal MNs, was higher in old than in adult mice, likely due to compensatory mechanisms aimed to maintain an adequate muscle reflex response.

Age-related changes in spinal cord motoneurons

On the basis of contradictory data on age-associated MN loss previously reported in humans and rodents,^{9,14–17,21,22,41,42} we decided to re-examine this issue. We first analysed the morphology of lumbar spinal cord MNs in cryostat sections immunolabelled with an antibody against choline acetyltransferase, as an MN marker, and counterstained with fluorescent Nissl for neuron visualization (Figure 1A1–B2). Compared with young MNs, adult MNs showed a slight (although not significant) increase in soma size, consistent with their higher degree of maturity and the increase in the axonal length (Figure 1I). No significant reduction in the average soma size was found in old MNs with respect to adult ones (adult: 536.30 ± 33.03 µm²; old: 508.42 ± 47.22 µm²; *P* > 0.05; Figure 1I), indicating that ageing does not entail an atrophy of spinal cord MNs. We then counted the total

number of apparently healthy MNs present in the whole lumbar spinal cord on serial transverse paraffin sections stained with H&E (Figure 1C–H). We found no significant changes in the total number of lumbar MNs between young, adult, and old mice (Figure 1J), indicating that no overt MN death occurred during ageing. A detailed analysis of H&E-stained spinal cord sections highlighted the presence of some MNs having an abnormal basophilic dark appearance (Figure 1F and H). These 'dark' MNs could be clearly distinguished from commonly lighter stained (apparently healthy) MNs and perhaps represent an injury-related change. Whereas dark MNs were very scarce and found occasionally in young animals, their presence increased with age, so in old animals, the proportion of dark MNs was significantly higher than that in young mice (Figure 1K). In some cases, dark MNs were shrunken and displayed a deformed appearance, which contrasted with other MNs that were hyperstained but maintain a normal architecture. MNs located in the ventral horn of lumbar spinal cord are organized in three major columns (anteromedial, intermediate, and anterolateral), which are the reflection of muscular groups innervated by these MNs. Thus, the anteromedial column MNs innervate axial muscles, whereas MNs located in the intermediate and anterolateral columns innervate proximal and distal hindlimb muscles, respectively. By counting MNs in these three columns independently, we observed that the number of apparently healthy MNs slightly, but not significantly, decreased in the anterolateral column of old mice with respect to adult animals (Figure 1L). We also noticed that the number of dark MNs rose with age in the three MN columns, with this increase being more pronounced in the intermediate column (Figure 1M).

It has been shown that in MN diseases, spinal MNs exhibit differential vulnerability to degeneration.^{39,43,44} In this regard, MNs innervating slow-twitch muscles (slow MNs) exhibit a higher degree of resistance than those innervating fast-twitch muscles (fast MNs). MMP-9 has been reported to be selectively expressed in fast MNs and has been considered as a determinant factor of specific vulnerable neuronal subpopulations.⁴⁵ We wanted to examine whether ageing induced changes in the degree of MN vulnerability to degeneration by analysing MMP-9 expression (a marker of vulnerability) in the spinal cord of young, adult, and old animals. Compared with young mice, the proportion of lumbar spinal cord MNs showing MMP-9-positive immunolabelling was moderately reduced in adult animals (Figure 2A). This reduction was accompanied by a modest, although significant, decrease in the intensity of MMP-9-immunostaining in adult MNs (Figure 2B). No further changes in either the number of MMP-9-positive MNs or MMP-9-staining intensity were noticed in old mice compared with adult mice (Figure 2A and B). In all the ages examined, MNs that were MMP-9 positive displayed a larger size than those which were MMP-9 negative (Figure 2C); this finding is in agreement with previous reports and fits with the statement that MMP-9 is selectively

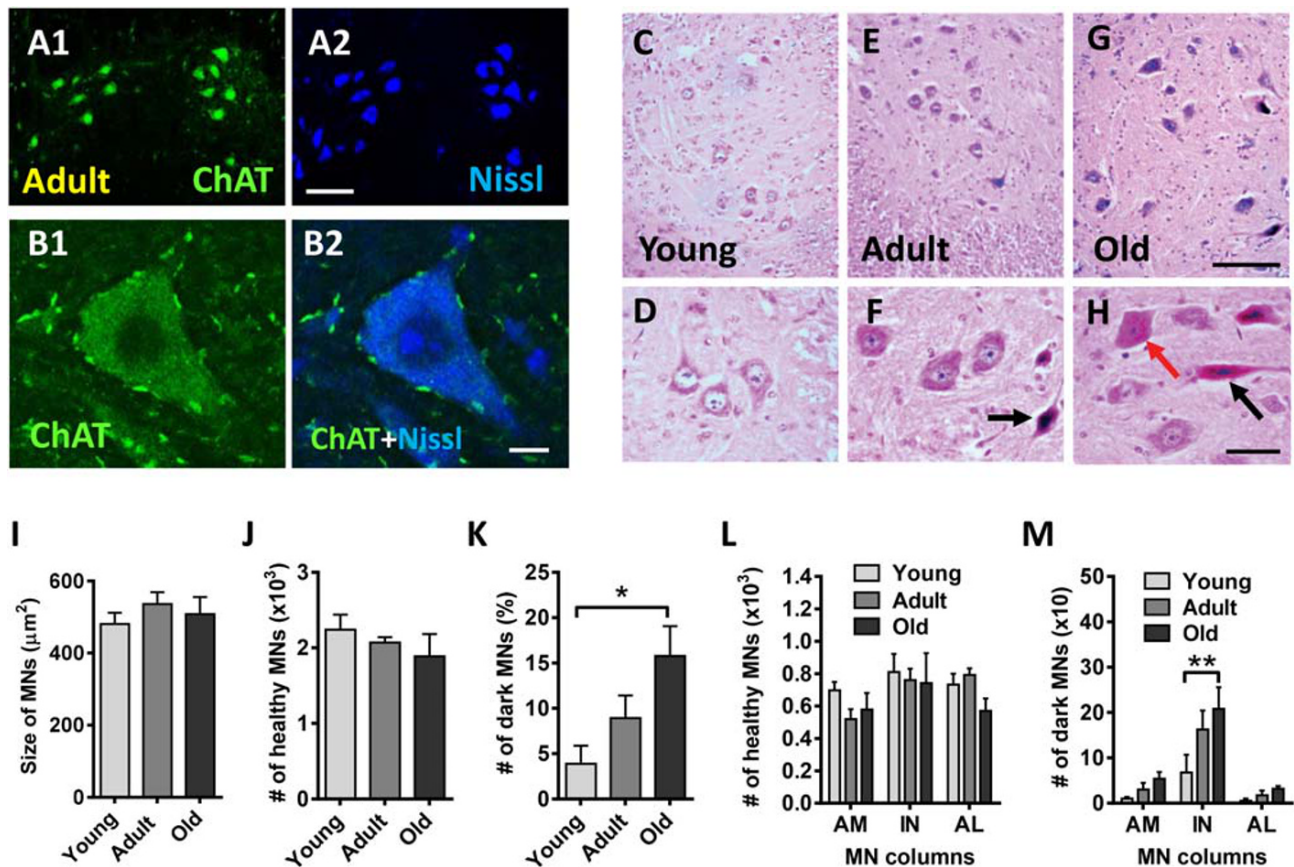


Figure 1 No significant motoneuron (MN) loss occurs in the lumbar spinal cord of mice with ageing. (A1–B2) Representative images of MNs in the spinal cord of adult mice immunolabelled with an antibody anti-choline acetyltransferase (ChAT) (green), as an MN marker, and counterstained with fluorescent Nissl for neuron visualization (blue) as indicated. (C–H) Representative images of haematoxylin and eosin-stained MNs in the lumbar spinal cord of (C and D) young, (E and F) adult, and (G and H) old mice. The appearance of these MNs is shown at a higher magnification in (D, F, and H); black arrows in (F) and (H) indicate dark-stained and shrunken MNs; the red arrow in (H) points to a non-shrunken, hyperchromic, MN. (I) Average size (soma area in μm^2) and (J) number of apparently healthy MNs and (K) proportion of dark MNs (expressed as the percentage of MNs), in the lumbar spinal cord of young, adult, and old mice. (L) Number of healthy and (M) dark MNs in anteromedial (AM), intermediate (IN), and anterolateral (AL) columns of ventral horn. The data in graphs are shown as mean \pm SEM, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (one-way or two-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test); 4–5 mice per age. Scale bars: (A2) = 100 μm [valid for (A1)]; (B2) = 10 μm [valid for (B1)]; (G) = 100 μm [valid for (C) and (E)]; (H) = 40 μm [valid for (D) and (F)].

expressed in fast, more larger sized, and vulnerable α -MNs.⁴⁵ Moreover, our results suggest that once the degree of vulnerability is achieved in adulthood, no overt changes in MN susceptibility to degeneration occur with age progression.

In MNs, the neuropeptide CGRP is synthesized in the cell body and subsequently transported to nerve terminals where it appears to play a role in the development and maintenance of muscle cells and NMJs.^{46–50} As previously reported by we and others,^{49,51} CGRP was found in subpopulations of spinal cord MNs and, in a particular MN pool, CGRP levels differed between cells, so that some cells exhibited higher contents of this neuropeptide than others. As expected from previous studies (Matteoli *et al.*⁵² and our own observations), compared with young mice, adult animals showed decreased numbers of CGRP-immunostained MNs, with these exhibiting lower levels of immunoreactivity (Figure 2D–F). No significant changes in the number of MNs expressing CGRP were found

in old mice compared with adult animals; old MNs, however, displayed a significant increase in CGRP content compared with adult MNs (Figure 2E and F). Representative immunostaining for MMP-9 and CGRP in young, adult and old MNs is shown in Figure 2G1–I4.

Ageing is accompanied by significant depletion of afferent inputs to motoneurons

We analysed the density of afferent synapses on lumbar spinal cord MNs of old mice compared with adult animals. The number of synaptic boutons on MN somata was quantified after immunostaining with anti-VACHT, VGluT1 and VGluT2, and VGAT antibodies for cholinergic (C-boutons), glutamatergic excitatory, and GABAergic inhibitory synapses, respectively (Figure 3C1–D2, G1–H2, K1–L2, and O1–P2). We

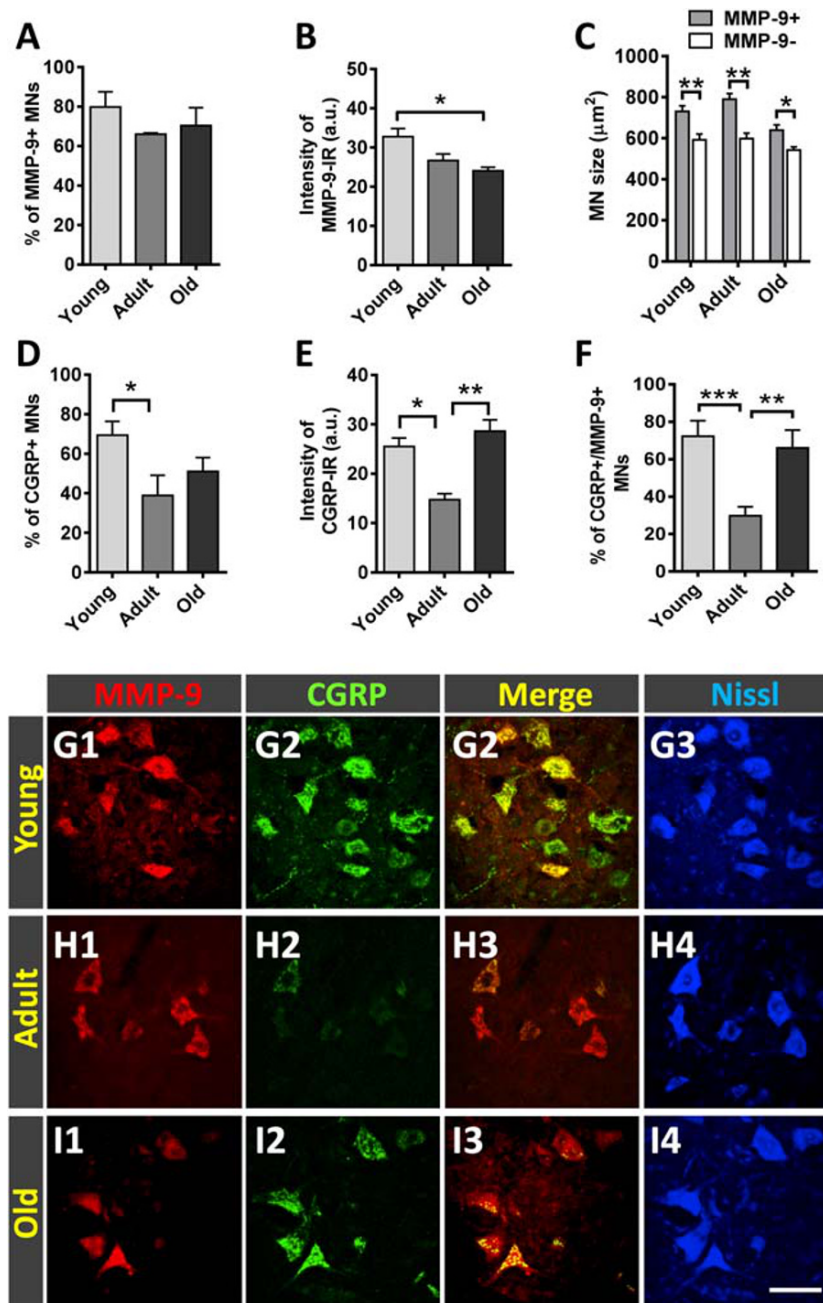


Figure 2 Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in lumbar spinal cord motoneurons (MNs) of young, adult, and old mice; MMP-9 immunostaining is used as a marker of MN vulnerability. (A) Proportion of MNs displaying positive MMP-9-immunoreactivity (IR); the average intensity of the latter is shown in (B). (C) Size (in μm²) of MN somata exhibiting either positive or negative MMP-9 immunostaining. Age-related changes in the proportion of MNs showing (D) CGRP positivity and (E) in the immunoreaction (IR) intensity in these MNs. (F) Percentage of MNs displaying both CGRP and MMP-9 immunostaining. (G1–I4) Representative images taken from spinal cord sections double immunolabelled for MMP-9 (red) and CGRP (green) and counterstained with fluorescent Nissl staining (blue; for MN visualization). Data in the graphs are expressed as the mean ± SEM, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 vs. adult (one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test); *n* = 4–6 animals per age; 50 MNs per animal were analysed. Scale bar: (I4) = 60 μm [valid for (G1–I3)].

found that compared with adult MNs, old MNs exhibited a significant decrease in the density of both C-boutons and glutamatergic afferent terminals on cell bodies [~40% (VACHT), 45% (VGlut1), and 43% (VGlut2) decrease] (Figure 3A, B, E,

F, I, and J). No differences in the number of GABAergic synapses were observed between old and adult MNs, although a significant reduction (~20%) in the size of this type of inhibitory afferents was noticed on MNs of old animals (Figure

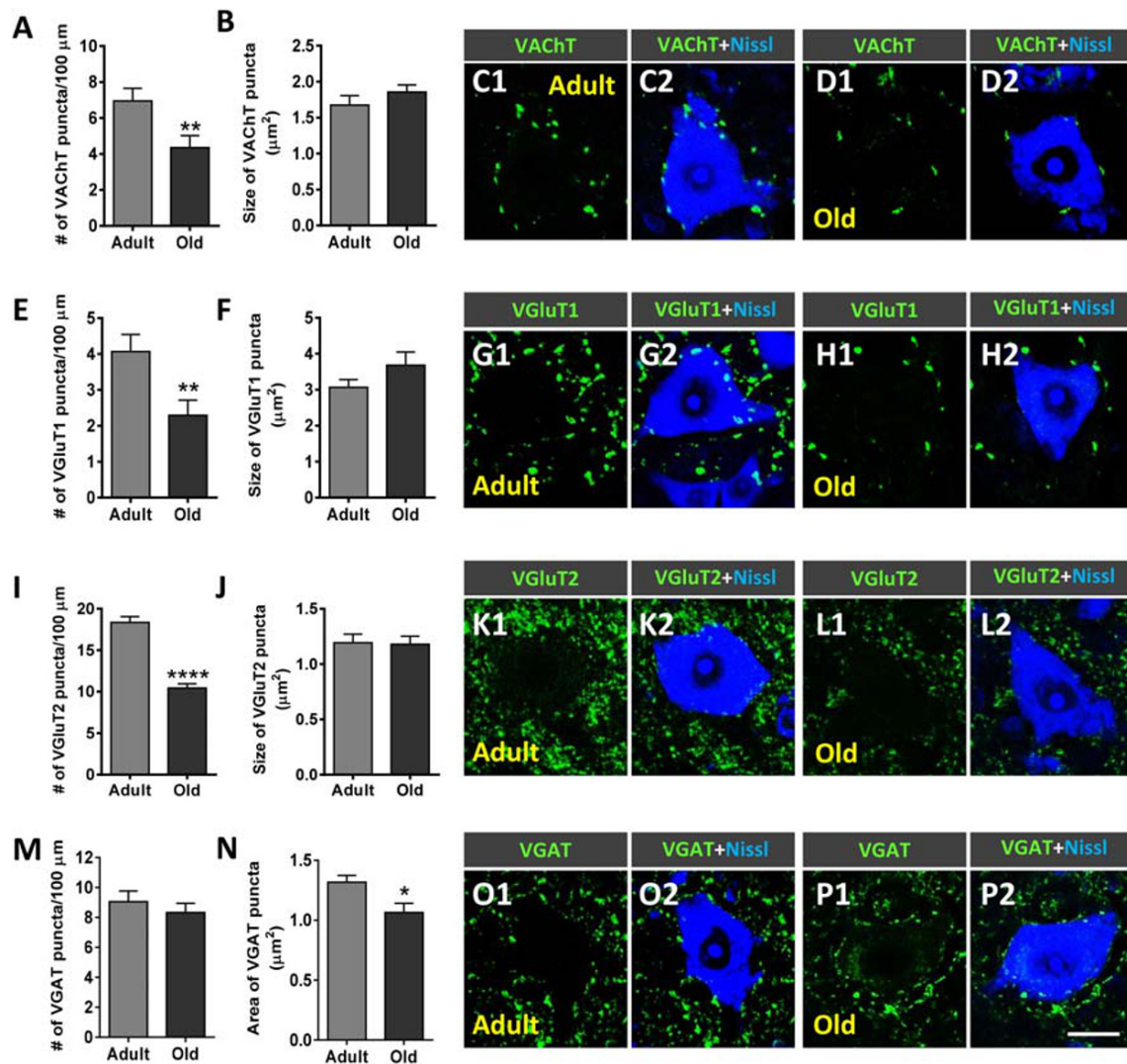


Figure 3 Age-related changes in synaptic inputs to lumbar spinal cord motoneurons (MNs). (A–P2) Sections were immunostained to identify cholinergic [vesicular acetylcholine transporter (VChT)], glutamatergic [vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) and vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2)], and GABAergic [vesicular GABA transporter (VGAT)] afferent synapses (green) and counterstained with fluorescent Nissl staining (blue) to visualize MN cell bodies. Graphs show the average density [(A, E, I, and M) number of puncta per 100 μm soma perimeter and (B, F, J, and N) size (in μm^2) of the different types of afferent terminals analysed. Representative confocal micrographs of (C1–D2) VChT, (G1–H2) VGluT1, (K1–L2) VGluT2, and (O1–P2) VGAT terminals contacting (C1–C2, G1–G2, K1–K2, and O1–O2) adult and (D1–D2, H1–H2, L1–L2, and P1–P2) old MNs are shown. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and **** $P < 0.0001$ vs. adult (Student's *t*-test); 50–60 MNs were analysed per animal (4–6 animals per age group). Scale bar in (P2) = 20 μm [valid for (C1–D2, G1–H2, K1–L2, and O1–P1)].

3M and N). These results indicate that ageing results in a marked loss of central synapses, mainly involving cholinergic and glutamatergic inputs to MNs.

Gliosis occurs in spinal cord during ageing

Activation of glial cells in the ventral horn of spinal cord has been described to occur in different motoneuronal pathologies including MN diseases and peripheral nerve injury.^{53–57} To explore whether glial activation also occurs in the aged

spinal cord, microglia and astroglia were analysed after immunolabelling for Iba1 and GFAP, respectively (Figure 4A–F2). Compared with adult mice, old animals exhibited significantly higher levels of both Iba1 and GFAP immunoreactivity [$\sim 93\%$ and $\sim 100\%$ increase ($P < 0.001$ and $P < 0.0001$), respectively] in the ventral horn of spinal cords (Figure 4A and D), reflecting an increased density of microglial and astroglial profiles. This indicates that prominent microgliosis and astroglia occur around aged MNs. The degree of ramification and complexity of microglia was quantified by using a skeleton analysis procedure,⁴⁰ which measures

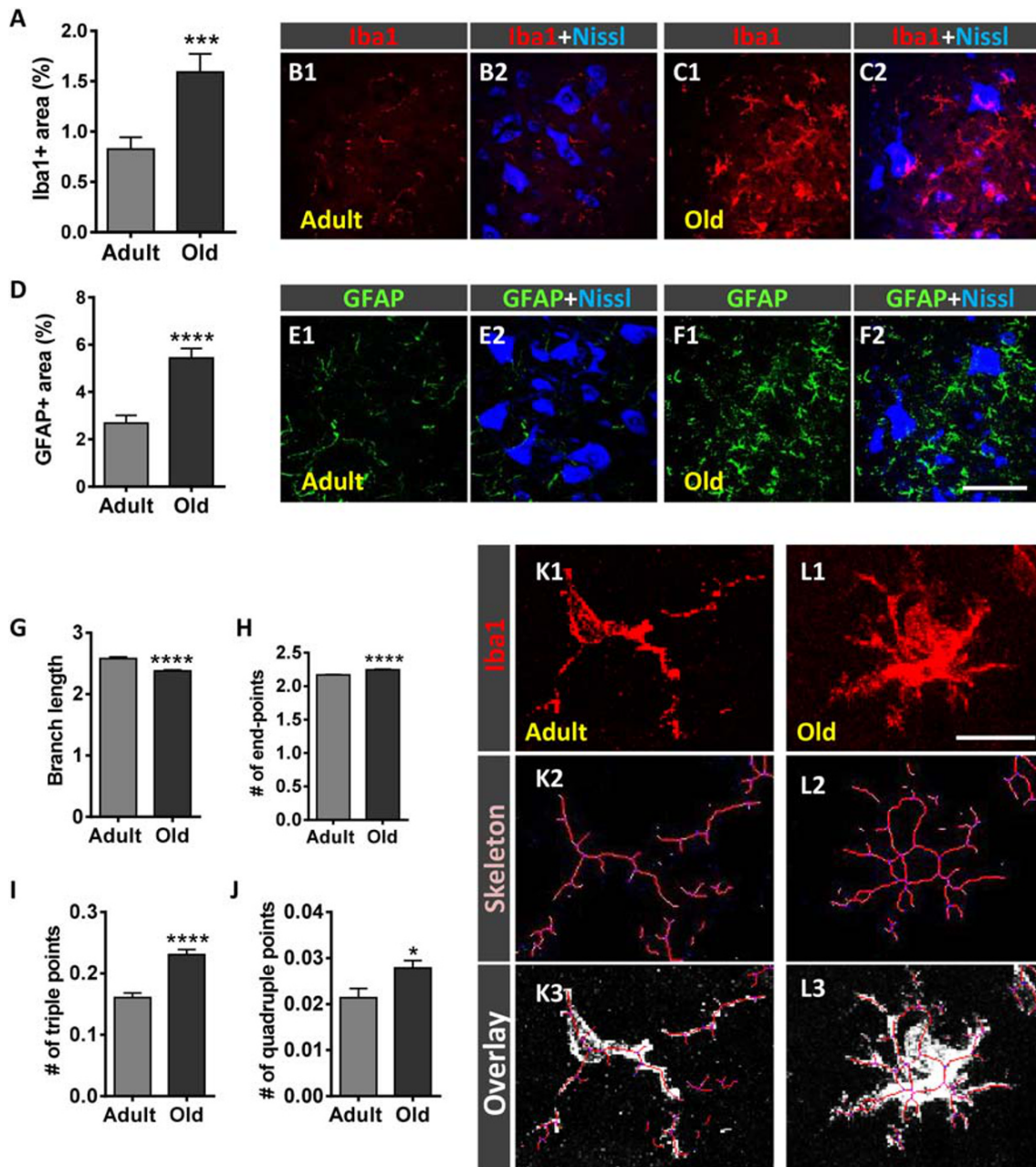


Figure 4 Ageing is accompanied by prominent microgliosis and astrogliosis in the spinal cord. (A–F2) Serial sections of lumbar spinal cord were immunostained to visualize Iba1 and GFAP, for microglia and astroglia, respectively. Quantification of (A) ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)-positive microglia and (D) glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astroglia expressed as the percentage of the ventral horn area occupied by Iba1-positive and GFAP-positive profiles. Representative confocal micrographs showing (B1–C2) Iba1 (red) and (E1–F2) GFAP (green) staining in the ventral horn spinal cord of (B1–B2 and E1–E2) adult and (C1–C2 and F1–F2) old mice; fluorescent Nissl staining (blue) was used for motoneuron visualization. (G–L3) Quantification of changes in microglial morphology by using a skeleton analysis procedure (see Materials and Methods section). The average (G) branch length, (H) number of endpoints, and (I) of triple and (J) quadruple points are shown. Representative images showing (K1 and L1) Iba1-stained profiles, (K2 and L2) the skeletonized images, and (K3 and L3) the overlay of the skeleton and the original image of microglia in (K1–K3) adult and (L1–L3) old mice. Data in the graphs are expressed as the mean ± SEM; the spinal cord of four animals per age group was used for analysis; a total of 40–45 sections (in A and D) and 7,000–12,000 cells (in G–J) per age were examined. **P* < 0.05, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001 vs. adult (Student’s *t*-test). Scale bar: In (F2) = 30 μm [valid for (B1–C2) and (E1–F1)]; in (L1) = 20 μm [valid for (K1)].

different parameters of microglia morphology in an entire region of ventral horn (Figure 4G–L3). Compared with adult microglia, those of old mice displayed reduced lengths of

processes and increased number of endpoints in association with significant greater amounts of branches, as indicated by the increased numbers of triple and quadruple points

quantified (Figure 4G–J). These results indicated that with ageing, gliosis involves structural changes in microglia, which become more ramified and complex.

When activated, microglia and astroglia can attain one of two opposing maturation phenotypes: M1 and M2 for microglia and A1 and A2 for astroglia.^{53,58} Whereas M1 and A1 phenotypes have been related to inflammation and degeneration, the M2 and A2 phenotypes have been associated with anti-inflammatory and regenerative processes. To examine which type of microglial and astroglial phenotype is activated in the spinal cord as a consequence of age-related reactive gliosis, Iba1 and GFAP immunocytochemistry was combined with either Mac-2 or CD206 (for M1 or M2 microglia) and 14-3-3 or S100 β (for A1 or A2 astroglia) immunolabelling, respectively^{59–62} (Figure 5A–T). Compared with spinal cords of adult mice, those of old animals exhibited a prominent increase in the density of harmful M1 (Mac-2-positive) profiles and a modest reduction in M2 (CD206-positive) microglia (Figure 5A–D and I1–N). Similarly, the density of A1 (14-3-3-immunostained) astroglia was found to be significantly higher in spinal cords of old mice compared with adult mice (Figure 5E, F, and O1–Q). Although S100 β -immunoreactivity (for A2 phenotype) only showed a moderate, non-significant, decrease around old MNs, the proportion of astroglia that stained positive for both GFAP and S100 β was significantly reduced in old mice compared with adult animals (Figure 5G–H and R1–T). Overall, these findings indicate that age-associated reactive gliosis implies an imbalance in M1/M2 and A1/A2 phenotypes, leading to a polarization to harmful activated M1 and A1 states.

Early degenerative changes in motor nerves during ageing

Ventral nerve roots, which are only formed by the most proximal part of motor axons, were examined to assess their potential structural alterations over the age process. We found that compared with L4 VRs of adult animals, those of middle-aged mice exhibited significantly higher numbers of myelinated axons (Figure 6A). The average axonal diameter (including the myelin sheath) of middle-aged VRs was significantly greater than that of adult VRs (Figure 6B and C). In addition, there was a significant increase in the proportion of degenerating axons in middle-aged VRs compared with adult VRs (Figure 6D, H, and I). Middle-aged VRs had a high number of axons whose myelin sheath structure exhibited focal disruption and, often, protruded into the axonal compartment to ultimately form myelin spheroidal inclusions (Figure 6E, H, and I); these inclusions, having the appearance of myelin-like multilaminar balls, were only occasionally seen in VRs from adult mice and had a similar morphology to that observed during Wallerian degeneration.⁶³ It was not unusual to see myelin debris engulfed by macrophages in middle-aged

VRs. Interestingly, compared with adults, there was an increase in the proportion of small myelinated axons in middle-aged VRs, but this did not reach statistical significance (Figure 6F). In middle-aged VRs, these small axons were usually seen clustered, contrasting with their homogeneous distribution in adult VRs (Figure 6G, H, and I). Clustered small myelinated axons could represent newly formed, still immature, nerve branches, which originate by sprouting from healthy motor axons. These results suggest that early in the ageing process, some motor axons undergo degeneration, and this is accompanied by the reactive generation of new nerve fibres, in an attempt to replace those previously damaged. *G*-ratio analysis allowed us to assess the relationship between axon diameter and myelin thickness. Axon diameter, by delineating the periphery of axon under the myelin sheath, was found to be significantly longer in middle-aged VRs than in those of adult VRs, suggesting that a certain degree of motor axon swelling occurs during ageing (Figure 6J–N). In addition, the thickness of axon myelin was significantly decreased in middle-aged VRs compared with adult VRs, as indicated by the higher *g*-ratio average values found in axons (*g*-ratios: adult age = 0.57 ± 0.12 and middle age = 0.61 ± 0.01 ; $n = 105–285$ and $100–180$ axons per animal, four and five animals, respectively, $P < 0.05$). As shown in the scatter plot of Figure 6N, motor axons of middle-aged mice that were larger corresponded to those with higher *g*-ratios, indicating a thinner myelin sheath. The ultrastructural appearance of middle-aged motor axons at different stages of degeneration is shown in Figure 6O–Q.

Ageing is accompanied by alterations in dorsal root ganglion sensory neurons

To ascertain whether ageing also affects to sensory neurons, L4 DRGs of adult and old mice were examined. DRG sections were processed for immunocytochemistry with antibodies against CGRP and PV and also stained with IB4 lectin (Supporting Information, Figure S2A–O2). These are specific markers for different DRG neuronal subpopulations: CGRP is present in peptidergic, small and medium-sized sensory nociceptive neurons; IB4 stains nonpeptidergic, small-sized sensory nociceptive neurons; and PV is present in large sensory proprioceptive neurons innervating muscle spindles.^{64–66} Compared with the DRGs of adults, old DRGs showed a higher proportion of CGRP-positive, IB4-positive, and PV-positive neurons (Supporting Information, Figure S2A, F, and K). In DRGs of old mice, all these neuronal populations exhibited a significantly smaller soma size compared with those of adult animals (Supporting Information, Figure S2B, C, G, H, L, and M). These data suggest that ageing promotes significant changes in the expression of CGRP, IB4, and PV in sensory DRG neurons, which are accompanied by a marked atrophy of both proprioceptive and nociceptive neurons.

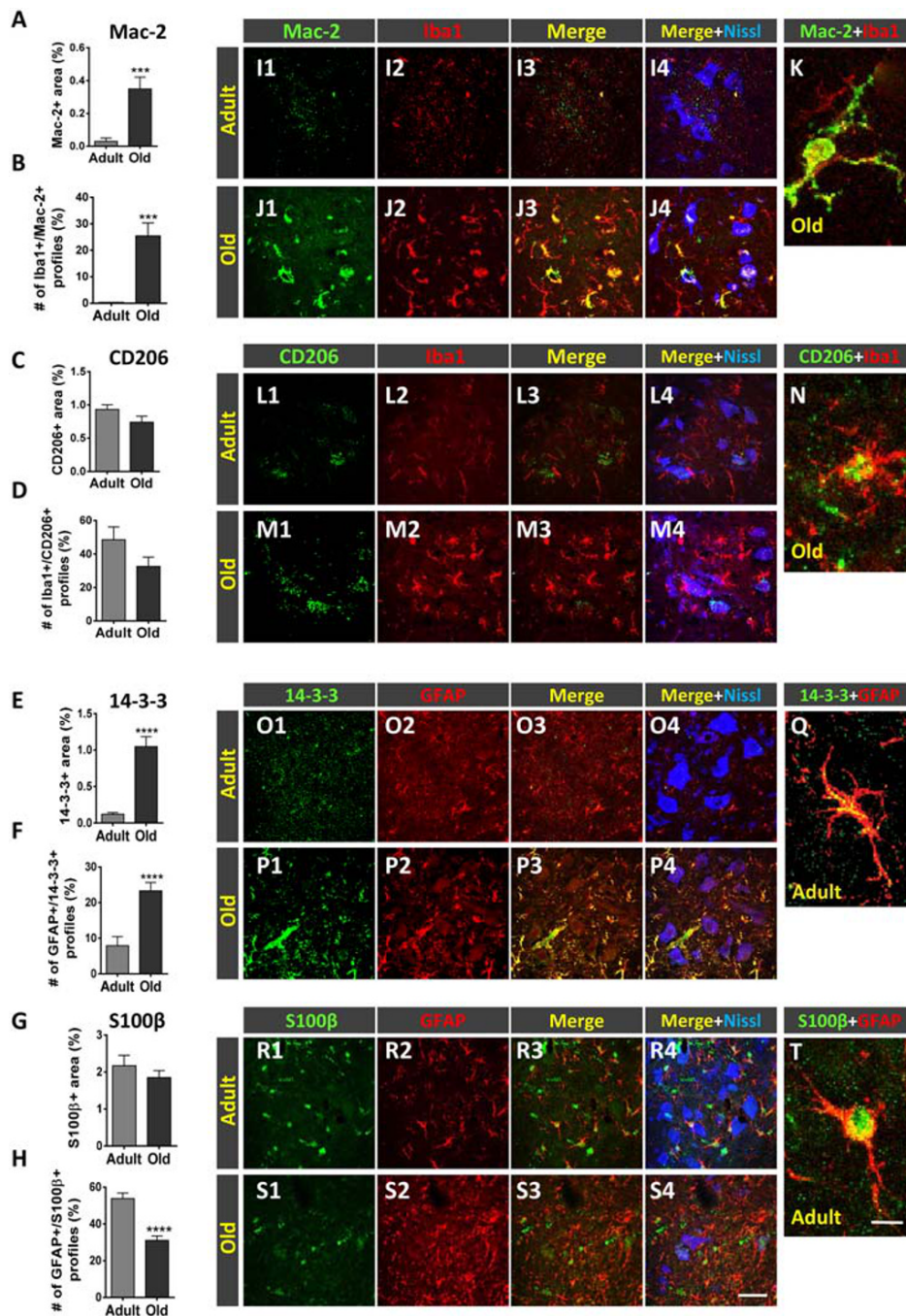


Figure 5 Age-related changes in the phenotype of spinal cord microglia and astroglia. (A–J) Serial sections of lumbar spinal cord of adult and old mice were double immunostained for ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) and either (M1) Mac-2 or (M2) CD206 microglia, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and either (A1) 14-3-3 or (A2) S100β astroglia. Quantification of (A and C) Mac-2-positive and CD206-positive profiles surrounding motoneurons (MNs), based on the ventral horn area occupied by these immunostained profiles; the proportion of microglial profiles expressing both Iba1 and either Mac-2 or CD206 is shown in (B) and (D), respectively. Quantification of (E and G) 14-3-3-positive and S100β-positive profiles surrounding MNs based on the ventral horn area occupied by these immunostained profiles; the proportion of astroglial profiles expressing both GFAP and either 14-3-3 or S100β is shown in (F) and (H), respectively. Representative confocal micrographs used for data analysis showing (I1–K) Mac-2, (L1–N) CD206, (O1–Q) 14-3-3, and (R1–T) S100β (all in green); microglial and astroglial markers were combined with Iba1 and GFAP, respectively (both in red), and fluorescent Nissl staining (blue) for MN visualization. Higher magnification images of Iba1-positive microglial profiles also expressing either (K) Mac-2 or (N) CD206 and GFAP-positive astroglial profiles also expressing either (Q) 14-3-3 or (T) S100β in the ventral horn of adult spinal cords are shown. Data in the graphs are expressed as the mean ± SEM; the spinal cord of four animals per age group was used for analysis; a total of 40–45 sections per age were examined. ****P* < 0.001 and *****P* < 0.0001 vs. adult (Student’s *t*-test). Scale bars: In (S) = 50 μm [valid for (I1–J4), (L1–M4), (O1–P4), and (R1–S4)] and in (T) = 10 μm [valid for (K, N, and Q)].

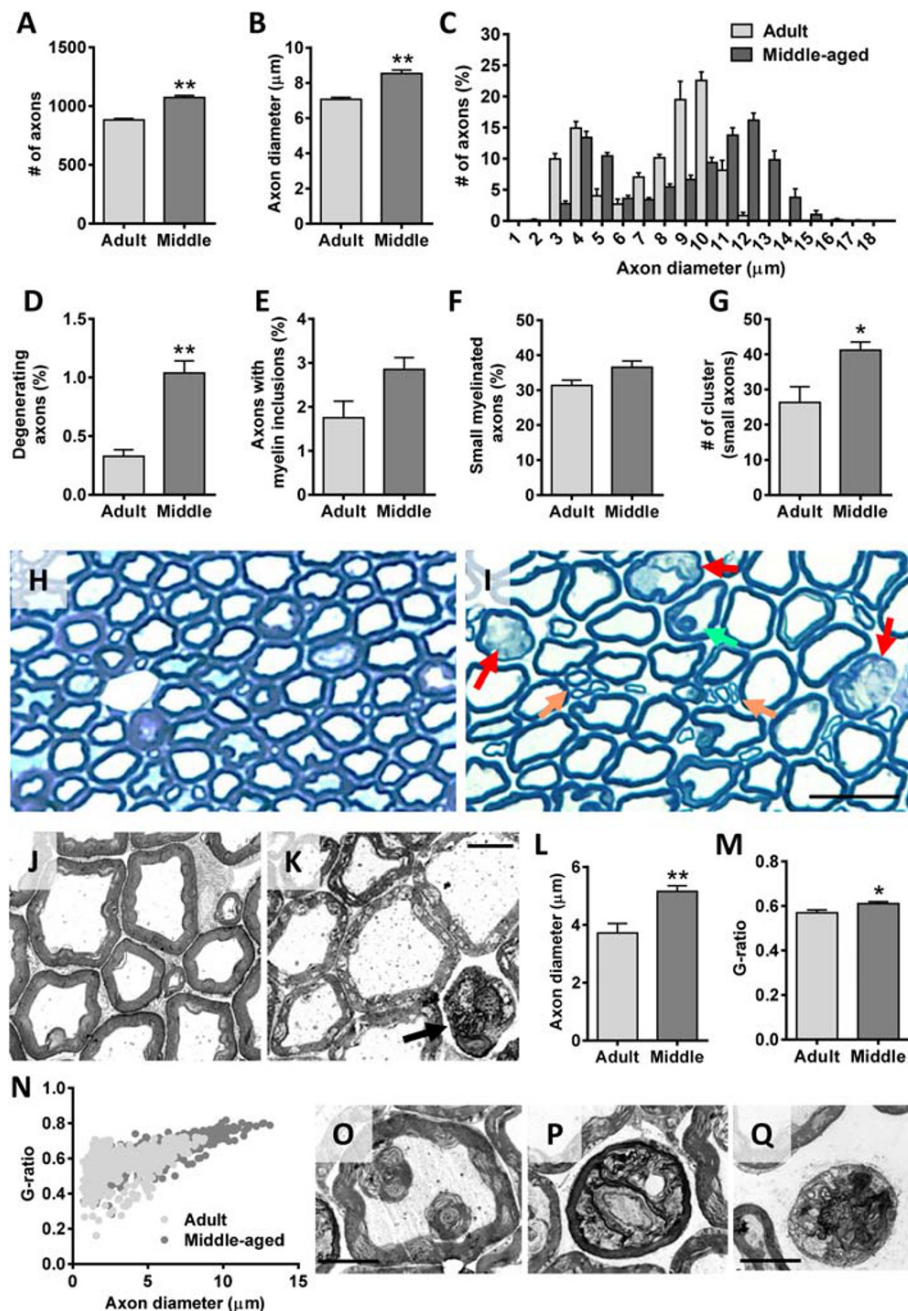


Figure 6 Age-related changes in motor axons of mice. The analysis was performed in L4 ventral roots (VRs) of adult and middle-aged (middle) animals. (A) Number and (B) diameter of VR myelinated axons. (C) Relative frequency of myelinated axon diameter (in μm); note in adult VRs the bimodal profile indicative of axons originating from α -motoneurons (large axons) and γ -motoneurons (small axons). Proportion of axons showing a (D) degenerating appearance, (E) some myelin inclusions, and (F) a small ($\leq 6 \mu\text{m}$) diameter; the number of small axon clusters (≥ 3 axons) in adult and middle-aged VRs are shown in (G). Representative images of methylene blue-stained semithin cross sections of (H) adult and (I) middle-aged VRs used for axon analysis; in (I), arrows indicate degenerating axons (red), a myelin inclusion inside an axon (green), and clusters of small axons (orange). Electron micrographs of (J) adult and (K) middle-aged VRs; note in (K) the distended appearance of some axons and the subtle changes in myelin structure seen in middle-aged motor axons; arrow in (K) points out a degenerating axon. (L) Diameter (in μm) of motor axons, showing a significant increase in axon size of middle-aged animals; the measurements were performed by delineating the axon periphery underneath the myelin sheath. Quantification of myelin thickness by (M) *g*-ratio analysis and (N) scatter plot depicting (N) *g*-ratios in relation to axon diameter in VRs; all the measurements in (L–N) were performed on electron micrographs taken from ultrathin cross sections of VRs at comparable levels. Representative electron micrographs of middle-aged VRs showing in (O) a focal disorganization of myelin sheath resulting in two multilamellar myelin balls located inside a motor axon and in (P) and (Q) motor axons in different stages of degeneration. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. adult; $n = 4$ adult and 5 middle-aged VRs of different animals. Scale bars: In (I) = 25 μm [valid for (H)], (K) = 5 μm [valid for (J)], and (Q) = 5 μm [valid for (O) and (P)].

Structural and molecular changes in neuromuscular junctions of hindlimb muscles during ageing

The morphology and innervation of NMJs in TA, Sol, EDL, and Gra muscles were examined following double immunostaining for NF and synaptic vesicle protein 2 (for visualization of presynaptic nerve terminals) combined with α -Bgtx (for identification of postsynaptic sites). In adult muscles, both presynaptic and postsynaptic elements displayed a well-organized appearance, with smooth and continuous nerve terminals entering in endplates, the latter showing the 'pretzel-like' pattern characteristic of mature, 'healthy' NMJs; postsynaptic membranes exhibited numerous folds where α -Bgtx-labelled AChRs were concentrated. In contrast, NMJs of old muscles displayed structural alterations, which are consistent with previous reports^{11,22,67–69}: whereas some NMJs appeared partially or fully denervated (*Figure 7A* and F1–H2), a high proportion of innervated NMJs had overt signs of polyinnervation (*Figure 7B*, I1, and I2); moreover, many nerve terminals displayed a more complex branching and sprouting (*Figure 7E*, J1, and J2). Motor endplates of old muscles were also altered, showing increased size and fragmented appearance (*Figure 7C* and D). Endplate denervation was frequently associated with many small spots of clustered AChRs scattered along the myofibers (*Figure 7K–N*). These spots concomitantly displayed a faint positive signal for presynaptic markers, indicative of a reactive neoformation of neuromuscular synaptic contacts (*Figure 7O* and P1–P4). We observed some variations in these changes between muscle types studied: in old mice, the proportion of denervated NMJs was much lower in TA muscles than other muscle types (*Figure 7A*); moreover, TA muscles showed more polyinnervated NMJs than Sol and Gra muscles, with no obvious signs of polyinnervation in EDL muscles of old mice (*Figure 7D*).

We and others have previously reported that during NMJ development, motor nerve terminals initially contain high levels of CGRP, which markedly decreases in mature NMJs; nevertheless, CGRP is up-regulated in NMJs during conditions of reinnervation and nerve sprouting.^{47,50,52,70} Consistent with this, levels of CGRP in NMJs was very low in all adult muscles examined compared with their young counterparts (*Figure 8C1–C3* and B1–B3). Conversely, a significant increase in CGRP immunoreactivity was seen in NMJs of old muscles, this augment being particularly prominent in the Gra muscle (*Figure 8A* and F1–G3).

GAP-43 is a protein present in virtually all neurons during axonal growth, being particularly abundant in axonal growth cones (reviewed in Holahan⁷¹). It has been found that in the neuromuscular system, GAP-43 is down-regulated in MNs at the onset of synapse elimination in a process that is regulated by muscle activity.⁷² Consequently, mature MNs and their corresponding nerve terminals exhibit low levels

of GAP-43. In our study, adult muscles showed very low levels of GAP-43 compared with their young counterparts (*Figure 9B1–B3* and C1–C3). The levels of this protein, however, were significantly increased in the NMJs of old muscles (*Figure 9A* and D1–D3).

Agrin is a protein synthesized in the MN cell body and axonally transported to the nerve terminal where once released concentrates at the synaptic basal lamina to play a crucial role in the process of NMJ formation and maintenance.^{73–76} We analysed then whether agrin content in NMJs was altered in old muscles and found that NMJs of young and adult muscles displayed low levels of agrin (*Figure 9F1–F3* and G1–G3). In comparison, NMJs of all muscles examined from old mice, with the exception of Gra, exhibited a significant increase in agrin expression (*Figure 9E* and H1–H3).

We next examined the expression levels of FGFBP1 and TGF- β 1 in muscles of adult and old mice. FGFBP1 is a secreted protein that binds fibroblast growth factor proteins present at the extracellular matrix enhancing its biological activity.⁷⁷ FGFBP1 has been reported to be transcribed in muscle fibres, where it appears to have a role in regenerating injured NMJs.⁷⁸ On the other hand, TGF- β 1 has been shown to regulate FGFBP1 expression in cultured myotubes.⁷⁹ We found that all the examined muscles from young mice expressed both FGFBP1 and TGF- β 1. Although a diffuse and discrete immunofluorescence was seen along the muscle fibres, both proteins were mainly concentrated at the NMJs (not shown). However, the expression levels of FGFBP1 and TGF- β 1 changed with age. Muscles of adult mice exhibited lower content of both proteins compared with that of young animals. Moreover, compared with adult muscles, old muscles displayed an increased expression of FGFBP1 and TGF- β 1, showing a pattern of immunoreactivity mostly restricted to the synaptic region of muscle (*Figure 10A*, B, and C1–F3). Although both proteins were mainly detected within the postsynaptic α -Bgtx-stained area, some immunolabelling was also seen outside of this region, suggesting that FGFBP1 and TGF- β 1 are in part located in the extracellular matrix around the NMJ.

Age-related changes in hindlimb skeletal muscles

Aged-related changes in skeletal muscles have been reported in some murine models at histological and electrophysiological levels^{68,80–84} (Hunter *et al.*⁸⁵ and McKinnon *et al.*,⁸⁶ as reviews). We examined the degree of histopathological alterations in different mouse muscles to assess the extent by which muscular changes could account for the impaired motor performance observed in old animals. Because muscle denervation is typically associated with muscle atrophy, we determined the wet weight, as an indicator of muscle mass, and the cross-sectional area of muscles. Wet weights of adult and old muscles did not exhibit significant differences, although some reductions in the weight of Sol and EDL muscles

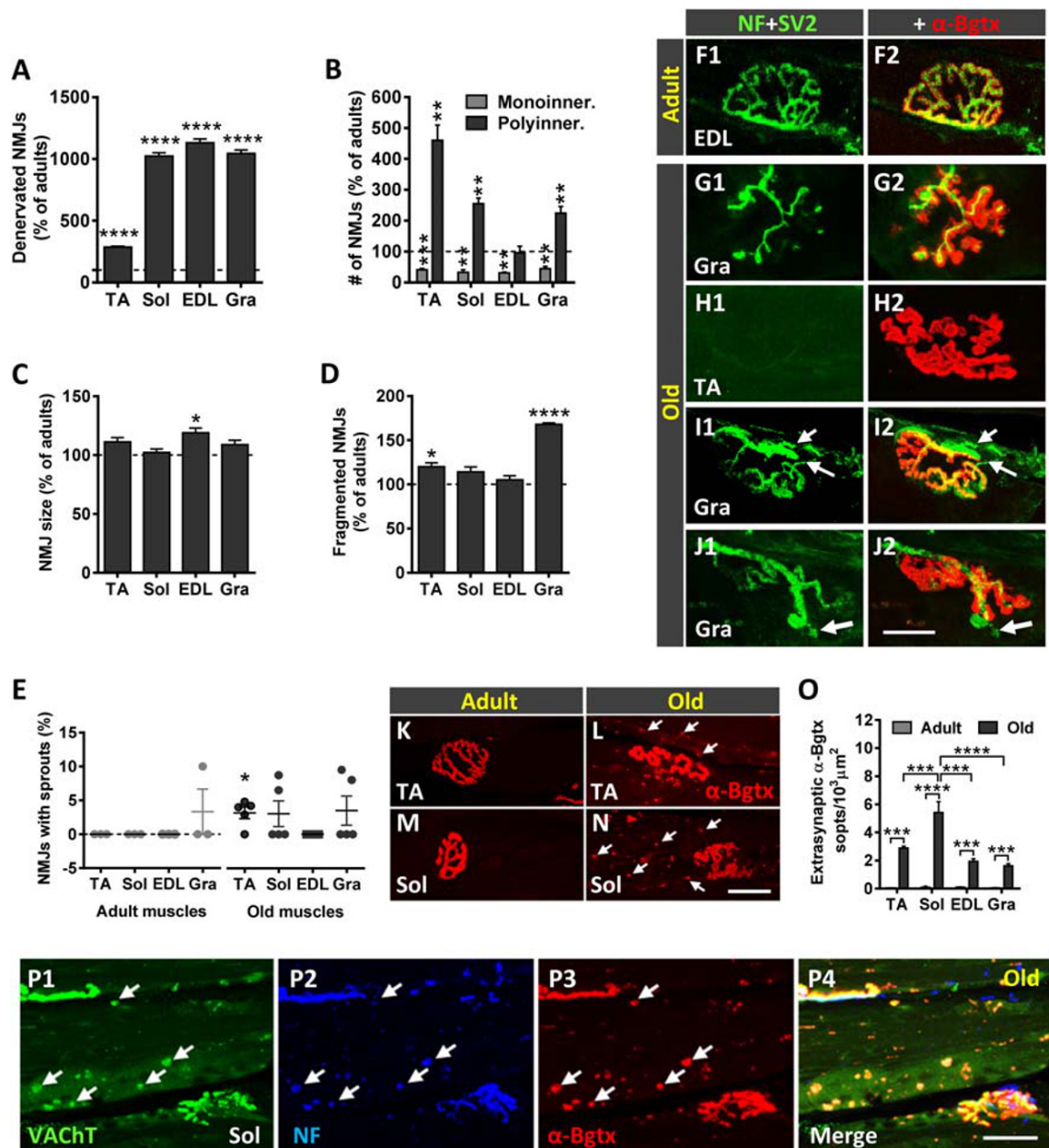


Figure 7 Age-related changes in neuromuscular junctions (NMJs). Proportion of (A) denervated and of (B) monoinnervated and polyinnervated NMJs in muscles of old mice. Changes in (C) NMJ size and (D) number of fragmented endplates in old muscles. All graphs show values as a percentage of change compared with adult muscles; 50–100 NMJs per muscle from four adult and five old mice were analysed. (E) Percentage of NMJs exhibiting terminal axonal sprouts in the muscles of adult and old mice; each point represents the percentage of sprouts found in 25–30 NMJs per muscle from four adult and five old mice. Data in all graphs are expressed as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ vs. adult (one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni's test). Maximal projections of confocal stacks of NMJs from (F1 and F2) adult and (H1–J2) old muscles, as indicated in panels. Muscle sections were stained with antibodies against neurofilament 68 kDa (NF) and synaptic vesicle protein 2 (SV2) (green) for pre-synaptic nerve terminals and α -bungarotoxin (α -Bgtx) (red) for postsynaptic acetylcholine receptor (AChR). Microphotographs in (G1–J2) correspond to representative old NMJs displaying different structural changes: (G1 and G2) partial innervation, (H1 and H2) denervation, (I1 and I2, arrows) polyinnervation, and (J1 and J2, arrow) terminal sprouting, most of these showing signs of endplate fragmentation; compare with the typical appearance of an innervated adult NMJ in (F1 and F2). Representative images of α -Bgtx-stained (red) endplates in the (K and L) tibialis anterior (TA) and (M and N) soleus (Sol) muscles from adult and old mice; arrows in (L and N) point to patches of AChRs scattered along the myofibers. (O) Density (number per 1000 μm^2) of extrasynaptic α -Bgtx-stained (AChR) spots in fibres of old muscles. (P1–P3) Representative images of the Sol muscle double immunolabelled for VACht (green) and NF (blue) and stained with α -Bgtx (red); arrows point to (P3) α -Bgtx-stained AChR spots that exhibit both (P1) VACht and (P2) NF positivity; the merged image for the three channels is shown in (P4). Scale bars: In (J2) = 20 μm [valid for (F1–J1)]; in (N) = 20 μm [valid for (K–M)]; and in (P4) = 30 μm [valid for (P1–P3)]. EDL, extensor digitorum longus; Gra, gracilis.

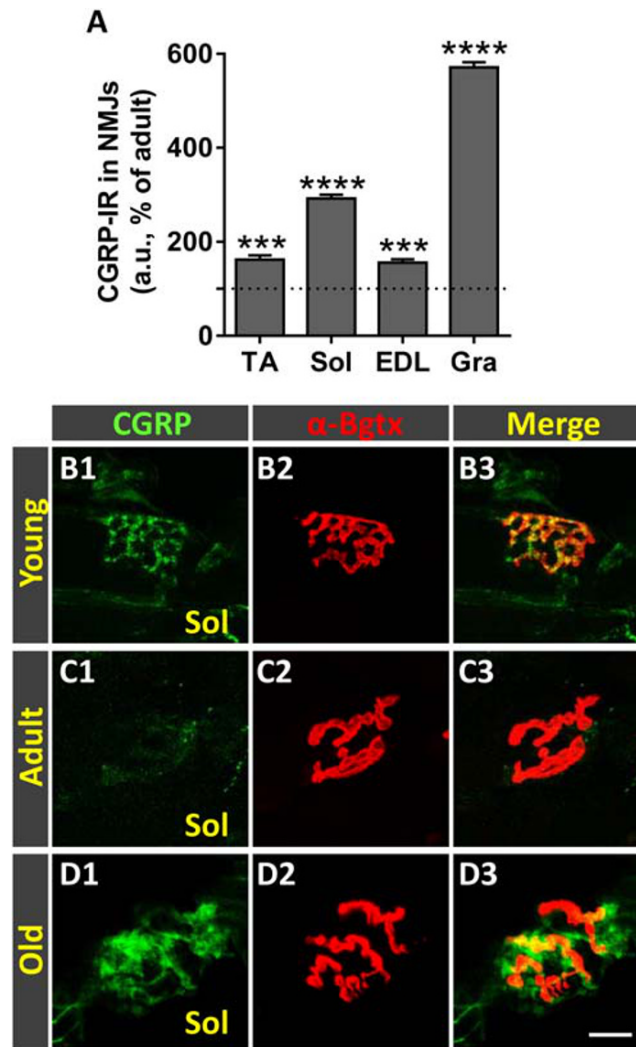


Figure 8 Ageing is accompanied by an increased expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in neuromuscular junctions (NMJs) of hindlimb muscles. (A) Changes in CGRP immunoreactivity (IR) in NMJs of old tibialis anterior (TA), soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL), and gracilis (Gra) muscles expressed as the percentage of increase compared with respective adult muscles. (B1–D3) Representative confocal micrographs of CGRP-immunostained (green) NMJs of Sol muscles from young, adult, and old mice; sections were also stained with α -bungarotoxin (α -Bgtx) (red) for endplate identification. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001 vs. adult (one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni's test); one muscle for each muscle type taken from four adult and five old mice was used for analysis; 80–100 NMJs per muscle type were examined. Scale bar in (D3) = 10 μ m [valid for (B1–D2)].

were seen in old animals compared with adults (muscle weight reduction: \sim 23% Sol and \sim 43% EDL) (Figure 11A). No significant differences were obtained when muscle weights were normalized to body weight (muscle mass/body weight) (Figure 11B). Gra muscles from old mice exhibited even higher (although not significant) normalized weights compared with those from adults. Additionally, compared with adult muscles, old muscles did not exhibit significant changes in cross-sectional areas (Figure 11C). We next analysed the density of myofibers and found a reduction in the Sol and EDL muscles of old animals, with the most prominent decrease observed in the EDL muscle (myofiber density reduction: \sim 24% Sol and \sim 37% EDL). This indicates that a

differential decline in the proportion of myofibers occurs in distinct type of muscles with ageing. The effect of ageing on myofiber size was analysed in muscle cross sections immunolabelled for laminin and showed no significant differences in the average myofiber size between adult and old animals for all the muscles examined (Figure 11E). Nevertheless, compared with adult muscles, increased contents of connective tissue were found in all muscles from old animals, this increase being more marked in the EDL (Figure 11F).

In agreement with previous reports,⁶⁷ all the old hindlimb muscles analysed exhibited high proportions of myofibers showing centrally located nuclei (Figure 11G–O). In young muscles, only a small percentage (0.5–1.5%, depending on

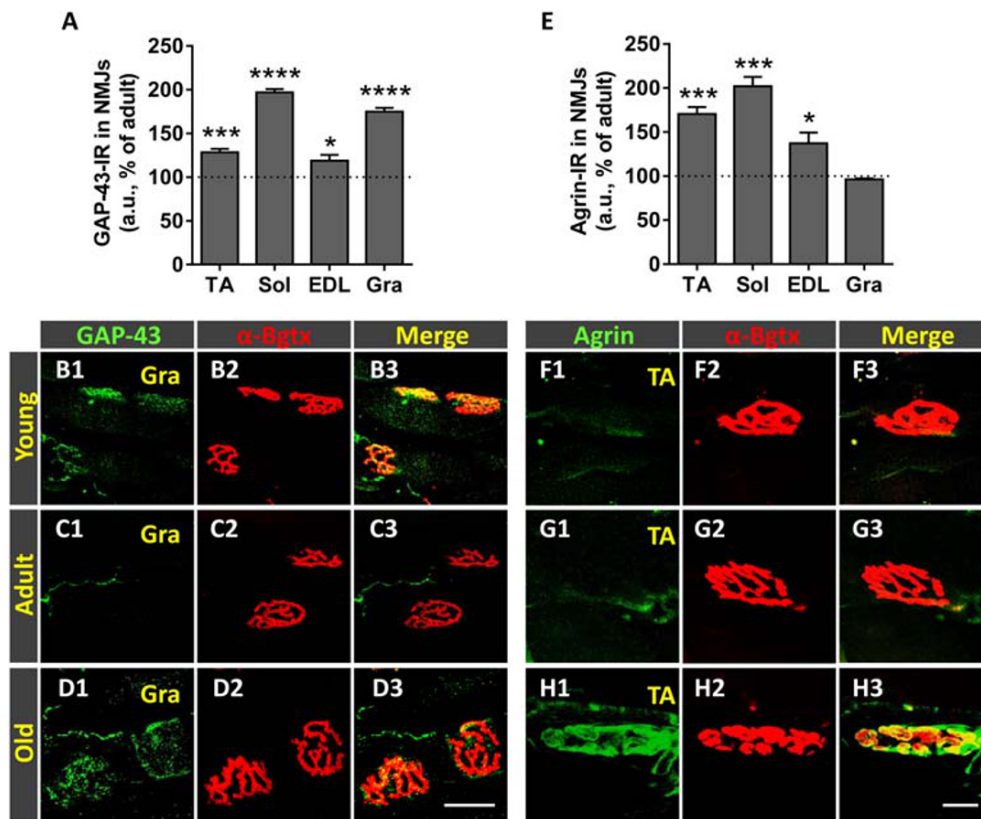


Figure 9 Age-related changes in growth associated protein 43 (GAP-43) and agrin expression in neuromuscular junctions (NMJs) of hindlimb muscles. Changes in (A) GAP-43-immunoreactivity (IR) and (E) agrin-IR (in arbitrary units [a.u.]) in NMJs of old tibialis anterior (TA), soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL), and gracilis (Gra) muscles expressed as the percentage of increase compared with adult respective muscles. Representative confocal images of NMJs of TA and Gra muscles from young, adult, and old mice immunostained for (B1–D3) GAP-43 and (F1–H3) agrin, both in green; muscle sections were also stained with α -bungarotoxin (α -Bgtx) (red) for endplate identification. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$ vs. adult muscles (one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni's test); one muscle for each muscle type taken from four adult and five old mice was used for analysis; 80–100 NMJs per muscle type were examined. Scale bars: In (D3) = 10 μ m [valid for (B1–D2)] and in (H3) = 10 μ m [valid for (F1–H2)].

the muscle) of myofibers displayed central nuclei. These numbers significantly increased in old muscles, this increase being more prominent in the TA and Gra muscles (~12% and 18%, respectively) (Figure 11G). Because the presence of central nuclei in a myofiber can be considered as an indicator of its regeneration following degeneration,^{87,88} these results suggest that over the ageing process, all limb muscles examined undergo, to some extent, fibre degeneration and attempt to regenerate these lost fibres.

Satellite cells (SCs) are muscle-resident stem cells required for sustained muscle regeneration.^{89,90} SCs express paired box protein 7 (Pax7), a transcription factor involved in the proliferation of muscle precursor cells. To analyse age-related changes in SCs, immunocytochemistry for Pax7 was combined with DAPI staining in sections of adult and old mouse muscles. Compared with adult muscles, decreased numbers of Pax7-positive SCs were observed in all examined muscles from old animals, although SC depletion only attained statistical significance in Sol and EDL muscles (Figure 11P–S3).

From studies mainly performed in rats, it has been documented that ageing is associated with changes in the fibre type profile of skeletal muscles. Thus, a transition from fast (type 2) to slow (type 1) fibres, leading to a preponderance of the latter, appears to occur in aged muscles.^{91,92} We analysed the fibre type (1, 2A, and 2B) composition of selected muscles by using different isoform-specific anti-myosin heavy chain (I, IIA, and IIB) antibodies. As previously reported,^{68,93} in adult mice, the Sol muscle was seen to be mainly composed of slower fibres (types 1 and 2A), whereas EDL and TA muscles showed a predominance of fast fibres (type 2B > 2A in EDL and type 2A > 2B in TA); the Gra, which is the more proximal hindlimb muscle, also consisted predominantly of types 2A and 2B fibres (2A > 2B), with a lower proportion of type 1 fibres. These myofiber type profiles exhibited differential changes with ageing. Compared with adult muscles, all old distal hindlimb muscles analysed (TA, EDL, and Sol) displayed a significant reduction in the proportion of type 2B fibres, whereas the amount of type 2A fibres was found significantly

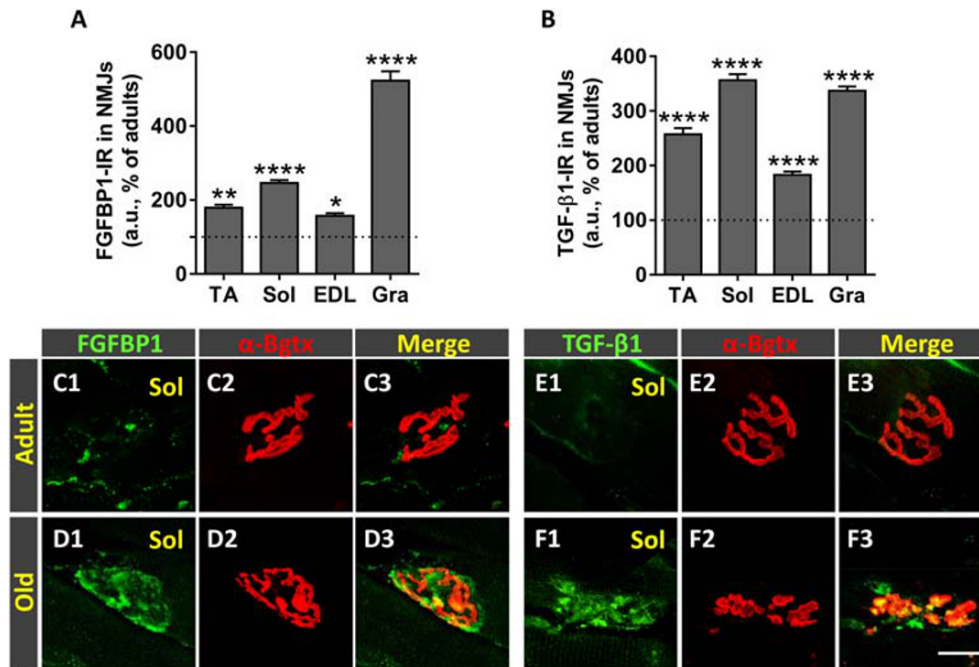


Figure 10 Age-related changes in fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) expression in neuromuscular junctions (NMJs) of hindlimb muscles. Quantification of changes in (A) FGFBP1-immunoreactivity (IR) and (B) TGF-β1-IR (in arbitrary units [a.u.]) in NMJs of tibialis anterior (TA), soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL), and gracilis (Gra) muscles of old mice; changes are expressed as the percentage of immunostaining increase compared with adult NMJs. Representative confocal micrographs of NMJs of Sol muscles from adult and old mice immunostained for (C1–D3) FGFBP1 and (E1–F3) TGF-β1, both in green, as indicated; muscle sections were also stained with α-bungarotoxin (α-Bgtx) (red) for endplate identification. Data in the graphs are expressed as the mean ± SEM, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and *****P* < 0.0001 vs. adult muscles (one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni’s test); one muscle for each muscle type taken from four adult and five old mice was used for analysis; 80–100 NMJs per muscle type were examined. Scale bar in (F3) = 20 μm [valid for (C1–F2)].

decreased in the TA and EDL but dramatically increased in the Sol. Additionally, all these old muscles showed a reduced proportion of type 1 myofibers with respect to adult muscles, but only in the case of the EDL, this decline attained significance (Figure 12A–M). Conversely, compared with adult mice, the Gra muscle of old animals exhibited a prominent increase in the proportion of types 1 and 2B fibres and a reduction in the content of type 2A fibres (Figure 12A–M). These findings contrast with those obtained in previous studies performed in rat skeletal muscles, in which it has been reported that ageing results in a switch from type 2A to type 1 fibres in the slow Sol muscle and from type 2B to type 2X (a type of fibre having a resistance to fatigue intermediate between type 2A and type 2B fibres) in fast muscles.^{94,95}

Lipofuscin, often called ‘age pigment’, consists of polymorphous and non-degradable autophagocytosed material that, coming from different intracellular structures, accumulates in lysosomes. The presence of lipofuscin in a cell is considered the result from an oxidative stress process, in which oxidized compounds, mainly of lipid and protein origin, are resistant to hydrolysis by lysosomal enzymes.^{96,97} Lipofuscin has a broad autofluorescence and, when excited by lights of diverse wavelengths in combination with proper barrier filters, is easy to distinguish from immunolabelled fluorescent

structures.⁹⁸ In our study, in comparison with muscles from adult animals in which no lipofuscin aggregates were seen, all the examined muscles from old mice exhibited prominent lipofuscin accumulation (Figure 12N). This was especially prominent in the Gra muscle, compared with the slow-twitch Sol muscle showing the smallest amount of lipofuscin aggregates. Within the muscle, the proportion of lipofuscin granules varied considerably between myofibers, and some of them appeared completely devoid of this pigment (Figure 12O and P). Interestingly, in all muscles, the largest fibres were those which exhibited the highest levels of lipofuscin accumulation (Figure 12Q). The correlation between fibre type and accumulation of lipofuscin was explored in the old TA muscle. We observed that type 1 fibres exhibited a significantly lower content of the pigment compared with types 2A and 2B fibres (Figure 12R).

Discussion

Despite the notable progresses made in the knowledge of the etiological factors leading to ageing sarcopenia, the precise causative mechanisms are far from fully understood. The intricate interactions between the distinct types of cells and

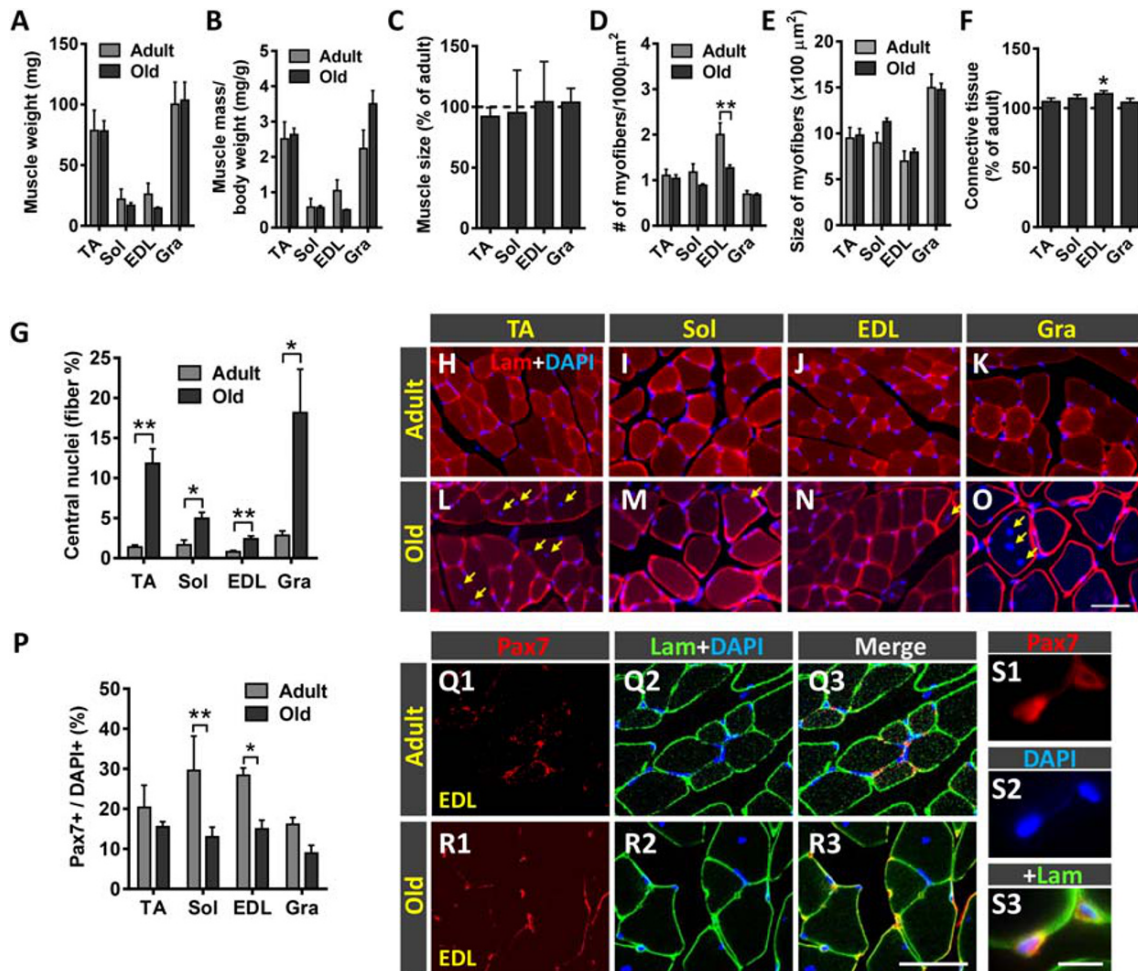


Figure 11 Effect of ageing on the histology of tibialis anterior (TA), soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL), and gracilis (Gra) muscles. (A) Wet weight of muscles (in mg) and (B) weight of muscles relative to body weight (expressed in mg/g). (C) Changes in the total cross-sectional area of old muscles (expressed as the percentage with respect to adult muscles). (D) Density of fibres in muscles (expressed as the number of myofibers in 1000 μm^2 muscle cross-sectional area). (E) Average myofiber size (cross-sectional area in μm^2) of the muscles. (F) Changes in the content of connective tissue in old muscles (expressed as the percentage with respect to adult muscles). (G) Proportion of myofibers exhibiting central nuclei. (H–O) Representative images of transversal muscle sections, double labelled with an antibody against laminin (lam) and 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) for DNA. (P) Percentage of paired box protein 7 (Pax7)-immunostained cells (satellite cells) with respect to DAPI-positive nuclei in adult and old muscles. Representative confocal images of Pax7 immunostaining (red) combined with immunolabelling for laminin (green) and DAPI staining (blue) in (Q1–Q3) adult and (R1–R3 and S1–S3) old EDL muscle sections. A higher magnification view of Pax7 immunostaining in old EDL muscle is shown in (S1–S3). Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. adult; $n = 5$ –6 muscles for muscle type from different animals and age; number of fibres examined per muscle and mouse: (D and E) = 200, (G) = 3,000, and (P) = 100. Scale bar in (O) = 50 μm [valid for (H–N)]; (R3) = 40 μm [valid for (Q1–R2)]; and (S3) = 10 μm [valid for (R1–R2)].

tissues shaping the neuromuscular system are complex and hard to interpret in isolation. Indeed, results reported in the literature are sometimes ambiguous, with strong divergences in results obtained from different ageing models.⁹⁹ Rodents, mainly various rat and mouse strains, have been widely used in studies of sarcopenia. Although it is unlikely that the ageing processes in these animal models are entirely comparable with those in humans, rodents provide an experimental paradigm that allow us to overcome the obvious problems inherent to human long lifespan, environmental and nutrition conditions, and tissue sampling.⁹⁹ However, most of the ageing research

performed in murine models has been restricted to specific constituents of the neuromuscular system, providing a partial view of cellular and molecular alterations leading to sarcopenia. In an attempt to unify and clarify discrepant published data, we conducted a detailed analysis of ageing-related structural and functional alterations in the neuromuscular system of the C57BL/6JRj mouse, a well-established model for sarcopenia. Here, all the main cellular components were simultaneously examined in each individual animal at specific time points. Additionally, changes in some key molecules with well-established roles in the development

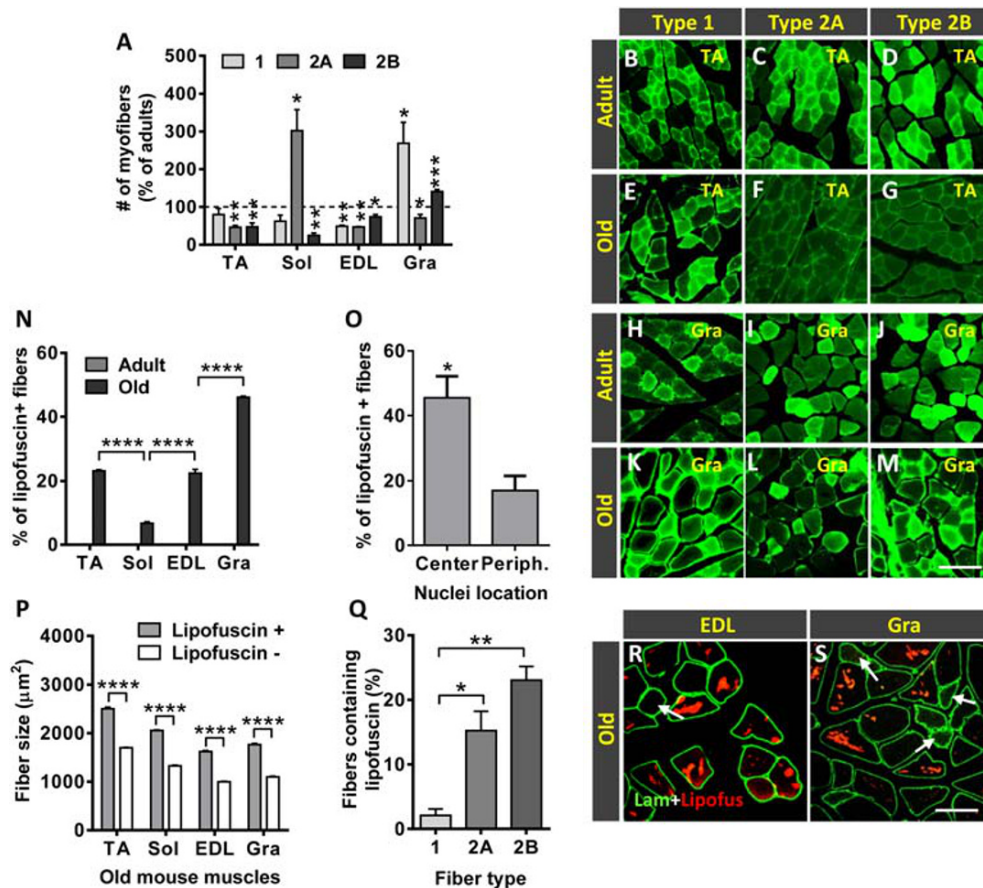


Figure 12 Age-related changes in fibre type composition and lipofuscin accumulation. (A) Changes in myofiber type composition in the old tibialis anterior (TA), soleus (Sol), extensor digitorum longus (EDL), and gracilis (Gra) muscles expressed as the proportion of types 1, 2A, and 2B fibres compared with respective adult muscles (**P* < 0.05 and ***P* < 0.01 vs. respective adult muscles; Student’s *t*-test). Representative images of (B–G) TA and (H–M) Gra muscles from (B–D and H–J) adult and (E–G and K–M) old mice, showing myosin heavy chain I, IIA, and IIB immunostaining to demonstrate types 1, 2A, and 2B myofibers, as indicated. (N) Percentage of fibres containing lipofuscin granules in muscles from adult and old mice. (O) Percentage of old TA muscle fibres with central or peripherally located nuclei containing lipofuscin aggregates. (P) Average size (cross-sectional area in μm^2) of myofibers with or without lipofuscin granules. (Q) Percentage of types 1, 2A, and 2B myofibers containing lipofuscin in the TA muscle of old mice. (R and S) Representative fluorescent images of EDL and Gra muscle sections processed for laminin immunostaining (green); lipofuscin autofluorescence was excited using 510–560 nm excitation and 590 nm emission filters; note that fibres with a small size are devoid of lipofuscin aggregates (arrows). Data in graphs are shown as the mean \pm SEM of fibres analysed from four adult and five old muscles of different animals (number of examined myofibers per muscle: (N and O) = 400–700; (P and Q) = 300–500 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, and *****P* < 0.0001; one-way or two-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni’s test). Scale bars: (M) = 50 μm [valid for (B–L)] and (S) = 100 μm [valid for (R)].

and maintenance of neuromuscular innervation were also examined. A summary of the main results of this study is depicted in *Figure 13*.

We reported that ageing is not accompanied by significant MN death in the lumbar spinal cord of mice. Although the presence of a certain degree of MN degeneration cannot be excluded, our results suggest that MN loss should be considered as a minor event in the context of the neuromuscular changes occurring during ageing. This finding is in contrast with results from previous works in rodents^{9,15–17} and humans,^{14,41} in which significant MN death has been reported with ageing. Our results, however, are consistent with data from studies that have shown the absence of MN

degeneration at advanced ages.^{21,22,100} The disparity in all these results could be ascribed to differences in the animal model species and age of animals included in the studies, segments of the spinal cord analysed, and the procedures utilized for MN counting. Thus, most of the mentioned studies have been performed in different rat strains and, in some cases, without gender segregation. In the present analysis, we only used male mice classified into three age groups, with a strict age delimitation. Moreover, we counted the total number of MNs in serial sections of the entire lumbar spinal cord by using a standard and reliable procedure widely applied in the literature (see Clark and Oppenheim³⁷ and also Calderó *et al.*^{38,101}), which allows an accurate estimation of

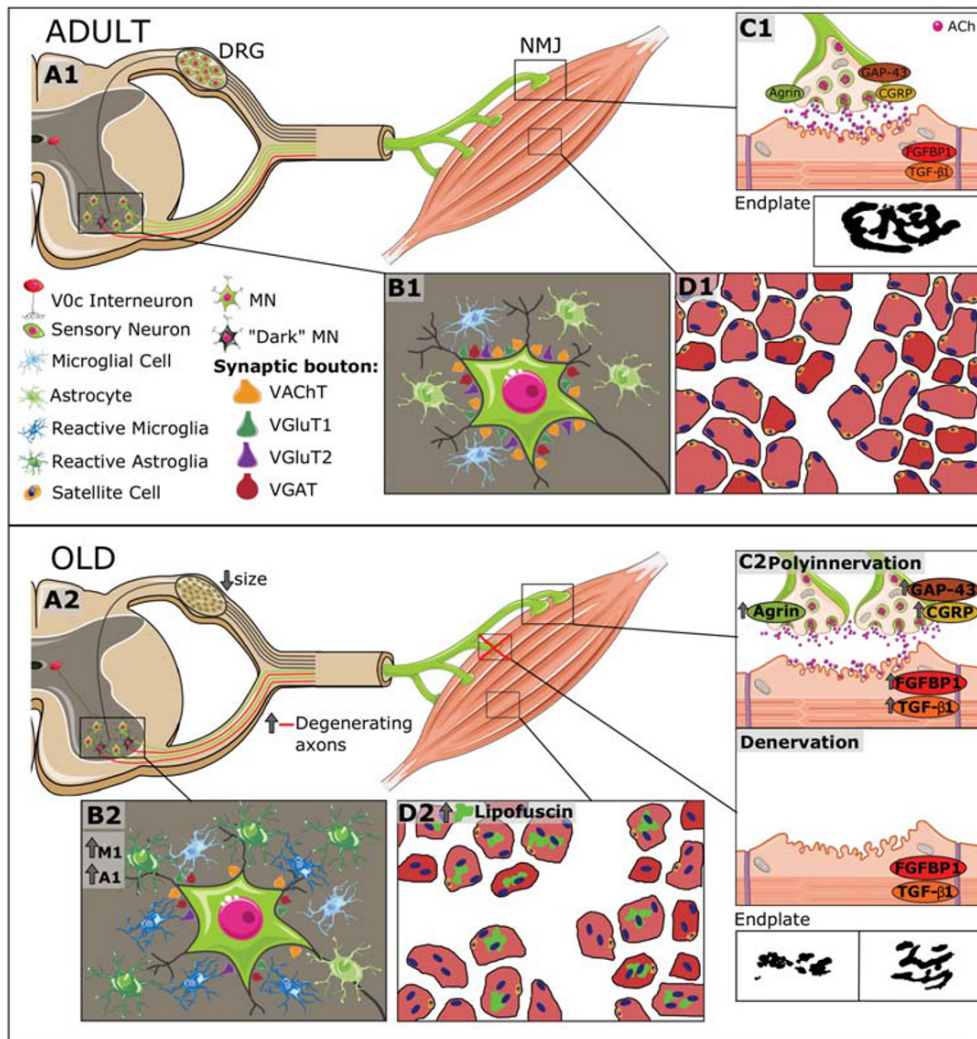


Figure 13 Overview of age-associated changes in the mouse neuromuscular system. (A1–D1) The structural organization of the different components of the system, including spinal cord motoneurons (MNs), neuromuscular junctions (NMJs), skeletal muscles, and dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons, is schematically represented. MNs, located in the ventral horn, project their axons throughout the ventral roots; motor nerve terminals establish synaptic contacts with skeletal muscle fibres (NMJs). (B1) In normal conditions, adult spinal MNs receive abundant synaptic inputs (synaptic boutons), which can be identified by means of vesicular acetylcholine transporter (VACHT) (excitatory cholinergic), vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) and vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2) (excitatory glutamatergic), and vesicular GABA transporter VGAT (inhibitory GABAergic) markers. (A1) Glutamatergic (VGluT1-positive) afferents to MNs come from proprioceptive (parvalbumin-positive) sensory neurons located in the DRG; cholinergic afferents (C-boutons) to MNs come from a small cluster of cholinergic interneurons (V0c), which are located near the central canal of spinal cord. (B1) Spinal MNs are surrounded by abundant microglial and astroglial cells, which are in a resting state. The vast majority of MNs show a 'healthy', lightly haematoxylin and eosin-stained appearance; intermixed with them, some abnormally dark MNs can be occasionally seen in adult spinal cords; these dark MNs could account for the presence of some degenerating motor axons that can be already observed in ventral roots of adult mice. In adult muscles, both presynaptic and postsynaptic elements of NMJs exhibit a well-organized and 'healthy' appearance: smooth nerve terminals enter in endplates displaying a 'pretzel-like' pattern; (C1) adult NMJs exhibited low levels of agrin, growth associated protein 43 (GAP-43), calcitonin gene-related peptide (CGRP), fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1), and transforming growth factor-β1 (TGFβ1). (D1) Diagram of adult myofibers surrounded by connective tissue as can be seen in a transverse muscle section. (A2–D2) In the course of ageing, there is (i) an increase in the number of dark MNs; (ii) a reactive gliosis in ventral horn with a raise in the proportion of harmful M1 microglia and A1 astroglia; (iii) a marked loss of excitatory (cholinergic and glutamatergic) synaptic afferents and reduction in the size of GABAergic synaptic boutons on MNs; (iv) an increase in the proportion of degenerated motor axons and the existence of signs of nerve sprouting and regeneration; and (A2 and B2) (v) an atrophy of sensory proprioceptive and nociceptive DRG neurons and increased expression of their markers. (C2) Muscles of old mice exhibit signs of either polyinnervation or denervation and fragmentation of endplates; these changes are accompanied by the increased expression of agrin, GAP-43, CGRP, FGFBP1, and TGF-β1, suggesting an active process of NMJ remodelling and muscle reinnervation. Moreover, old muscles show numerous fibres with lipofuscin accumulation and centrally positioned nuclei, indicative of muscle regeneration, and fibrotic tissue deposition between fibres; (D2) the proportion of satellite cells were also markedly reduced in old muscles.

neurons that die. This systematic approach is not often employed in other studies. Although we did not find a significant reduction in the total number of MNs in old mice compared with that in adult animals, we noticed a modest decrease in the number of MNs located in the anterolateral column, without changes in the anteromedial and intermediate columns. Because MNs from the anterolateral column innervate distal hindlimb muscles, this finding is consistent with the more prominent age-related involutive changes occurring in these muscles.

Additionally, it is important to note the presence of MNs with an altered histological appearance (dark MNs) scattered across the lumbar spinal cord, particularly in the intermediate column. Dark neurons have been described in healthy and pathological brains of different animal models,¹⁰² but it remains unclear whether they are the result from a pathological change or merely represent an artefact. In this regard, an inappropriate tissue specimen fixation, particularly the time intervals between collecting samples and fixation, appears to provoke an increase in the proportion of dark cells in the nervous tissue.¹⁰³ Although we cannot completely exclude that dark MNs are a consequence of tissue fixation defect, this possibility appears unlikely because all our animals were intracardially perfused and the spinal cords were rapidly removed and subsequently postfixed. The fact that dark MNs might reflect damaged cells is supported by the presence of this type of neurons in the brain cortex and hippocampus following traumatic brain injury or focal cerebral ischemia.^{104,105} Nevertheless, the fate of dark neurons is not still clear. Although it has been generally assumed that dark neurons are 'sick' cells prone to die and would be subsequently eliminated, it is presently proposed that a number of them undergo reactive mechanisms for cell death prevention. Whether or not surviving neurons can conduct their appropriate functions remains to be elucidated.^{102,104} In our analysis, the proportion of dark MNs, although increased with age, did not significantly change in old animals compared with adult mice. Even considering that a certain number of dark MNs undergo degeneration, only a minor proportion of them would finally die. Indeed, we found that the number of 'healthy', lighter stained, MNs did not exhibit a significant decline in the course of ageing. On the other hand, we noticed no significant reduction in the proportion of MMP-9 MNs in spinal cord of old animals, suggesting that vulnerable fast MNs do not necessarily die during the ageing process.

The presence of dark, presumably sick, MNs in the spinal cord of adult mice fits well with the pattern of changes we observed in VRs. Previous work performed in young (2–4 months) and old (22–25 months) mice has shown that in the latter, VR motor axons displayed alterations in diameter ratios and myelin, indicative of age-associated axonal degeneration⁸²; in this study, however, no significant decline in the number of motor axons has been found with ageing. Here, we noticed that although in a low proportion, some motor

axons located in VRs of adult animals displayed signs of degeneration and myelin inclusions. These alterations markedly increased in VRs of middle-aged mice, in which numerous myelin spheroidal inclusions and Wallerian-like degenerative changes are often seen. Interestingly, middle-aged (14 months) VRs exhibited increased numbers of clusters of small myelinated axons, which likely are new nerve sprouts originated from healthy axons. Overall these findings suggest that sustained cycles of degeneration/regeneration and sprouting from healthy axons occur, to greater or lesser degrees, throughout the lifespan. We assume that these degeneration/regeneration cycles are exacerbated in older mice, in an attempt to compensate for the loss of motor terminal branches and synaptic sites in muscle.

Although MN death does not appear to be a relevant pathological process over the course of ageing, we cannot rule out the possibility that MNs with a normal histological appearance may have impaired function. In fact, we provide here strong evidence that MNs of old animals suffer a prominent loss of excitatory cholinergic and glutamatergic inputs, which is in agreement with recent reports.^{100,106} Although we noticed no age-associated changes in the density of inhibitory GABAergic synapses, their size on old MNs was found significantly reduced. MN deafferentation has also been widely reported by us and others in murine models of MN diseases, such as spinal muscular atrophy (SMA)^{107–111} and amyotrophic lateral sclerosis (ALS),^{109,112–115} and also following nerve injury.^{116,117} Data from studies performed in these paradigms support the idea that the loss of synaptic inputs is a process that precedes MN degeneration and that a significant degree of deafferentation is not necessarily associated to MN death.¹⁰⁷ This assumption is in agreement with the absence of MN loss we found in the present work. It is reasonable to assume that alterations in central synapses may negatively impact on MN integrity and function. It is well known that MN excitability is finely regulated by afferent synaptic inputs, which mediate the generation of co-ordinated firing patterns leading to muscle contractions.¹¹⁸ Because the accurate control of MN excitability is critical for a proper motor behaviour, it is obvious that the latter can be markedly impaired by MN deafferentation. Thus, overall, our results indicate that MN dysfunction, rather than cell death, could explain the changes in motor skills and in electromyography recordings seen in our study.

An interesting finding in the present study is the prominent microgliosis and astrogliosis found around aged MNs. This result indicates that ageing is accompanied by a neuroinflammatory response in spinal cord ventral horn, as it has been documented in different brain regions in healthy elderly (reviewed in previous studies^{119–121}). Ageing-related chronic reactive gliosis has been associated to an increased vulnerability of aged brain to neurodegenerative diseases. Indeed, neuroinflammation has been reported to occur in a number of neurodegenerative processes, including the MN

disorders ALS and SMA.^{56,107,108,110,122–124} The role of neuroinflammation in chronic neurodegeneration, and particularly in MN diseases, has still to be clarified. It is now accepted that glial reaction in these pathologies may have either detrimental (cytotoxic) or beneficial (neuroprotective) effects on MNs.¹²⁴ In this regard, depending on the type of stressor triggering the gliosis process, both microglia and astroglia can achieve M1 and A1 (pro-inflammatory) or M2 and A2 (anti-inflammatory) reactive functional phenotypes, respectively.^{53,58} Moreover, M1 and A1 reactive cells can turn into M2 and A2 phenotypes, respectively, and vice versa, according to the environment in which they are activated. In fact, M1–A1 and M2–A2 phenotypes represent the extremes of a continuum range of distinct reactive states. The dynamic and bidirectional transformation of M1/M2 and A1/A2 phenotypes seems to play a critical role in neurodegeneration, in which neuronal damage has been related to a sustained activation of M1 and A1 cells resulting in an imbalance between the two microglial (M1/M2) and astroglial (A1/A2) subpopulations. Additionally, activated M1 microglia can induce neurotoxic A1 astrocytes, which have been found to be abundant in diverse human neurodegenerative diseases,⁶¹ indicating a cross-talk between microglia and astrocytes in neuroinflammation. We show here that gliosis in the aged spinal cord is accompanied by a prominent increase in harmful M1 microglia and A1 astroglia, with a reduction in the proportion of neuroprotective M2 and A2 phenotypes. A recent study has reported that the depletion of microglia is able to prevent or reverse the loss of muscle innervation in aged mice¹²⁵; this finding suggests an important pathogenic role of neurotoxic microglia in the age-related neuromuscular decline, although the mechanism by which microglia exert their detrimental actions in ageing is not known. It has been shown that both microglia and astrocytes are involved in synapse elimination during neurodegeneration.¹²⁶ A similar function has been ascribed to astrocytes in actively eliminating defective synapses.¹²⁷ The correlation between gliosis and MN deafferentation, found here in the old spinal cord, suggests a possible function of glial cells in the synapse elimination during ageing, as it has also been reported for ALS and peripheral nerve injury.^{57,126} However, to our knowledge, no published data exist on whether neuroinflammatory glial cells actually eliminate synapses on diseased MNs. In a recent study using a model of sciatic nerve axotomy, we found no evidence of synaptic bouton enwrapping and phagocytosis by microglia but noticed that microglial processes, recruited by lesioned MNs, are in close contact with degenerating afferent synaptic terminals, suggesting an active role of microglia in the disintegration of adjacent presynaptic terminals on MNs.⁵⁷ It has been reported that activated microglia can produce molecules (i.e. nitric oxide, oxygen radicals, proteases, and cytokines), which can induce neuronal damage and/or the extracellular digestion of synaptic debris.¹²⁸ A question that needs to be answered is whether glial activation in aged

spinal cord is a primary event leading to the loss of normal functional synaptic inputs to MNs with a subsequent neuronal damage or, conversely, is a secondary response to an altered synaptic function,¹²⁹ as appears to occur in damaged MNs after peripheral nerve transection.⁵⁷

In this context, we found that ageing-related spinal cord central synapse loss is accompanied by changes in DRG sensory neurons. We noticed that with ageing, nociceptive (CGRP-positive and IB4-positive) and proprioceptive (PV-positive) DRG neurons exhibited significant changes in their numbers and expression levels of their markers and atrophy of cell soma. Sensory neurons showed increased expression of CGRP and PV and higher staining with IB4. The increased proportion of DRG PV-positive neurons differs from previous data by Vaughan *et al.*¹³⁰ showing no significant changes in the numbers of DRG PV-positive neurons between middle-aged (11- to 13-month-old) and old (15- to 21-month-old) mice. Differences between both studies could be related to mouse strains used because genetically modified mice were utilized in Vaughan's work. In our study, however, neuron atrophy in old DRGs was particularly evident in proprioceptive large, PV-positive neurons, which are the source of the major synaptic inputs (Ia VGLUT1 afferents) to MNs. Ia afferents establish selective excitatory monosynaptic connections with spinal MNs that, in turn, project their axons to the same or related (homonymous or synergistic, respectively) muscles from which they receive sensory feedback.¹³¹ This circuitry, which is essential for motor coordination and posture, appeared to be impaired in old animals, as inferred from progressive age-related alterations in mobility observed in open field analysis. On the other hand, changes in the proportion of DRG neurons expressing CGRP and in the levels of this neuropeptide have been reported to occur in various inflammatory pain models.^{132–135} Therefore, the increased numbers of DRG neurons expressing CGRP found in our study are in concordance with the state of general, low-grade, chronic inflammation that appears to be linked to elderly, which has been considered an etiological factor of ageing sarcopenia. In this regard, a systemic increase in pro-inflammatory mediators coming from different sources has been reported to occur in advanced ages.²

Nerve conduction studies allow the functional quantitative assessment of large myelinated fibres. Thus, the amplitude of the evoked action potentials is an index of the number of conducting nerve fibres and the peripheral innervation, whereas the nerve conduction velocity is related to axonal calibre and myelination.¹³⁶ The nerve conduction tests performed indicate that the conduction of impulses is reduced in advanced age, which is in agreement with previous reports in laboratory animals^{137–139} and in humans.^{140–142} In this regard, a previous longitudinal evaluation in mice has shown that motor and sensory nerve conduction velocity increased during young adult life, and then remained unchanged until the last third of the lifespan, when it tended to decline.¹³⁹

Additionally, age-associated reduction in the amplitude of motor and sensory nerve action potentials has also been reported in animals^{138,139} and humans.^{140,141,143} Our present results also indicate that the amplitude of CMAPs and CNAPs tend to decrease with ageing, particularly in distal targets, such as foot muscles and toe nerves. In fact, a slow loss of myelinated fibres in peripheral nerves with ageing has been demonstrated in several animal species.^{140,144–146} Indeed, in a detailed morphometrical study in mice, we have found that after 20 months of age, the sciatic nerve showed a noticeable loss of both unmyelinated and myelinated axons, accompanied by a decrease in axonal size and myelin thickness.¹⁴⁶ The effect of sustained pressure on the paws over life has been attributed as one of the determining factors for the particular functional loss of plantar muscles compared with more proximal and tail muscles,¹⁴⁵ as we have observed here in old mice.

MUNE analysis reflects well the potential loss of MNs with ageing.¹⁴⁷ The reduction in MUNE found here in old mouse muscles was only mild and is in agreement with the absence of significant MN degeneration. Following loss of an MN, motor axons are able to sprout collateral branches within the own muscle and thus increase the size of the corresponding motor unit,¹⁴⁸ allowing an efficient compensatory mechanism for maintaining muscle force. However, with advanced ageing, the capability for collateral sprouting¹⁴⁹ and maintenance of size after expansion of the motor unit¹⁵⁰ is defective. In addition, alterations of NMJ function as a consequence of alterations in fast-twitch, fast-fatigable motor units have been described in aged rodents,¹⁵¹ which cause a decrease in the mean size of remaining motor units, as we found here.

Whether NMJs are stable over the lifespan and if they change their morphology with ageing are debatable. Some early studies in rabbits and cats have shown that a certain degree of nerve sprouting and a continuous turnover of NMJs occur in normal muscles.¹⁵² However, more recent data in mice and humans support the idea that NMJs are generally stable for most of the lifespan.^{28,153} In agreement with previous published reports,^{67–69,82,154} we found, in old muscles, a significant amount of NMJs exhibiting conspicuous plastic changes, including partial or complete denervation, polyinnervation, increased nerve terminal branching complexity, and sprouting. Moreover, overt signs of endplate fragmentation and ectopically innervated AChR clusters throughout the myofiber were seen in old muscles. Overall, these observations fit with the hypothesis that ageing entails a continuous process of muscle denervation/reinnervation (reviewed in Larsson *et al.*⁶). In this regard, we noticed that aged muscles displayed a significant increase in some molecules having specific roles in development, maturation, plasticity, and stability of NMJs. These molecules include CGRP, GAP-43, agrin, FGFBP1, and TGF- β 1. CGRP, GAP-43, and agrin are developmentally regulated proteins, which are synthesized in MN cell bodies and axonally transported to

nerve terminals, where they are released and exert their function. Whereas GAP-43 is highly expressed in the growth cones of motor axons and are involved in developmental axonal outgrowth,⁷¹ agrin plays a crucial role in the initiation of NMJ formation by clustering AChRs and, also, in the preservation and regeneration of the adult NMJ.^{74,75} On the other hand, in the neuromuscular system, CGRP has been proposed to act as a communication molecule between MNs and skeletal muscles and is involved in the development and maintenance of NMJs and muscle cells^{155,156}; motoneuronal CGRP is up-regulated following nerve injury, but its raised levels decline with the morphological and functional recovery of motor innervation, suggesting a function of the neuropeptide in axonal growth and NMJ plasticity.^{49,50,157,158} On the whole, these three molecules were found in low levels in muscles of adult mice compared with young animals but were clearly up-regulated in motor nerve terminals of old muscles. This finding suggests an active role for these proteins in the regulation of the compensatory nerve terminal sprouting and reinnervation of denervated muscles in ageing.

The FGFBP1 has been found to be up-regulated in skeletal muscles of a mouse model for SMA.¹⁵⁹ More recently, it has been described that NMJs of normal adult muscles express and concentrate FGFBP1, but its levels decrease when NMJs undergo pathophysiological changes as occurred in the SOD1^{G93A} mouse model for ALS.⁷⁹ Compared with the relative high intensity of immunostaining for FGFBP1 observed in NMJs of young muscles (not shown), we found that FGFBP1-immunolabelling markedly declined in adult NMJs but increased again in old NMJs, particularly in those of the Gra muscle. The increased content of FGFBP1 in old muscles is in concordance with its proposed function in promoting NMJ repair⁷⁸ and suggests a role of this protein in the process of age-related NMJ remodelling and muscle reinnervation. The elevated levels of FGFBP1 noticed by immunocytochemistry in old muscles contrast with the findings by Valdez's group,⁷⁹ which have reported a significant reduction in FGFBP1 transcripts in the TA muscle of 24-month-old mice. This divergence could be explained by the differences in methodology and animals used in this latter study,⁷⁹ in which the FGFBP1 expression levels have been examined by quantitative PCR in aged wild-type heterozygous (FCFBP1^{+/-}) animals of homozygous (FCFBP1^{-/-}) FGFBP1 knockouts. Nevertheless, in agreement with data from this same study, we found higher contents of TGF- β 1 in muscles of young and old animals than in those of adult mice. Our findings showing increased levels of both TGF- β 1 and FGFBP1 in old muscles *in vivo* are difficult to reconcile with the suggested role of TGF- β 1 in inhibiting FGFBP1 expression found in cultured myotubes.⁷⁹ However, the increased levels of TGF- β 1 could explain some changes found in muscles of old mice. Alterations in the expression of TGF- β 1 and its signalling pathways have been associated with inherited and acquired myopathies (reviewed in Burks and Cohn¹⁶⁰). In this regard,

an increase in circulating TGF- β 1 levels has been found to be associated with sarcopenia. TGF- β 1 is considered a potent regulator of tissue wound healing and fibrosis in the skeletal muscle¹⁶¹ and appears to play an important role in promoting the transformation of myoblasts in myofibroblastic cells. Myofibroblasts have been involved in tissue fibrosis and could be responsible for the increased proportions of connective tissue we found in old muscles. It has been proposed that elevated systemic or local levels of TGF- β 1 and skeletal muscle fibrosis could interfere with the activation and proliferation of SCs with the subsequent impairment of myofiber regeneration and muscle remodelling in sarcopenia.^{160,162} In this regard, it should be expected that the reduction in the proportion of SCs we found in old muscles negatively affects the regenerative capacity of muscles and exacerbates muscle fibrosis.^{163,164} Connective tissue deposition was found in all muscles from old mice, although it was particularly conspicuous in the EDL and Sol. Although the fibrotic tissue deposition would contribute to worsen the impaired muscle function in ageing, fibrosis could explain the absence of significant age-related changes in the muscle weight we observed in EDL and Sol muscles despite myofiber loss.

Interestingly, compared with adult mice, no statistically significant differences in muscle mass were found in old muscles, although in the latter, some decrease in the average weight was observed in Sol and EDL muscles. Overall, these findings suggest that ageing has only a minor impact on muscle mass of mice, a result which contrasts with reported data from human studies but is in agreement with previous analysis conducted in ageing rats and mice: in these models, only moderate or very small decreases in muscle mass have been observed compared with humans (reviewed by Ballak *et al.*⁹⁹). Moreover, the fact that Sol and EDL muscles, two distal hindlimb muscles with different fibre type composition, have a greater tendency for age-related mass reduction than the distal TA or the proximal Gra muscles corroborates the hypothesis that different muscles are impacted by varying degrees over the ageing process. This may suggest that muscle wasting in advanced ages could be more linked to both muscle location and specific function than to fibre type composition. In fact, others have reported differences in age-related muscle mass loss between mouse hindlimb (Sol and EDL) and the cervical (sternomastoid and cleidomastoid) muscles, with no changes in the latter.¹⁶⁵ In addition, it has been shown in rats¹⁶⁶ and also in humans¹⁶⁷ that hindlimb (leg) muscles are more severely affected than forelimb (arm) muscles. Our results indicate that even muscles in proximity of each other, such as TA and EDL, also display differential age-related histological alterations, with a significant decrease in fibre density in the EDL muscle and no overt changes in the TA muscle of old animals. These observations are somehow surprising because EDL and TA muscles have a similar fibre type composition and belong to the same functional group, and, consequently, we should expect

comparable age-associated alterations in both muscles. These observations point to the fact that the specific function and the degree of activity of muscles could be main determinants of muscle wasting severity in elderly.

All the old muscles examined in our study displayed fibres having central nuclei, with much higher proportions of them in TA and Gra muscles. The existence of increased amounts of fibres with centrally located nuclei has been associated to different muscle disorders and repair.⁸⁸ In the case of muscle repair, the fusion of activated SCs with the damaged myofiber causes the incorporation of new nuclei, which move first to the centre of the myofiber before moving out to its periphery. Therefore, the presence of centrally positioned nuclei has been considered as an indicator of myofiber regeneration. In this regard, the finding of elevated numbers of fibres with central nuclei in old muscles might reflect a process of continual myofiber regeneration in response to a persistent muscular impairment occurring with ageing. Changes in the NMJs leading to denervation/reinnervation could be one of the main drivers of fibre degeneration/regeneration cycles in aged muscles. However, an intrinsic alteration in myofibers as a cause of muscle dysfunction in elderly cannot be excluded. Thus, nuclear misposition should be considered not only a sign of muscle pathology but also a cause of it.⁸⁸ In any case, the finding of myofibers with centrally positioned nuclei in all the old muscles, but at different proportions, suggests that myofiber regeneration in ageing is a general feature shared by distinct types of hindlimb muscles, although they exhibited a highly variable degree of repair. Interestingly, muscles with the lowest numbers of myofibers with central nuclei (EDL and Sol) also appeared to display the lowest capacity of myofiber regeneration: both these muscles from old animals, predominantly the EDL, exhibited a reduction in the density of myofibers, indicating that regeneration cannot fully counteract myofiber loss. In fact, we failed to detect any decline in the fibre density in the old TA and Gra muscles, which have the highest number of fibres displaying central nuclei.

Studies performed in rat models have reported that age-related changes in muscle innervation results in a decreased proportion of type 2 myofibers, and particularly of those having a glycolytic metabolism (type 2B)^{94,95} (see also McKinnon *et al.* and Schiaffino and Reggiani^{86,92} as reviews). Type 2 myofibers are innervated by fast, MMP-9-positive, vulnerable MNs.^{43,45} The age-related decrease in the proportion of type 2 myofibers appears to be compensated by the increased numbers of type 1 myofibers,^{94,95} which, innervated by slow MNs, have an oxidative metabolism and are more resistant to degeneration. In fact, several analyses conducted in models of MN diseases have reported that MNs and synapses innervating type 2B myofibers degenerate earlier than those innervating types 2A and 1 myofibers.^{168,169} These results have been correlated with differences in the degree of plasticity of synapses: synapses exhibiting a low sprouting competence are the most vulnerable, whereas those which react with a

robust sprouting are selectively resistant.¹⁶⁸ Thus, it has been proposed that fibre type 2 to 1 transition in ageing is the consequence of a preferential loss of fast, vulnerable, MNs with the resulting denervation of 2B fibres and their subsequent innervation by slow, resistant, MNs with high sprouting capacity. In fact, myofiber type 2 to type 1 switching has been reported to occur in models of MN diseases, such as SMA mice.^{39,170} Because skeletal muscles with a higher content of type 1 fibres are more resistant to wasting than those with a predominance of type 2 fibres,^{92,171} it has been proposed that fibre type 2 to type 1 transition in these diseases could result from the activation of metabolic oxidative myogenic compensatory programme aimed at limiting muscle dysfunction. Our results indicate that a similar mechanism does not likely operate in muscles of C57BL/6J mice with ageing. In divergence with data from ageing rat studies, with the exception of Gra muscle, we did not observe any significant augment in the proportion of fibre type 1 in old muscles. Conversely, a trend to an age-related decrease in the amount of type 1 fibres was seen in all the distal hindlimb muscles, this reduction being particularly prominent in the EDL muscle. Additionally, in the old slow-twitch Sol muscle, the proportion of type 2A fibres was found prominently increased at the expense of a reduction in the number of types 1 and 2B fibres. These results corroborate previous findings indicating that fibre type 2 to 1 switching in ageing is not a common feature shared by all muscles, with profound differences existing between fast-twitch and slow-twitch muscles.¹⁶⁵ Additionally, our data suggest that differences in aged-related myofiber type transition also occur between muscles having similar fibre type composition but different limb topography (i.e. the distal TA or EDL and the proximal Gra muscle; all of them are fast-twitch muscles). It is important to note that there is a substantial inconsistency between the age-related changes in fibre type composition reported in the literature. Some studies in human muscles have found a type 2 to type 1 fibre switching with a reduction in the former, whereas other analyses have conversely reported aged-related increases in type 2 fibres; other works, however, have found no changes in muscle-fibre type profiles in humans with ageing.^{172–175} Similar disparities in age-associated fibre type transitions have been found in rodent studies.^{165,176–178} The absence of a consistent pattern of fibre type alterations, we found in old muscles, correlates with the absence of substantial MN death and, more specifically, with the lack of a decline in the proportion of vulnerable (MMP-9-positive) MNs. Overall, our data suggest that fibre type changes are more of a consequence of MN dysfunction than cell death.

The accumulation of lipofuscin in postmitotic cells is widely considered a hallmark of ageing (reviewed by Brunk and Terman⁹⁶ and Gray and Woulfe⁹⁷). In this respect, the presence of lipofuscin granules in brain cells, particularly in cerebral cortex and motor areas, is one of the most consistent features of ageing.¹⁷⁹ In a recent study, the content of lipofuscin aggregates has been analysed in MNs of old mice

and rhesus monkeys as a marker of neuronal ageing.¹⁰⁰ In this work, authors have shown a variable degree of lipofuscin accumulation among MNs, suggesting that not all MNs aged either at a comparable rate or at the same time. In a similar way, we noticed that in sharp contrast with the absence of lipofuscin in adult muscles, all old muscles from C57BL/6J mice accumulate this pigment in the myofiber cytosol. We observed, however, remarkable variations in the amounts of lipofuscin between the different muscles examined, with the slow-twitch Sol muscle exhibiting the lowest proportion of the lipid pigment and the fast-twitch Gra muscle the highest. These differences correlate with the finding that the fast-twitch types 2A and 2B myofibers are those which exhibited the highest content of lipofuscin in old muscles, with type 1 fibres almost devoid of the pigment granules. This indicates that vulnerable (types 2A and 2B) fibres are more prone to ageing than type 1 fibres. Large numbers of lipofuscin granules have been reported to be present in different muscular dystrophies in humans and young dystrophin-deficient *mdx* mice.^{180–182} It has been proposed that cellular lipofuscin accumulation is the consequence of an oxidative stress process making cellular components undegradable by lysosomal enzymes.⁹⁶ Indeed, the treatment of young *mdx* mice with antioxidants reduces lipofuscin accumulation and improves muscle function. Oxidation, as a cause of lipofuscin formation, seems to be also linked to a decreased degradative capacity of lysosomes, which would occur with age or under pathological conditions. It is not clear, however, whether lipofuscin really interferes with normal cellular function or, conversely, the accumulation of this pigment is a mere result from a previous cellular disturbance. Several pieces of evidence suggest that a detrimental feedback loop leading to lysosomal and ubiquitin/proteasome pathway inhibition may occur as a result of lipofuscin aggregation. In any case, it seems plausible that the accumulated lipofuscin makes cells more vulnerable to pathologic stimuli and decreases the cellular adaptability and response capacity to injury.⁹⁶ In the case of aged MNs, lipofuscin accumulation does not associate with cell atrophy or death, although it appears to correlate with the unequivocal alterations occurring with ageing in motor nerve terminals.¹⁰⁰ Moreover, although the lipofuscin aggregation is significantly higher in muscle fibres with peripheral nuclei, the presence of a certain proportion of fibres with central nuclei indicates the existence of a newly regenerated myofibers already containing the age pigment. Whether or not lipofuscin granules in these fibres correlates with an impaired cellular function already present in the initial steps of myogenic programme should be analysed.

In summary, ageing in mice is accompanied by defects in motor skills and changes in the electromyographic patterns. These alterations occur in the absence of significant MN death but are associated to prominent MN deafferentation and reactive gliosis, which possibly contributes to MN impairment. Therefore, age-related MN dysfunction rather than

death could be responsible of structural and molecular alterations in motor axons, MNJs, and skeletal muscles found in senescence. The ageing progress appears to entail continuous cycles of motor axon degeneration/regeneration and sprouting, as deduced by the signs of morphologically altered motor axons in adult mice and the increased numbers of clustered small myelinated axons found in VRs of middle-aged mice. Although the distinct types of old muscles examined share some common features indicative of the ageing process, the profile of some alterations is markedly variable between muscles. This variability exists even between muscles located in close vicinity and having similar fibre type composition, suggesting that the degree of activity and specific function of muscles, rather than their topography and fibre typology, has greater impact on age-related muscular changes. Further research is needed to draw more reliable conclusions concerning the pathogenic mechanisms underlying neuromuscular alterations during ageing and the extent of their contribution to development of sarcopenia.

Funding

This work was supported by Abbott and a grant from the *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades* cofinanced by *Fondo Europeo de Desarrollo Regional* (RTI2018-099278-B-I00 to J.C. and J.E.).

Author contributions

J.C., J.E.E., S.L.P., A.Ba., T.D., and R.R. contributed to conception of the research, and J.C. and J.E.E. designed the study. A. B., S.G., G.M.-C., O.T., A.C., and L.P. performed the research. A.B., S.G., O.T., X.N., and J.C. analysed the data. J.C., J.E.E., X. N., and S.L.P. contributed to writing the paper.

Acknowledgements

We thank Sara Salvany, Sara Hernández, Alaó Gatiús, Mònica Esteve, Maria Beltrán, and Clara Paniagua for collaborating in some experiments, Anaïs Panosa from the SCT of Microscopy of the *Universitat de Lleida* for technical support with confocal microscopy, and the staff from the SCT Animal Facility of the *Universitat de Lleida* for mouse care and housing. The authors certify that they comply with the ethical guidelines for

authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.¹⁸³

Online supplementary material

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Aging is accompanied by a decline in body weight and motor performance measured with the open-field test. **A)** Body weight in adult (4–10 months) and old (19–28 months) mice; *** $p < 0.001$ vs. adult 46 weeks. **B and C)** Motor performance assessed by open-field test in mice from 24 months of age on; the distance (in cm, **B**) and average speed (cm/s, **C**) in the course of the 16 week-period in which measurements were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. 0 weeks. Data in the graphs are shown as the mean \pm SEM, $n = 15$ (84 to 112 weeks); $n = 8$ (~116 weeks onwards).

Figure S2. Age-related changes in DRG sensory neurons. **A-C, F-H and K-M)** Proportion (**A, F, K**) and soma area (**B, G, L**) of sensory neurons expressing CGRP (**A, B**), IB4 (**F, G**) and PV (**K, L**) in DRGs. **C, H, M)** Relative size-frequency (expressed as soma area in μm^2) histogram of DRG neurons showing CGRP- (**C**), IB4- (**H**) and PV- (**M**) positive staining. **D1-O2)** Representative micrographs taken from DRG cryostat sections processed for CGRP, IB4 and PV staining (green), as indicated. Sections were also counterstained with fluorescent Nissl (red) for neuron visualization. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. adult; $n = 4$ ventral roots of different animals per age group (Student's *t*-test). Scale bar: in **O2** = $100 \mu\text{m}^2$ (valid for **D1-E2, I1-J2** and **N1-O1**).

Conflict of interest

A.Ba., S.L.P., T.D., and R.R. are employees of Abbott. The other authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;**56**: M146–M156.
2. Cardoso AL, Fernandes A, Aguilar-Pimentel JA, de Angelis MH, Guedes JR, Brito MA, et al. Towards frailty biomarkers: candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2018;**47**:214–277.
3. Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated

- physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol* 2004;**159**:413–421.
4. Abellan van Kan G. Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* 2009;**13**:708–712.
 5. von Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2010;**1**:129–133.
 6. Larsson L, Degens H, Li M, Salvati L, Lee YI, Thompson W, et al. Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function. *Physiol Rev* 2019;**99**:427–511.
 7. Kalinkovich A, Livshits G. Sarcopenia—the search for emerging biomarkers. *Ageing Res Rev* 2015;**22**:58–71.
 8. Berger MJ, Doherty TJ. Sarcopenia: prevalence, mechanisms, and functional consequences. *Interdiscip Top Gerontol* 2010;**37**:94–114.
 9. Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PLoS ONE* 2012;**7**:e29082.
 10. Khosa S, Trikamji B, Khosa GS, Khanli HM, Mishra SK. An overview of neuromuscular junction aging findings in human and animal studies. *Curr Aging Sci* 2019;**12**:28–34.
 11. Willadt S, Nash M, Slater C. Age-related changes in the structure and function of mammalian neuromuscular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2018;**1412**:41–53.
 12. Jang YC, Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 2011;**46**:193–198.
 13. Kang H, Lichtman JW. Motor axon regeneration and muscle reinnervation in young adult and aged animals. *J Neurosci* 2013;**33**:19480–19491.
 14. Tomlinson BE, Irving D. The numbers of limb motor neurons in the human lumbosacral cord throughout life. *J Neurol Sci* 1977;**34**:213–219.
 15. Ishihara A, Naitoh H, Katsuta S. Effects of ageing on the total number of muscle fibers and motoneurons of the tibialis anterior and soleus muscles in the rat. *Brain Res* 1987;**435**:355–358.
 16. Hashizume K, Kanda K. Neuronal dropout is greater in hindlimb motor nuclei than in forelimb motor nuclei in aged rats. *Neurosci Lett* 1990;**113**:267–269.
 17. Jacob JM. Lumbar motor neuron size and number is affected by age in male F344 rats. *Mech Ageing Dev* 1998;**106**:205–216.
 18. Doherty TJ, Vandervoort AA, Brown WF. Effects of ageing on the motor unit: a brief review. *Can J Appl Physiol = Revue canadienne de physiologie appliquee* 1993;**18**:331–358.
 19. Power GA, Dalton BH, Behm DG, Vandervoort AA, Doherty TJ, Rice CL. Motor unit number estimates in masters runners: use it or lose it? *Med Sci Sports Exerc* 2010;**42**:1644–1650.
 20. McKinnon NB, Montero-Odasso M, Doherty TJ. Motor unit loss is accompanied by decreased peak muscle power in the lower limb of older adults. *Exp Gerontol* 2015;**70**:111–118.
 21. Chopek JW, Gardiner PF. Life-long caloric restriction: effect on age-related changes in motoneuron numbers, sizes and apoptotic markers. *Mech Ageing Dev* 2010;**131**:650–659.
 22. Chai RJ, Vukovic J, Dunlop S, Grounds MD, Shavlakadze T. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS ONE* 2011;**6**:e28090.
 23. Gonzalez M, Ruggiero FP, Chang Q, Shi YJ, Rich MM, Kraner S, et al. Disruption of TrkB-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron* 1999;**24**:567–583.
 24. Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H, et al. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor-neurons. *Science* 1995;**268**:1495–1499.
 25. Schinder AF, Poo M. The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2000;**23**:639–645.
 26. Messi ML, Delbono O. Target-derived trophic effect on skeletal muscle innervation in senescent mice. *J Neurosci* 2003;**23**:1351–1359.
 27. Belluardo N, Westerblad H, Mudo G, Casabona A, Bruton J, Caniglia G, et al. Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4. *Mol Cell Neurosci* 2001;**18**:56–67.
 28. Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, et al. Cellular and molecular anatomy of the human neuromuscular junction. *Cell Rep* 2017;**21**:2348–2356.
 29. Flurkey K, Currer JM, Harrison DE, In Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL, eds. *The Mouse in Biomedical Research Normative Biology, Husbandry, and Models*, 2nd ed. New York: Elsevier; 2007. p 637–672.
 30. Miller RA, Nadon NL. Principles of animal use for gerontological research. *J Gerontol a-Biol* 2000;**55**:B117–B123.
 31. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health evaluation of experimental laboratory mice. *Curr Protocols Mouse Biol* 2012;**2**:145–165.
 32. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 2009;**10**:519–529.
 33. Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG. Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle Nerve* 2001;**24**:905–915.
 34. Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R, Navarro X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* 2011;**122**:1660–1670.
 35. Bonetto A, Andersson DC, Waning DL. Assessment of muscle mass and strength in mice. *BoneKey Rep* 2015;**4**:732.
 36. Hebel R, Stromberg MW. *Myology. Anatomy of the Laboratory Rat*. Baltimore, U.S.A: Williams & Wilkins Company; 1976. p 18–42.
 37. Clarke PG, Oppenheim RW. Neuron death in vertebrate development: in vitro methods. *Methods Cell Biol* 1995;**46**:277–321.
 38. 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.
 39. Cerveró C, Montull N, Tarabal O, Piedrafita L, Esquerda JE, Calderó J. 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. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2016;**13**:198–216.
 40. Young K, Morrison H. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using ImageJ. *J Visual Exp: JoVE* 2018;**136**.
 41. Kawamura Y, O'Brien P, Okazaki H, Dyck PJ. Lumbar motoneurons of man II: the number and diameter distribution of large- and intermediate-diameter cytons in 'motoneuron columns' of spinal cord of man. *J Neuropathol Exp Neurol* 1977;**36**:861–870.
 42. Sugiura M, Kanda K. Progress of age-related changes in properties of motor units in the gastrocnemius muscle of rats. *J Neurophysiol* 2004;**92**:1357–1365.
 43. Nijssen J, Comley LH, Hedlund E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 2017;**133**:863–885.
 44. Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 2006;**9**:408–419.
 45. Kaplan A, Spiller KJ, Towne C, Kanning KC, Choe GT, Geber A, et al. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron* 2014;**81**:333–348.
 46. New HV, Mudge AW. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 1986;**323**:809–811.
 47. 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.
 48. Matteoli M, Haimann C, Torritarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, Decamilli P. Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction. *P Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:7366–7370.

49. Calderó J, Casanovas A, Sorribas A, Esquerda JE. Calcitonin gene-related peptide in rat spinal cord motoneurons: subcellular distribution and changes induced by axotomy. *Neuroscience* 1992;**48**:449–461.
50. Tarabal O, Calderó J, Ribera J, Sorribas A, López R, Molgó 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.
51. Piehl F, Arvidsson U, Johnson H, Cullheim S, Villar M, Dagerlind A, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity and CGRP mRNA in rat spinal cord motoneurons after different types of lesions. *Eur J Neurosci* 1991;**3**:737–757.
52. Matteoli M, Balbi S, Sala C, Chini B, Cimino M, Vitadello M, et al. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. *J Mol Neurosci* 1990;**2**:175–184.
53. Liddel SA, Barres BA. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 2017;**46**:957–967.
54. Aldskogius H, Kozlova EN. Central neuron–glial and glial–glial interactions following axon injury. *Prog Neurobiol* 1998;**55**:1–26.
55. Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* 2009;**57**:1251–1264.
56. Phillips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 2011;**10**:253–263.
57. Salvany S, Casanovas A, Tarabal O, Piedrafita L, Hernandez S, Santafe M, et al. Localization and dynamic changes of neuregulin-1 at C-type synaptic boutons in association with motor neuron injury and repair. *FASEB J: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019;**33**:7833–7851.
58. Tang Y, Le W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 2016;**53**:1181–1194.
59. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 2009;**29**:13435–13444.
60. Franco R, Fernandez-Suarez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2015;**131**:65–86.
61. Liddel SA, Gattenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 2017;**541**:481–487.
62. Kawamoto Y, Akiguchi I, Tomimoto H, Shirakashi Y, Honjo Y, Budka H. Upregulated expression of 14-3-3 proteins in astrocytes from human cerebrovascular ischemic lesions. *Stroke* 2006;**37**:830–835.
63. Conforti L, Gilley J, Coleman MP. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014;**15**:394–409.
64. Antal M, Freund TF, Polgar E. Calcium-binding proteins, parvalbumin- and calbindin-D 28k-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and dorsal root ganglia: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1990;**295**:467–484.
65. Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, et al. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J Neurosci* 2006;**26**:7281–7292.
66. Marmigère F, Ernfor P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nat Rev Neurosci* 2007;**8**:114–127.
67. Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD Jr, Gage FH, Lichtman JW, et al. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:14863–14868.
68. Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS ONE* 2012;**7**:e34640.
69. Willadt S, Nash M, Slater CR. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Sci Rep* 2016;**6**:24849.
70. 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.
71. Holahan MR. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. *Front Cell Neurosci* 2017;**11**:266.
72. Caroni P, Becker M. The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF1. *J Neurosci* 1992;**12**:3849–3861.
73. Li L, Xiong WC, Mei L. Neuromuscular junction formation, aging, and disorders. *Annu Rev Physiol* 2018;**80**:159–188.
74. Tintignac LA, Brenner HR, Ruegg MA. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiol Rev* 2015;**95**:809–852.
75. Samuel MA, Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Sanes JR. Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS ONE* 2012;**7**:e46663.
76. Reist NE, Magill C, McMahan UJ. Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles. *J Cell Biol* 1987;**105**:2457–2469.
77. Tassi E, Al-Attar A, Aigner A, Swift MR, McDonnell K, Karavanov A, et al. Enhancement of fibroblast growth factor (FGF) activity by an FGF-binding protein. *J Biol Chem* 2001;**276**:40247–40253.
78. Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, et al. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* 2009;**326**:1549–1554.
79. Taetzsch T, Tenga MJ, Valdez G. Muscle fibers secrete FGFBP1 to slow degeneration of neuromuscular synapses during aging and progression of ALS. *J Neurosci: the official journal of the Society for Neuroscience* 2017;**37**:70–82.
80. Faltg J, Leduc-Gaudet JP, Reynaud O, Ferland G, Gaudreau P, Gouspillou G. Effects of aging and caloric restriction on fiber type composition, mitochondrial morphology and dynamics in rat oxidative and glycolytic muscles. *Front Physiol* 2019;**10**:420.
81. Ascenzi F, Barberi L, Dobrowolny G, Villa Nova Bacurau A, Nicoletti C, Rizzuto E, et al. Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell* 2019;**18**:e12954.
82. Chung T, Park JS, Kim S, Montes N, Walston J, Hoke A. Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline. *Muscle Nerve* 2017;**55**:894–901.
83. Brooks SV, Faulkner JA. Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol* 1988;**404**:71–82.
84. Caccia MR, Harris JB, Johnson MA. Morphology and physiology of skeletal muscle in aging rodents. *Muscle Nerve* 1979;**2**:202–212.
85. Hunter SK, Pereira HM, Keenan KG. The aging neuromuscular system and motor performance. *J Appl Physiol* 2016;**121**:982–995.
86. McKinnon NB, Connelly DM, Rice CL, Hunter SW, Doherty TJ. Neuromuscular contributions to the age-related reduction in muscle power: mechanisms and potential role of high velocity power training. *Ageing Res Rev* 2017;**35**:147–154.
87. Carlson BM. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am J Anat* 1973;**137**:119–149.
88. Folker ES, Bayliss MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol* 2013;**4**:363.
89. Sacco A, Puri PL. Regulation of muscle satellite cell function in tissue homeostasis and aging. *Cell Stem Cell* 2015;**16**:585–587.
90. Sousa-Victor P, García-Prat L, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. *Trends Endocrinol Metab: TEM* 2015;**26**:287–296.
91. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000;**50**:500–509.
92. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011;**91**:1447–1531.

93. 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: official journal of the Histochemistry Society* 1993;**41**:733–743.
94. Larsson L, Edstrom L, Lindegren B, Gorza L, Schiaffino S. MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am J Physiol* 1991;**261**:C93–C101.
95. Larsson L, Biral D, Campione M, Schiaffino S. An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 1993;**147**:227–234.
96. Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *12 Guest Editor: Rajindar S. Sohal* This article is part of a series of reviews on “Oxidative Stress and Aging.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic Biol Med* 2002;**33**:611–619.
97. Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ*: SAGE KE 2005;**2005**:re1.
98. Terman A, Abrahamsson N, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin-loaded human fibroblasts show increased susceptibility to oxidative stress. *Exp Gerontol* 1999;**34**:755–770.
99. Ballak SB, Degens H, de Haan A, Jaspers RT. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: a comparison of muscle aging in men and male rodents. *Ageing Res Rev* 2014;**14**:43–55.
100. Maxwell N, Castro RW, Sutherland NM, Vaughan KL, Szarowicz MD, de Cabo R, et al. α -Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice. *Aging Cell* 2018;**17**:e12726.
101. Calderó J, Prevette D, Mei X, Oakley RA, Li L, Milligan C, et al. Peripheral target regulation of the development and survival of spinal sensory and motor neurons in the chick embryo. *J Neurosci* 1998;**18**:356–370.
102. Zimatkin SM, Bon’ El. Dark neurons of the brain. *Neurosci Behav Physiol* 2018;**48**:908–912.
103. Gallyas F. Novel cell-biological ideas deducible from morphological observations on ‘dark’ neurons revisited. *Ideggyogy Sz* 2007;**60**:212–222.
104. Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, et al. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol* 2006;**112**:471–481.
105. Kovesdi E, Pal J, Gallyas F. The fate of ‘dark’ neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects. *Brain Res* 2007;**1147**:272–283.
106. Krishnan VS, Shavliakadze T, Grounds MD, Hodgetts SI, Harvey AR. Age-related loss of VGLUT1 excitatory, but not VGAT inhibitory, immunoreactive terminals on motor neurons in spinal cords of old sarcopenic male mice. *Biogerontology* 2018;**19**:385–399.
107. Cerveró C, Blasco A, Tarabal O, Casanovas A, Piedrafita L, Navarro X, et al. Glial activation and central synapse loss, but not motoneuron degeneration, are prevented by the sigma-1 receptor agonist PRE-084 in the *Smn2B^{-/-}* mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018;**77**:577–597.
108. Tarabal O, Caraballo-Miralles V, Cardona-Rossinyol A, Correa FJ, Olmos G, Lladó J, 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.
109. Gallart-Palau X, Tarabal O, Casanovas A, Sábado J, Correa FJ, Hereu M, et al. Neuregulin-1 is concentrated in the post-synaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to α -motoneurons and altered during motoneuron diseases. *FASEB J* 2014;**28**:3618–3632.
110. 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.
111. Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, et al. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron* 2011;**69**:453–467.
112. Milan L, Courtand G, Carroit L, Masmejean F, Barriere G, Cazalets JR, et al. Age-related changes in pre- and postsynaptic partners of the cholinergic C-boutons in wild-type and SOD1G93A lumbar motoneurons. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0135525.
113. Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, Gros-Louis F, et al. Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron* 2013;**80**:80–96.
114. Pullen AH, Athanasiou D. Increase in pre-synaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur J Neurosci* 2009;**29**:551–561.
115. Sunico CR, Dominguez G, Garcia-Verdugo JM, Osta R, Montero F, Moreno-Lopez B. Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 2011;**21**:1–15.
116. 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.
117. Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ. Normal distribution of VGLUT1 synapses on spinal motoneuron dendrites and their reorganization after nerve injury. *J Neurosci* 2014;**34**:3475–3492.
118. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 2000;**80**:767–852.
119. Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhatsky A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer’s disease. *Neuroscience* 2016;**323**:170–182.
120. Spittau B. Aging microglia-phenotypes, functions and implications for age-related neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 2017;**9**.
121. Wong WT. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci* 2013;**7**:22.
122. Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci* 2013;**53**:34–41.
123. McGivern JV, Patitucci TN, Nord JA, Barabas MA, Stucky CL, Ebert AD. Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia* 2013;**61**:1418–1428.
124. Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis* 2010;**37**:493–502.
125. Giorgetti E, Panesar M, Zhang Y, Joller S, Ronco M, Obrecht M, et al. Modulation of microglia by voluntary exercise or CSF1R inhibition prevents age-related loss of functional motor units. *Cell Rep* 2019;**29**:1539–1554 e7.
126. Henstridge CM, Tzioras M, Paolicelli RC. Glial contribution to excitatory and inhibitory synapse loss in neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* 2019;**13**:63.
127. Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 2013;**504**:394–400.
128. Acharjee S, Verbeek M, Gomez CD, Bisht K, Lee B, Benoit L, et al. Reduced microglial activity and enhanced glutamate transmission in the basolateral amygdala in early CNS autoimmunity. *J Neurosci* 2018;**38**:9019–9033.
129. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 2009;**29**:3974–3980.
130. Vaughan SK, Stanley OL, Valdez G. Impact of aging on proprioceptive sensory neurons and intrafusal muscle fibers in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;**72**:771–779.
131. Chen HH, Hippenmeyer S, Arber S, Frank E. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr Opin Neurobiol* 2003;**13**:96–102.
132. Bulling DG, Kelly D, Bond S, McQueen DS, Seckl JR. Adjuvant-induced joint

- inflammation causes very rapid transcription of beta-preprotachykinin and alpha-CGRP genes in innervating sensory ganglia. *J Neurochem* 2001;**77**:372–382.
133. Mulder H, Zhang Y, Danielsen N, Sundler F. Islet amyloid polypeptide and calcitonin gene-related peptide expression are up-regulated in lumbar dorsal root ganglia after unilateral adjuvant-induced inflammation in the rat paw. *Mol Brain Res* 1997;**50**:127–135.
 134. Staton PC, Wilson AW, Bountra C, Chessell IP, Day NC. Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: differential modulation by rofecoxib and paracetamol. *Eur J Pain* 2007;**11**:283–289.
 135. Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Phenotypic inflammation switch in rats shown by calcitonin gene-related peptide immunoreactive dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar facet joints. *Spine* 2001;**26**:1009–1013.
 136. Navarro X, Udina E. Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part III-electrophysiological evaluation. *Int Rev Neurobiol* 2009;**87**:105–126.
 137. Sato A, Sato Y, Suzuki H. Aging effects on conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of peripheral nerves. *Neurosci Lett* 1985;**53**:15–20.
 138. Schmelzer JD, Low PA. Electrophysiological studies on the effect of age on caudal nerve of the rat. *Exp Neurol* 1987;**96**:612–620.
 139. Verdú E, Buti M, Navarro X. Functional changes of the peripheral nervous system with aging in the mouse. *Neurobiol Aging* 1996;**17**:73–77.
 140. Buchthal F, Rosenfalck A, Behse F. Sensory potentials of normal and diseased nerves. In Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R, eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders; 1984. p 981–1105.
 141. Dorfman LJ, Bosley TM. Age-related changes in peripheral and central nerve conduction in man. *Neurology* 1979;**29**:38–44.
 142. Taylor PK. Non-linear effects of age on nerve conduction in adults. *J Neurol Sci* 1984;**66**:223–234.
 143. Bouche P, Cattelín F, Saint-Jean O, Leger JM, Queslati S, Guez D, et al. Clinical and electrophysiological study of the peripheral nervous system in the elderly. *J Neurol* 1993;**240**:263–268.
 144. O'Sullivan DJ, Swallow M. The fibre size and content of the radial and sural nerves. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968;**31**:464–470.
 145. Sharma AK, Bajada S, Thomas PK. Age changes in the tibial and plantar nerves of the rat. *J Anat* 1980;**130**:417–428.
 146. Ceballos D, Cuadras J, Verdu E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat* 1999;**195**:563–576.
 147. Gawel M, Kostera-Pruszczyk A. Effect of age and gender on the number of motor units in healthy subjects estimated by the multipoint incremental MUNE method. *J Clin Neurophysiol: official publication of the American Electroencephalographic Society* 2014;**31**:272–278.
 148. Brown MC, Holland RL, Hopkins WG. Motor nerve sprouting. *Annu Rev Neurosci* 1981;**4**:17–42.
 149. Fagg GE, Scheff SW, Cotman CW. Axonal sprouting at the neuromuscular junction of adult and aged rats. *Exp Neurol* 1981;**74**:847–854.
 150. Jacob JM, Robbins N. Differential effects of age on neuromuscular transmission in partially denervated mouse muscle. *J Neurosci* 1990;**10**:1522–1529.
 151. Fogarty MJ, Gonzalez Porras MA, Mantilla CB, Sieck GC. Diaphragm neuromuscular transmission failure in aged rats. *J Neurophysiol* 2019;**122**:93–104.
 152. Barker D, Ip MC. Sprouting and degeneration of mammalian motor axons in normal and de-afferented skeletal muscle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1966;**163**:538–554.
 153. Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 2000;**20**:3663–3675.
 154. Li Y, Lee YI, Thompson WJ. Changes in aging mouse neuromuscular junctions are explained by degeneration and regeneration of muscle fiber segments at the synapse. *J Neurosci* 2011;**31**:14910–14919.
 155. Changeux JP, Duclert A, Sekine S. Calcitonin gene-related peptides and neuromuscular interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1992;**657**:361–378.
 156. Chung AM. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): role in peripheral nerve regeneration. *Rev Neurosci* 2018;**29**:369–376.
 157. Arvidsson U, Johnson H, Piehl F, Cullheim S, Hokfelt T, Risling M, et al. Peripheral nerve section induces increased levels of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in axotomized motoneurons. *Exp Brain Res* 1990;**79**:212–216.
 158. Haas CA, Streit WJ, Kreutzberg GW. Rat facial motoneurons express increased levels of calcitonin gene-related peptide mRNA in response to axotomy. *J Neurosci Res* 1990;**27**:270–275.
 159. Valsecchi V, Boido M, De Amicis E, Piras A, Vercelli A. Expression of muscle-specific MiRNA 206 in the progression of disease in a murine SMA model. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0128560.
 160. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal muscle* 2011;**1**:19.
 161. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 2010;**316**:3050–3058.
 162. Carlson ME, Conboy MJ, Hsu M, Barchas L, Jeong J, Agrawal A, et al. Relative roles of TGF- β 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell* 2009;**8**:676–689.
 163. Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, et al. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med* 2015;**21**:76–80.
 164. Fry CS, Lee JD, Jackson JR, Kirby TJ, Stasko SA, Liu H, et al. Regulation of the muscle fiber microenvironment by activated satellite cells during hypertrophy. *FASEB J: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2014;**28**:1654–1665.
 165. Sheard PW, Anderson RD. Age-related loss of muscle fibres is highly variable amongst mouse skeletal muscles. *Biogerontology* 2012;**13**:157–167.
 166. Hashizume K, Kanda K. Differential effects of aging on motoneurons and peripheral nerves innervating the hindlimb and forelimb muscles of rats. *Neurosci Res* 1995;**22**:189–196.
 167. Oertel G. Changes in human skeletal muscles due to ageing. Histological and histochemical observations on autopsy material. *Acta Neuropathol* 1986;**69**:309–313.
 168. Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 2000;**20**:2534–2542.
 169. Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo MV, Yoshikawa M, Hampton TG, et al. Characterization of early pathogenesis in the SOD1 (G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* 2013;**3**:431–457.
 170. 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.
 171. 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.
 172. Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, Fiatarone MA, Evans WJ, Roubenoff R. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol* 2000;**88**:1321–1326.
 173. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? *J Neurol Sci* 1988;**84**:275–294.
 174. Larsson L. Morphological and functional characteristics of the ageing skeletal muscle in man. A cross-sectional study. *Acta Physiol Scand Suppl* 1978;**457**:1–36.
 175. Hakkinen K, Newton RU, Gordon SE, McCormick M, Volek JS, Nindl BC, et al. Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older

- men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;**53**:B415–B423.
176. Brown M, Hasser EM. Complexity of age-related change in skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996;**51**: B117–B123.
177. Carter EE, Thomas MM, Murynka T, Rowan SL, Wright KJ, Huba E, et al. Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats. *Exp Gerontol* 2010;**45**:662–670.
178. Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp Gerontol* 2010;**45**:389–393.
179. Benavides SH, Monserrat AJ, Fariña S, Porta EA. Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life. *Arch Gerontol Geriatr* 2002;**34**:219–231.
180. Nakae Y, Stoward PJ, Kashiya T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, et al. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and *mdx* mice. *J Mol Histol* 2004;**35**:489–499.
181. Nakae Y, Stoward PJ. The high correlation between counts and area fractions of lipofuscin granules, a biomarker of oxidative stress in muscular dystrophies. *Histochem Cell Biol* 2016;**146**:627–634.
182. Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J* 2013;**280**:4149–4164.
183. von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*: update 2019. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019;**10**:1143–1145.

Beneficial effects of dietary supplementation with green tea catechins and cocoa flavanols on aging-related regressive changes in the mouse neuromuscular system

Sílvia Gras^{1,*}, Alba Blasco^{1,*}, Guillem Mòdol-Caballero², Olga Tarabal¹, Anna Casanovas¹, Lúdia Piedrafita¹, Alejandro Barranco³, Tapas Das⁴, Ricardo Rueda⁵, Suzette L. Pereira⁴, Xavier Navarro², Josep E. Esquerda¹, Jordi Calderó¹

¹Unitat de Neurobiologia Cellular, Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida and Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida), Lleida, Spain

²Grup de Neuroplasticitat i Regeneració, Institut de Neurociències, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona and CIBERNED, Bellaterra, Spain

³Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

⁴Abbott Nutrition, Research and Development, Columbus, OH 43215, USA

⁵Abbott Nutrition, Research and Development, Granada, Spain

*Equal contribution

In memory of Ron Oppenheim (1938-2021), passionate scientist, great neurobiologist and better friend

Correspondence to: Jordi Calderó; **email:** jordi.caldero@udl.cat

Keywords: sarcopenia, green tea, neuromuscular system, aging, cocoa

Received: April 29, 2021

Accepted: June 19, 2021

Published: July 28, 2021

Copyright: © 2021 Gras et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Besides skeletal muscle wasting, sarcopenia entails morphological and molecular changes in distinct components of the neuromuscular system, including spinal cord motoneurons (MNs) and neuromuscular junctions (NMJs); moreover, noticeable microgliosis has also been observed around aged MNs. Here we examined the impact of two flavonoid-enriched diets containing either green tea extract (GTE) catechins or cocoa flavanols on age-associated regressive changes in the neuromuscular system of C57BL/6J mice. Compared to control mice, GTE- and cocoa-supplementation significantly improved the survival rate of mice, reduced the proportion of fibers with lipofuscin aggregates and central nuclei, and increased the density of satellite cells in skeletal muscles. Additionally, both supplements significantly augmented the number of innervated NMJs and their degree of maturity compared to controls. GTE, but not cocoa, prominently increased the density of VACHT and VGluT2 afferent synapses on MNs, which were lost in control aged spinal cords; conversely, cocoa, but not GTE, significantly augmented the proportion of VGluT1 afferent synapses on aged MNs. Moreover, GTE, but not cocoa, reduced aging-associated microgliosis and increased the proportion of neuroprotective microglial phenotypes. Our data indicate that certain plant flavonoids may be beneficial in the nutritional management of age-related deterioration of the neuromuscular system.

INTRODUCTION

Sarcopenia, the progressive loss of skeletal muscle mass and function with age, is considered the main causative factor of the physical performance decline in the elderly.

The compromised muscular function associated to sarcopenia has a negative impact on the life quality of older adults and increases the risk for adverse health outcomes including disability, fall-associated injuries, morbidity, and mortality [1]. All these aspects stress

healthcare systems, increasing the care needs of older people and their costs. With a prevalence of 8-40% in people over 60 years, depending on studies [2, 3], sarcopenia constitutes a critical challenge in our aging society. Starting in the third decade of life, humans experience a gradual deterioration of muscle power, and over the age of 60 a decline of about 3% of muscle mass per year has been reported to occur in most of individuals [3, 4]. Different mechanisms have been identified to contribute to the loss of muscle mass with age. In fact, sarcopenia in the elderly is presently considered a complex multifactorial condition which involves intrinsic and extrinsic causative factors (reviewed by [5]); among of them, chronic inflammation, metabolic and endocrine alterations, poor nutrition, mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and neurogenic factors, appear to play an important role in sarcopenia.

Accompanying the skeletal muscle wasting, a plethora of structural and functional changes has been found at advanced ages in distinct components of the neuromuscular system, including spinal cord motoneurons (MNs), dorsal root ganglion (DRG) sensory neurons, and neuromuscular junctions (NMJs) ([6], see also [5, 7-9] as reviews). Thus, studies performed in both animals and humans have reported that, with aging, MNs become dysfunctional, show a marked depletion of afferent nerve terminals and, some of them, exhibit signs of degeneration. Prominent gliosis, involving both microglia and astroglia, have also been found in the spinal cord around aged MNs. In this vein, we have recently reported a marked increase in the microglial and astroglial pro-inflammatory phenotypes (M1 and A1, respectively) in the spinal cord of aged mice to the detriment of anti-inflammatory and neuroprotective (M2 and A2) glial subpopulations [6]. Additionally, with age, NMJs appear to be remodeled and exhibit marked changes in their pre- and postsynaptic compartments in association with the loss of motor units, reactive nerve sprouting and cycles of muscle denervation/reinnervation. Aging is also accompanied by alterations in DRG sensory neurons in form of changes in the expression of different neuropeptides and atrophy of both proprioceptive and nociceptive neuronal populations [6]. However, on the whole, the primary contribution of such defects in the skeletal muscle deterioration with aging is not yet well established. In this regard, the fact that the age-associated NMJ disruption is a secondary process resulting from intrinsic defects in the skeletal muscle cannot be excluded.

Age-related decline in muscle function and motor activity is susceptible to be ameliorated by lifestyle interventions such as exercise and/or nutritional strategies [10-15]. Caloric restriction, based on a diet

low in calories, has been shown to attenuate aging sarcopenia in various species by acting at different levels of the skeletal muscle. Thus, a line of evidence indicates that a moderate reduction in caloric intake, alone or combined with exercise training, is able to mitigate mitochondrial alterations and production of reactive oxygen species, modulate autophagy, enhance the endogenous myofiber repair and counteract the increase in proapoptotic signals observed in aged skeletal muscles [16-20]. Caloric restriction has also been reported to ameliorate age-related changes in rodent NMJs and to prevent MN and motor axon degeneration found to occur with aging [11, 21]. In a similar way, some dietary supplements have been shown to counteract age-related changes that contribute to neuromuscular dysfunction (reviewed by [12]). Thus, several nutritional interventions, involving supplementations with vitamin D, omega-3 fatty acids, creatine, β -hydroxy- β -methylbutyrate, or dietary phospholipids, have been reported to be beneficial in promoting healthy neuromuscular aging throughout different mechanisms; these include: *a*) myotrophic, neurotrophic and anti-inflammatory actions; *b*) regulation of pathways involved in mitochondrial function and reactive oxygen species production; *c*) inhibition of muscle proteolysis; and *d*) improvement of cellular bioenergetics.

Plant flavonoids have gained particular attention as dietary compounds for keeping good health and preventing a number of diseases, particularly cardiac disorders and cancer [22]. Several studies have reported the effects of polyphenolic-flavonoids-containing supplements in the attenuation of oxidative stress and muscle damage, particularly after intensive strength and resistance exercise [23-28]. In this regard, previous research has shown the benefits of polyphenols contained in green tea and its extracts on the endurance capacity by preventing muscle impairment in patients with Duchenne muscular dystrophy [29] and mouse models of this disease [30-32], and also in aging [33, 34] and immobilization-induced muscle loss [35, 36]. Green tea extract (GTE) is enriched in flavonoids known as catechins (including catechin, epicatechin, gallic acid, epigallocatechin, epigallocatechin gallate and, predominantly, epigallocatechin gallate [EGCg]), which have strong antioxidant and anti-inflammatory properties [37, 38]. A class of flavonoids known as flavanols are also the main constituents of cocoa beans and their derivatives. Thus, cocoa products are high in non-esterified monomers of the flavanols catechin and epicatechin, and also proanthocyanidins [39]. Among of these compounds, epicatechin represents about 35% of the total content of polyphenols in cocoa beans, and appears to be the main responsible for the beneficial effects of dietary cocoa. In fact, cocoa polyphenols have been shown to exert diverse

physiological activities as antioxidants, cardiovascular protectors, immunomodulators, anti-inflammatory agents and potential tumor protectors [40–44]. Epicatechin has been reported to promote neuroprotection in vitro against oxidative stress [45]. Moreover, in vivo studies in mice have found that an epicatechin dietary supplementation enhances the oxidative capacity of the skeletal muscle and improves the survival rate of animals and the physical performance impairment occurring with aging [46, 47]. Despite the body of reported data on the beneficial actions of dietary polyphenols on physical activity and exercise performance, there is little work examining the effects of these compounds on the structural and molecular organization of the neuromuscular system. In fact, most of the previous analyses have been focused on flavonoid actions in diverse skeletal muscle parameters with very little information on their effects on the neural elements of the neuromuscular system.

In the present study, we tested the impact of flavonoid-enriched diets containing either GTE catechins or cocoa flavanols, on the age-related deterioration of the neuromuscular system. Our main goal was to explore the potential benefits of these flavonoids on age-associated alterations of the spinal cord MNs and glia, DRG sensory neurons, motor nerves, NMJs, and skeletal muscles, and whether these interventions can mitigate the age-related motor decline in a relevant mouse model [6].

RESULTS

GTE and cocoa flavanols improve the survival rate of mice

Starting at age of 92 weeks (21 months), mice were fed with a standard (AIN-93M) diet (control group) or AIN-93M diet supplemented with either GTE (GTE group) or cocoa flavanols (cocoa group). All diets were maintained until week 116 (27 months), the selected endpoint in which animals were euthanized for tissue sampling. Daily food intake was 3 g/d and average body weight was ~30 g. At endpoint, animals from GTE group and cocoa group exhibited a significant higher survival rate (~66%, GTE group; ~73%, cocoa group, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively) compared to control mice (~33%; Gehan-Breslow-Wilcoxon test) (Figure 1A). In comparison with control group mice, those from GTE and cocoa groups had a reduction in food intake between 105 and 109 weeks of age (Figure 1B). No significant differences in body weight were observed between animals of control and cocoa groups; however, mice fed with GTE-enriched diet exhibited, at 111–115 weeks of age, significantly reduced body weights compared with control animals (Figure 1C).

GTE or cocoa flavanols ameliorate the aging degree and degeneration rate of skeletal muscle fibers of aged mice

We next examined the potential effects of the GTE- or cocoa-supplemented diets on the aging-associated histological changes found in skeletal muscles in our previous study [6]. Compared to control group, no significant changes in tibialis anterior (TA) and soleus (Sol) muscle-wet weights, either gross or normalized to body weight (muscle mass/body weight) or cross section area, were found in animals fed with any of the two supplemented diets (Figure 2A–2C), indicating that they are not able to prevent the moderate reduction of muscle mass observed in the course of aging. Moreover, supplemented diets did not either provoke any significant change in the size and density of fibers or the content of connective tissue in aged control muscles (Figure 2D–2F).

We and others have reported that skeletal muscles of aged mice frequently display high proportions of fibers exhibiting centrally located nuclei [6, 11]. This change appears to reflect a regenerative process in muscles in an attempt to replace degenerated myofibers that are lost in the course of aging [48, 49]. We found that, compared to control muscles, those from animals of either GTE or cocoa groups showed a significant reduction in the proportion myofibers displaying central nuclei (Figure 2G–2J). On the other hand, our and other labs have described that aging entails a depletion of muscle satellite cells (SCs) [6, 50–53]. The effects of the supplemented diets on SCs were then examined by immunohistochemistry for paired box protein 7 (Pax7), a paired homeobox transcription factor involved in the proliferation of the muscle precursor cells, in combination with DAPI staining. We found that TA and Sol muscles from animals of GTE and cocoa groups had significantly higher densities of SCs than those from control mice (Figure 2K–2N3).

We wanted to analyze next the effects of the flavonoid-enriched diets on the presence of lipofuscin in aged muscles. Lipofuscin is considered a pigment resulting from an oxidative stress process [54], and is widely seen as a hallmark of aging. Lipofuscin has been shown to accumulate in fibers of aged and dystrophic muscles [6, 55, 56]. As expected from our previous results [6], control aged hindlimb muscles exhibited significant differences in lipofuscin content, with the slow-twitch Sol muscle displaying much lower proportions of the pigment than the fast-twitch TA muscle. GTE- and cocoa-supplemented diets significantly reduced the amount of lipofuscin in muscles by decreasing both the number of myofibers containing the pigment and the number of its aggregates (Figure 2O–2S). Overall, these

results suggest that flavonoid-enriched diets are able to alleviate the process of skeletal muscle senescence, which is reflected in the reduction of myofiber degeneration. This would result in a decrease in the

amount of newly regenerated myofibers, and in the preservation of SC population due to the decline in the number of these stem cells that engage their myogenic program to replace compromised aged myofibers.

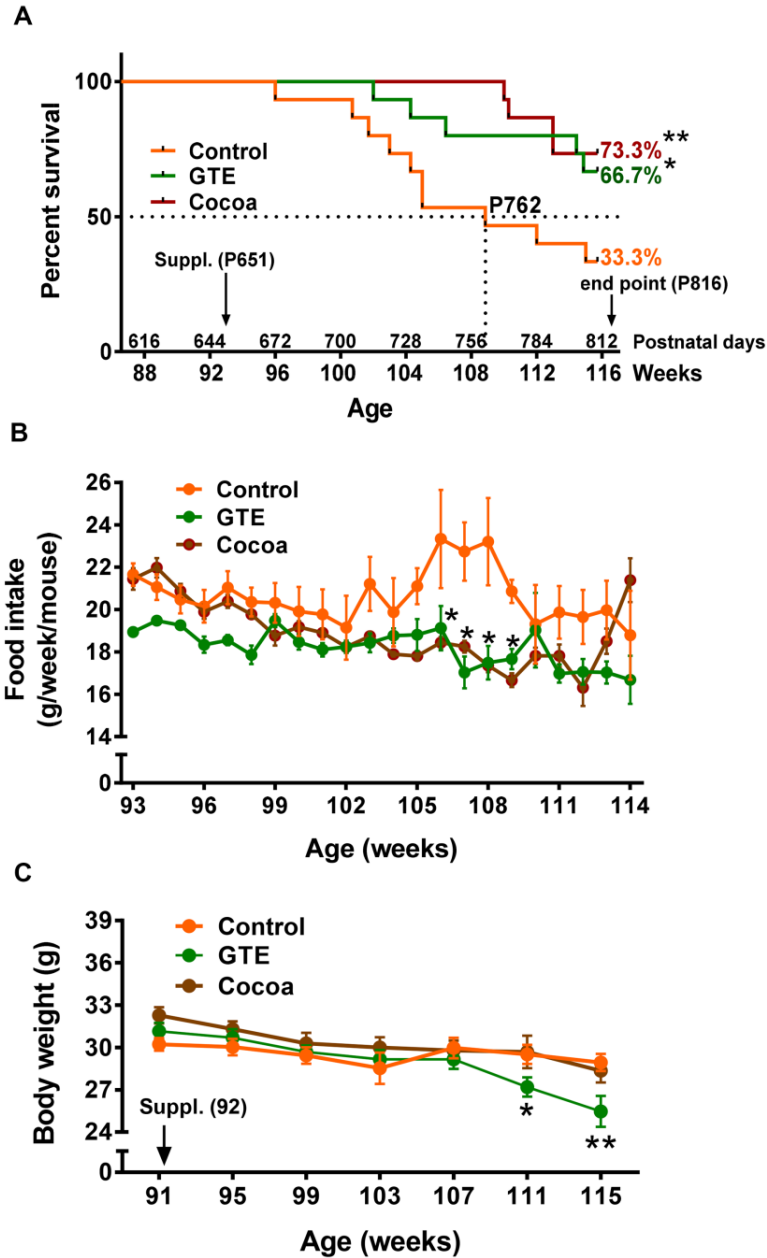


Figure 1. GTE and cocoa supplementations improve mouse survival rate. (A) Survival rate of mice from control, GTE and cocoa groups; the standard (AIN-93M) diet supplemented with either cocoa or GTE significantly increased the percentage of mice that were alive at the endpoint of experiment compared with control animals. (B) Food intake (expressed as g of food per week and mouse) was reduced in animals fed with the GTE- or cocoa-supplemented diets, this reduction being statistically significant in a period ranging from 105-109 weeks of age. (C) Body weight (g) of animals from the three experimental groups; compared to control mice, no significant changes in body weight were found in animals from cocoa group; a significant reduction in weight was, however, observed in GTE-supplemented mice. Data are shown as the mean \pm SEM (number of animals per group: 91 weeks of age, n = 15 in all groups; 107 weeks, control n = 8, GTE n = 13; cocoa n = 15; 114 weeks, control n = 6, GTE n = 12, cocoa n = 11); * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. control (Gehan-Breslow-Wilcoxon test, in (A) and multiple t -test (Bonferroni correction), in (B, C).

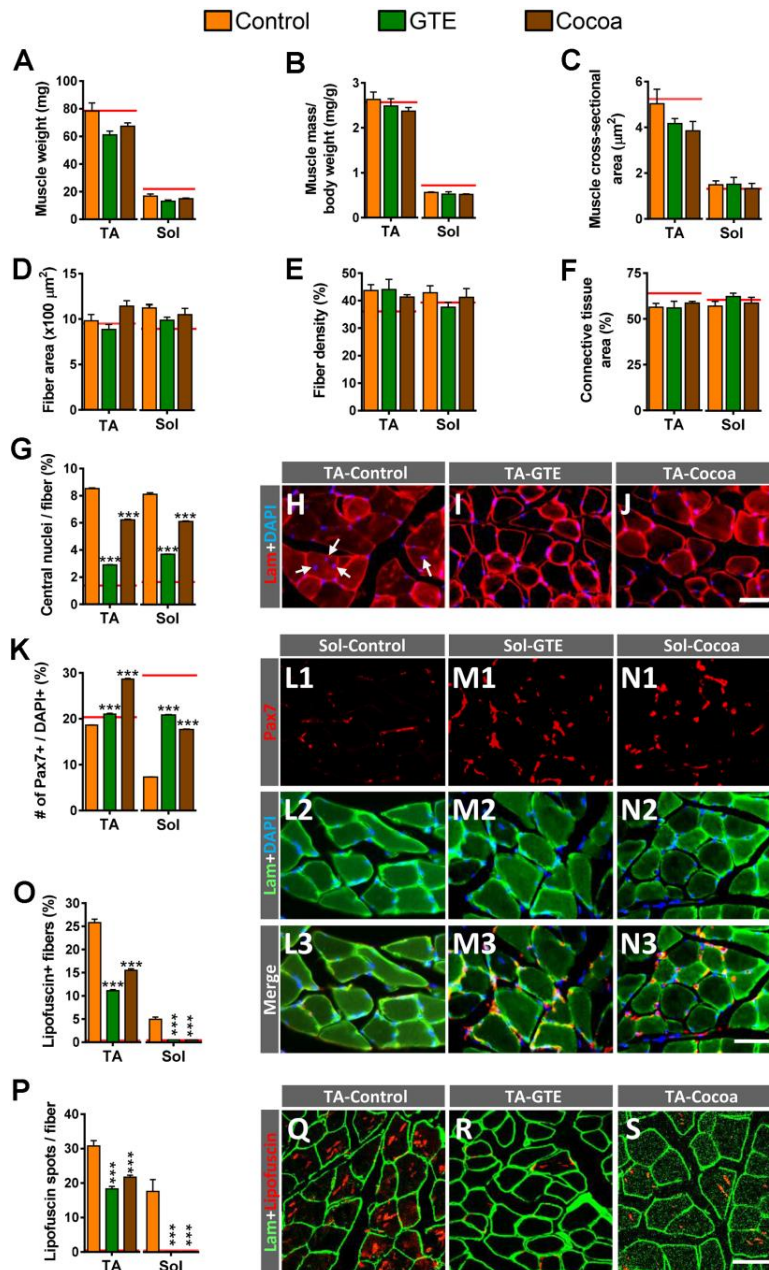


Figure 2. Impact of GTE- and cocoa-supplemented diets on aging-associated changes in TA and Sol muscles of mice. (A–C) Muscle wet weight (in mg, **A**), muscle weight relative to body weight (expressed in mg/g, **B**) and muscle cross-sectional area (in μm^2 , **C**) are shown. (**D**) Average myofiber size (cross-sectional area in μm^2). (**E**, **F**) Density of myofibers (**E**) and muscular content of connective tissue (**F**), expressed as the percentage of area occupied by either myofibers or connective tissue respect to the total cross-sectional muscle area). (**G**) Proportion of myofibers displaying central nuclei. (**H–J**) Representative images of transversal cryosections of TA muscles of control, GTE and cocoa groups (as indicated); sections were double labeled with an antibody against laminin (red) and DAPI (blue) for DNA; arrows in (**H**) indicate central nuclei. (**K**) Percentage of Pax7-immunostained cells (SCs) with respect to DAPI-positive nuclei. (**L1–N3**) Representative images of a combined immunolabeling for Pax7 (red) and laminin (green), and DAPI staining (blue) in transversal cryosections of Sol muscles from control, GTE and cocoa groups, as indicated. (**O**, **P**) Percentage of myofibers containing lipofuscin aggregates (**O**), and average number of lipofuscin granules per myofiber (**P**). (**Q–S**) Representative images of transversal cryosections of TA muscles from control, GTE and cocoa groups (as indicated) immunolabeled for laminin (green); lipofuscin autofluorescence (red) was excited using 510–560 nm excitation and 590 emission filters. Data in graphs are expressed as the mean \pm SEM; the average values of adult muscles found in a previous study [6] were indicated by a red line in each graph for comparative purposes; $***p < 0.001$ vs. control (Ctrl), two-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; sample size per condition: (**A–C**) = 6–12 muscles and (**D–F**) = 3–5 muscles from different mice; (**G**, **K**) = 2500–4000 fibers and (**O**, **P**) = 1200–2200 fibers per muscle from 3–5 animals. Scale bars: 40 μm in (**J**) (valid for **H**, **I**), in **N3** (valid for **L1–N2**) and **S** (valid for **Q**, **R**).

GTE and cocoa flavanols prevent age-associated alterations in skeletal muscle mitochondria

Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-coactivator 1 α (PGC-1 α) is a master regulator of mitochondrial biogenesis and function [57]. PGC-1 α appears to play an important role in muscle by regulating myofiber metabolism, autophagy, and the expression of different components of NMJs [58, 59]. Some studies have shown that PGC-1 α content declines in muscle with normal aging in parallel with the decrease in mitochondrial function [60–62]. To examine whether GTE and cocoa enhance skeletal muscle metabolism via regulation of PGC-1 α , its expression was analyzed by western blotting. Muscle extracts of animals which received either of those supplements resulted in higher levels of PGC-1 α protein compared to controls, but only the GTE group achieved statistical significance (Figure 3A, 3B). To examine whether the increased expression of PGC-1 α in skeletal muscle induced by GTE and cocoa supplementation was linked to the augmented density of mitochondria in myofibers, we performed immunohistochemistry with an anti-ATP5A antibody, used as a mitochondrial marker. ATP5A immunolabeling was analyzed in the fast-twitch

TA muscle, which is predominantly composed of fast myofibers (2A > 2B), which have a glycolytic metabolism and reduced mitochondrial content compared to slow (oxidative) myofibers [6, 63]. Compared to TA muscles of adult mice, those of aged animals showed a significant (~25%) reduction of ATP5A immunostaining in myofibers, indicating that an overt decrease in the number of mitochondria occurs with aging in muscles (ATP5A-immunoreactivity expressed as arbitrary units: adult TA, 94.01 \pm 2.10; aged TA, 72.59 \pm 1.38; p < 0.001, Student's t -test, 100 randomly selected myofibers were analyzed from 4 mice per condition). Muscles of mice fed with either GTE- or cocoa-supplemented diets exhibited significantly higher mitochondrial contents than those of controls (Figure 3C–3F).

GTE- and cocoa-supplemented diets prevent muscle denervation and improve regressive NMJ alterations occurring with aging

Previous studies in rodents have reported that NMJs of skeletal muscles undergo structural and molecular alterations with aging [6, 9, 11, 63–65]. Using the same mouse model, we observed that a significant number of

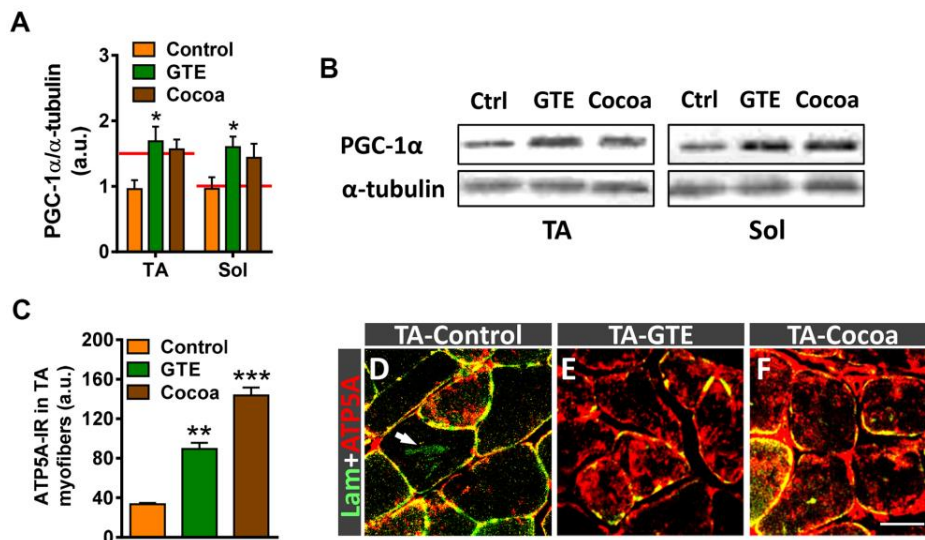


Figure 3. GTE- and cocoa-supplemented diets partially prevent the decrease in PGC-1 α expression and restore mitochondrial depletion occurring in muscles in the course of age. (A) Densitometric analysis of changes in PGC-1 α levels in muscles from the three experimental conditions; data were normalized to α -tubulin. Bars represent the values (mean \pm SEM) of 3 mice per condition from 2 independent western blot analysis; * p < 0.05 vs. control, two-way ANOVA (Bonferroni's post-hoc test); red lines in graph indicate PGC-1 α levels found in adult muscles. (B) Representative western blots of PGC-1 α and α -tubulin (as loading control) proteins in TA and Sol muscles from mice of control (Ctrl), GTE and cocoa groups. (C) Quantification of ATP5A-immunoreactivity in TA muscles of control, GTE and cocoa groups; bars represent the values (mean \pm SEM) of 3 mice per condition; ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. control, one-way ANOVA (Bonferroni's post-hoc test). (D–F) Representative images showing a combined immunolabeling for laminin (Lam, green) and ATP5A (red) in transversal cryosections of TA muscles from three experimental groups used for quantification, as indicated. Note the overt increase in ATP5A immunostaining after GTE (E) and, particularly, cocoa (F) supplementation compared to control (D). Arrow in (D) points out lipofuscin deposition in a myofiber. Scale bar in (F): 50 μ m (valid for D, E).

NMJs of aged hindlimb muscles exhibit overt signs of denervation and polyinnervation, increased branching complexity and sprouting of nerve terminals; additionally, postsynaptic sites display a marked fragmentation of endplates, with numerous scattered acetylcholine receptor (AChR) spots which are associated to neurofilament 68 kDa (NF)-positive and vesicular acetylcholine transporter (VACHT)-positive immunostaining of presynaptic structures. Overall, this pattern differs from that we observed in NMJs from mice at early postnatal ages, in which postsynaptic sites display a more homogeneous and undivided morphology, and nerve branching is highly pleomorphic (not shown). All these changes are indicative of a reactive plasticity and neof ormation of neuromuscular synapses in the course of aging [6]. We wanted to analyze whether these age-associated changes could be prevented with either a GTE- or a cocoa-supplemented diet. The architecture and innervation of NMJs were examined by double immunostaining for NF and synaptic vesicle protein 2 (SV2, for the presynaptic nerve terminal visualization) combined with α -bungarotoxin (α -Bgtx, for the postsynaptic site identification). The two tested diets significantly reduced the proportion of denervated or partially innervated NMJs found in aged muscles, which was accompanied by an increased amount of NMJs exhibiting a higher degree of innervation (Figure 4A); moreover, the proportion of monoinnervated NMJs was significantly increased with polyinnervated NMJs exhibiting either no changes or a significant reduction in number, except for TA muscle of GTE group mice (Figure 4B). In the same line, the amount of motor axons showing terminal sprouting was reduced in muscles from GTE and cocoa groups compared to controls (Figure 4C); this decline, however, did not attain statistical significance possibly due to sample size and variability between animals. Animals fed with either of the two dietary supplements also displayed significantly decreased proportions of fragmented endplates in muscles (Figure 4D). Additionally, muscles from dietary supplemented animals globally exhibited more “healthy” NMJs, as indicated by the increased number of endplates exhibiting a well-defined “pretzel-like” pattern, which contrasted with the less mature and altered appearance of numerous endplates typically found in control muscles (Figure 4E). Some examples of aged TA and Sol NMJs of control, GTE and cocoa groups are shown in Figure 4F1–4K3.

In our previous work [6] we have shown that aging is associated with changes in the expression of different proteins related to development, plasticity and maintenance of NMJs, such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) [66–69], agrin [70], and growth associated protein 43 (GAP-43) [71]. Compared to

young mice, the levels of these synaptic molecules in NMJs markedly decline in adult muscles, but are upregulated in those of aged animals [6]. The potential impact of GTE and cocoa supplementations in the content of CGRP, agrin and GAP-43 in aged muscles was examined. In comparison with control NMJs, those from GTE and cocoa groups exhibited a modest, but non-significant increase in CGRP- and agrin-immunoreactivity (Supplementary Figure 1A–1F3). On the other hand, no significant changes in GAP-43-immunostaining at NMJs were found between the three groups (Supplementary Figure 1G–1I3), although the GAP-43 content in the entire muscles determined by western blotting showed a tendency to be decreased in animals that received the dietary supplementations (Supplementary Figure 1J, 1K).

GTE or cocoa supplements do not prevent the degenerative changes occurring in motor nerves with aging

As previously reported, aging is associated with motor axon degeneration. This can be already noticed in middle-aged mice and include Wallerian-like degenerative changes, myelin spheroidal inclusions, axonal swelling, and reduction of myelin thickness [6, 72]. To analyze whether either GTE- or cocoa-supplemented diets were able to prevent motor nerve degeneration, we examined L4 ventral nerve roots (VRs), which are shaped by the most proximal part of motor axons contributing to the sciatic nerve formation. Neither flavonoids promoted a substantial improvement of structural age-associated motor nerve alterations. No significant changes in the cross-sectional area of VRs, number and diameter (including myelin sheath) of axons, and the proportion of degenerating axons per nerve root were found between the three experimental groups (Supplementary Figure 2A–2F, 2I–2K). We even noticed that, compared with the control group, VRs of animals fed with GTE or cocoa supplements had a higher, although not significant, increase in the number of axons displaying minor signs of degeneration and myelin inclusions. However, roots from cocoa group animals, showed a slightly increase in the number of clusters of small myelinated axons (Supplementary Figure 2G–2K); these could represent immature axons formed by sprouting from healthy ones and suggest the generation of new nerve fibers aimed at replacing those previously degenerated. G-ratio value, as an indicator of the relationship between myelin thickness and axon diameter, did not show significant differences between groups (Supplementary Figure 2L, 2M). However, compared to control VRs, those from GTE and cocoa groups exhibited slightly smaller axonal diameters (excluding the myelin sheath), with values closer to those found in adult mice (Supplementary Figure 2N).

Dietary supplementation with GTE or cocoa flavanols also ameliorates aging-associated alterations in proximal hindlimb muscles

There is evidence that aging affects differentially distinct muscle groups [73–75]. Our previous data [6]

suggest that the degree of muscular wasting with age would be associated not only to muscle location and fiber type composition, but also to specific function and activity of muscles. We have also shown that gracilis (Gra) muscle, which is proximally placed in the hindlimb, exhibited more prominent age-related

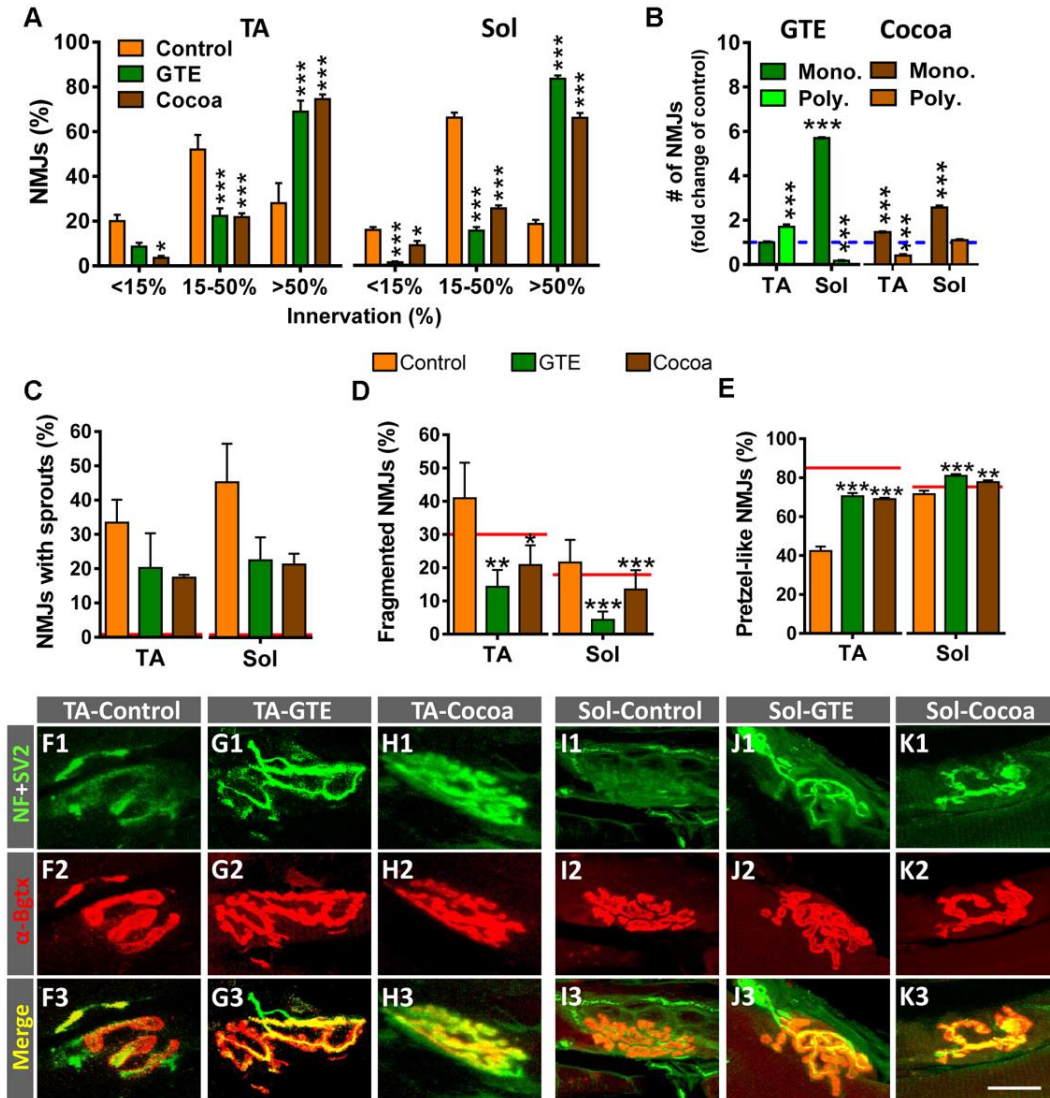


Figure 4. GTE- and cocoa-supplemented diets prevent aging-associated muscle denervation and regressive morphological alterations in NMJs. (A) Proportion of TA and Sol NMJs displaying different degrees of innervation; quantification was based on the percentage of α -Bgtx-labeled postsynaptic site area covered by SV2-immunostained presynaptic terminals (see Materials and Methods, <15% innervation was considered as denervated). (B) Number of NMJs of TA and Sol muscles exhibiting single (mono.) or multiple (poly.) innervation expressed as fold change of control group (blue dashed line). (C–E) Percentage of NMJs showing terminal axonal sprouts (C), fragmented endplates (D) and postsynaptic sites exhibiting a pretzel-like appearance (E, indicative of high degree of synaptic maturity), in TA and Sol muscles of animals from different experimental groups. Bars in graphs represent the mean \pm SEM; sample size: 30-58 (A), and 50-85 (B–E) NMJs per muscle from 3-5 animals per condition; * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 vs. control, one or two-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; red lines in (C–E) indicate values in adult mice previously reported [6]. (F1–K3) Representative maximal projections of confocal stacks of NMJs of TA (F1–H3) and Sol (I1–K3) from mice of control, GTE and cocoa groups (as indicated in panels); muscle sections were stained with antibodies against NF and SV2 (green, for presynaptic nerve terminals), and α -Bgtx (red, for postsynaptic AChR). Scale bar in K3 = 20 μ m (valid for F1–K2).

alterations than distal leg muscles. The effects of GTE- and cocoa-enriched diets were then examined in this proximal muscle. We found that compared to control group, Gra muscles from GTE and cocoa groups displayed significant increased density of Pax7-positive SCs, and reduced proportions of myofibers exhibiting lipofuscin contents (GTE) and decreased numbers of lipofuscin aggregates per myofiber (GTE and cocoa) (Supplementary Figure 3A–3G). Furthermore, Gra muscles from GTE and cocoa groups had a significant reduction in the number of denervated and partially innervated NMJs and an increase in the proportion of those showing a single innervation with respect to control counterparts (Supplementary Figure 4A–E3).

Effects of dietary supplementations with GTE and cocoa flavanols on MN synaptic afferents of old mice

We and others have reported that aging is accompanied by a significant depletion of afferent inputs to MNs [6, 76, 77]. Thus, with age, MNs suffer a loss of excitatory cholinergic and glutamatergic inputs, with no overt changes in the density of inhibitory GABAergic afferent synapses. We examined then whether supplementations with GTE or cocoa flavanols were able to prevent the process of aging-associated MN deafferentation. Spinal cord sections from old mice were immunostained with antibodies against VACHT, vesicular glutamate transporter 1 (VGluT1) and vesicular glutamate transporter 2 (VGluT2) (for cholinergic [C-boutons] and glutamatergic excitatory synapses, respectively), and the number and size of labeled synaptic puncta on MN somata were analyzed. We found that, in comparison with MNs of control mice, those of animals that received GTE-, but not cocoa-, supplementation exhibited significantly higher density and larger area of cholinergic synaptic terminals (Figure 5A, 5B, 5G1–5I2), and significantly increased density of VGluT2-positive synapses (Figure 5E, 5F, 5M1–5O2). Conversely, a significant increase in the density of VGluT1-positive synapses was observed on MNs of cocoa group animals; MNs of GTE group mice, however, exhibited no significant changes in the number of VGluT1-contacting boutons with respect to those on control MNs, although VGluT1 synapses on the GTE group MNs showed a significant increased size (Figure 5C, 5D, 5J1–5L2).

Cholinergic C-bouton, VACHT-positive, inputs to MNs arise from small clusters of cholinergic interneurons which express the paired transcription factor *Pitx2* and are distributed in a longitudinal column near the central canal of lumbar spinal cord [78]. Due to their cholinergic phenotype, these interneurons, referred to as V0_C interneurons, can be

labeled with antibodies against choline acetyltransferase (ChAT) or VACHT (Figure 6A1, 6A2). In lumbar spinal cord sections of adult and old mice we counted the number of VACHT-immunolabeled V0_C interneurons in an area of 0.1 mm² around the central canal. In comparison with adult mice, aged animals exhibited a prominent tendency to reduce (~30%) the density of V0_C interneurons (adult: 5.2 ± 0.4, old: 3.6 ± 0.6 [mean ± SEM]; n = 4 animals per group, *p* = 0.07, Student's *t*-test). The decline in the number of V0_C interneurons found with aging correlates with the reduction in C-bouton density observed on aged MNs, suggesting that cholinergic deafferentation of MNs is, at least in part, due to the loss of V0_C interneurons. Since GTE prevented the loss of C-boutons on MNs, we examined whether this supplement was able to prevent the aging-associated decline of V0_C cells and found that mice fed with GTE-enriched diet exhibited significant higher density of such interneuron population compared to control animals (Figure 6B–6E2). Thus, the beneficial action of GTE on C-bouton synapse stabilization is in concordance with its capacity to preclude V0_C interneuron loss.

Impact of dietary supplementations with GTE and cocoa flavanols on age-related gliosis in ventral horn spinal cord of old mice

We have previously reported that, in parallel with central synapse loss, a prominent gliosis occurs in the spinal cord ventral horn of old mice, suggestive that aging is accompanied by a neuroinflammatory response around MNs [6]. Glia, particularly microglia, appear to play a major role in synapse elimination during development and in pathological conditions; moreover, glia can indirectly alter synaptic function throughout the release of pro-inflammatory mediators (recently reviewed by [79]). We wanted to examine whether a diet supplemented with either GTE or cocoa flavanols is able to prevent aging-associated microgliosis in spinal cord. Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1)-immunoreactivity, used as a specific marker for microglia, was analyzed in ventral horn. Compared to control mice, a moderate, although significant, reduction in Iba1-immunolabeling was noticed in spinal cords of GTE group mice, but not in those of cocoa group (Figure 7A, 7B1–7D2). Aging-associated spinal cord neuroinflammation is accompanied by structural changes in microglial cells, which exhibit increased morphological complexity and branching degree [6]. By using the skeleton approach [80], we analyzed and compare microglia morphology in aged animals of the three experimental groups and found no differences between them. Thus, our flavonoid-enriched diets do

not to promote any overt changes in microglial complexity (Supplementary Figure 5A, 5F3).

Microglia are plastic cells which can be activated to produce detrimental (cytotoxic) or beneficial (neuroprotective) effects on neurons [81, 82]. Thus, microglia can be categorized into two opposite

phenotypes M1 and M2; whereas M1 are proinflammatory cell types, M2 play a role as down-regulators of inflammation. We have shown that age-related reactive microgliosis in spinal cord entails an imbalance in M1/M2 phenotypes, which leads to a polarization to harmful activated M1 state [6]. To examine whether the supplemented diets tested here

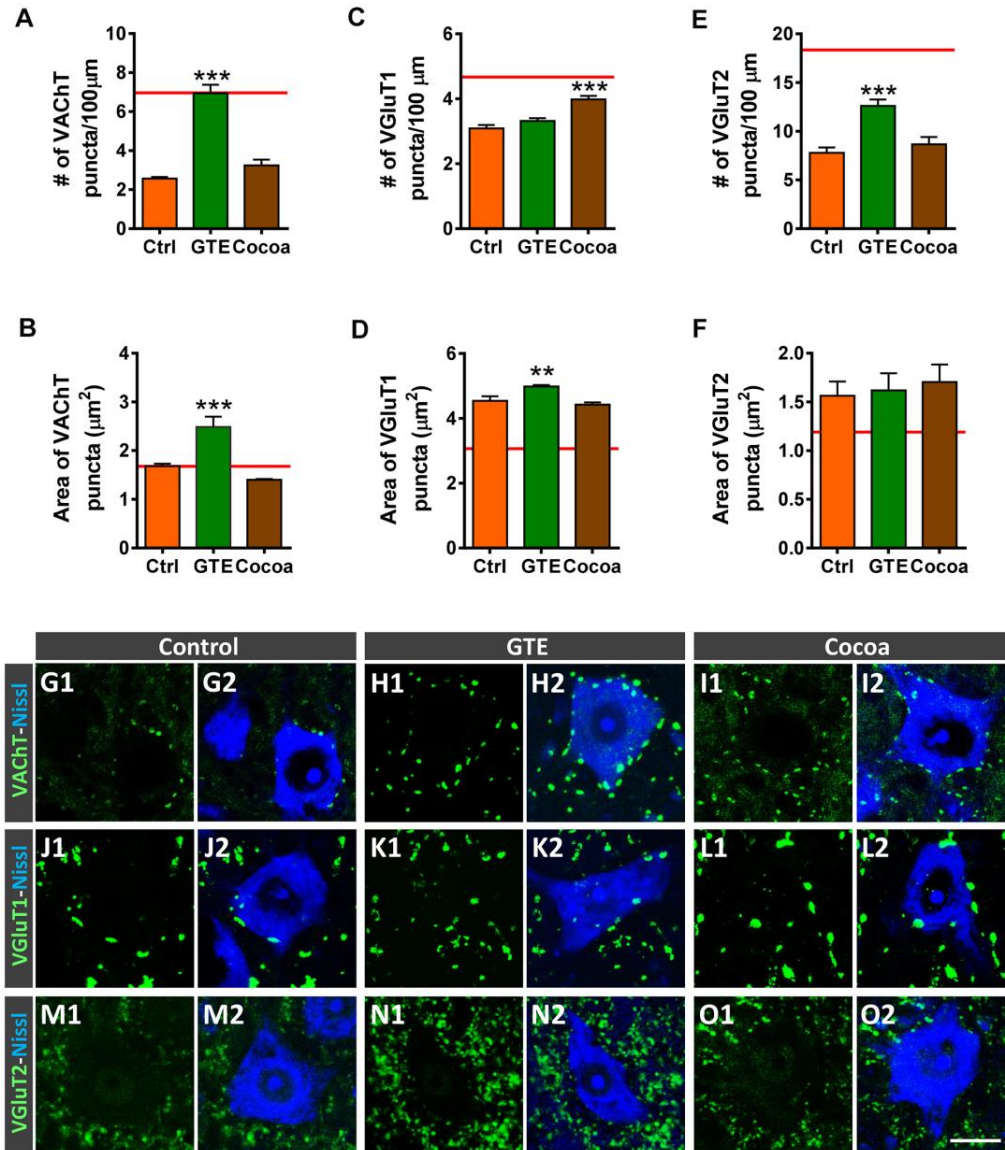


Figure 5. Effects of GTE- and cocoa-supplemented diets on excitatory cholinergic (VAcHT-positive) and glutamatergic (VGluT1 and VGluT2) synaptic inputs to aged spinal MNs. (A–F) Graphs show the average density (number of puncta per 100 μm of MN soma perimeter, A, C, E) and size (in μm^2 , B, D, F) of the different types of afferent synapses examined; the red dashed line in each graph indicates the mean value of the corresponding afferent synapse density or size found in adult mice [6]. (G1–O2) Representative confocal micrographs of VAcHT, VGluT1 and VGluT2 nerve terminals contacting MN cell bodies of animals from control, GTE and cocoa groups, as indicated. Spinal cord sections were immunolabeled for either VAcHT, VGluT1 or VGluT2 (green), and counterstained with fluorescent Nissl staining (blue) to visualize MN cell bodies, as indicated in panels. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. control (one-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test); 50–60 MNs were analyzed per animal (number of animals per group: control = 3, GTE = 4; and cocoa = 5). Scale bar in O2 = 20 μm (valid for G1–O1).

were able to modulate this microglial phenotype activation, Iba1 immunohistochemistry was combined with either Mac-2 or macrophage mannose receptor (CD206) immunolabeling for M1 or M2 microglia, respectively [82–84]. No overt changes were found in

Mac-2-immunolabeled (M1) microglia in GTE and cocoa groups when compared with control group (Figure 7E–7I4). However, in comparison with the latter, we found that spinal cords of the GTE group exhibited a significant higher density of beneficial

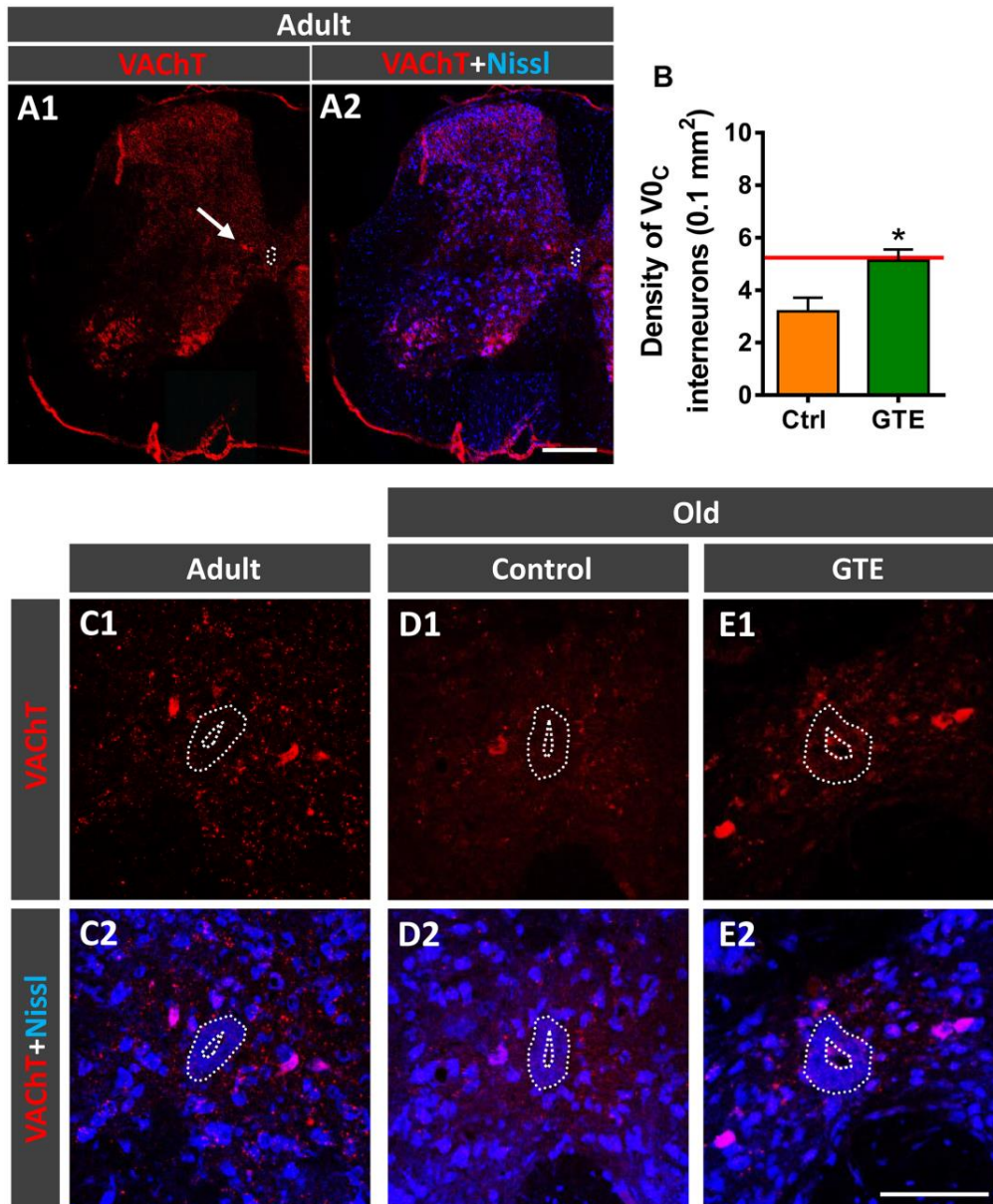


Figure 6. GTE-supplemented diet prevents the age-related loss of V0c interneurons. (A1, A2) A general view of a spinal cord hemisection of an adult mouse immunolabeled for VACHT (red) and counterstained with fluorescent Nissl (blue) for neuron identification; the arrow points to a V0c interneuron cluster located near the central canal (delimited by a dotted line); note also the different VACHT-positive MN pools in the ventral horn. (B) Density of V0c interneurons in spinal cords of aged animals from control and GTE groups; bars represent the mean \pm SEM of 3-5 animals (20-28 images) per condition; * p < 0.05 vs. control (Student's t-test); the red line indicates the mean value in adult mice found in [6]. (C1–F2) Representative confocal micrographs of VACHT-positive V0c interneurons (red) in the spinal cords of an adult mouse (C1, C2) and of old animals fed with the control (D1, D2) and GTE-supplemented diet (E1, E2); sections were counterstained with fluorescent Nissl (blue) for neuron visualization; the central canal is delimited by dotted lines. Scale bars: in A2 = 200 μ m (valid for A1), and in E2 = 100 μ m (valid for C1–E1).

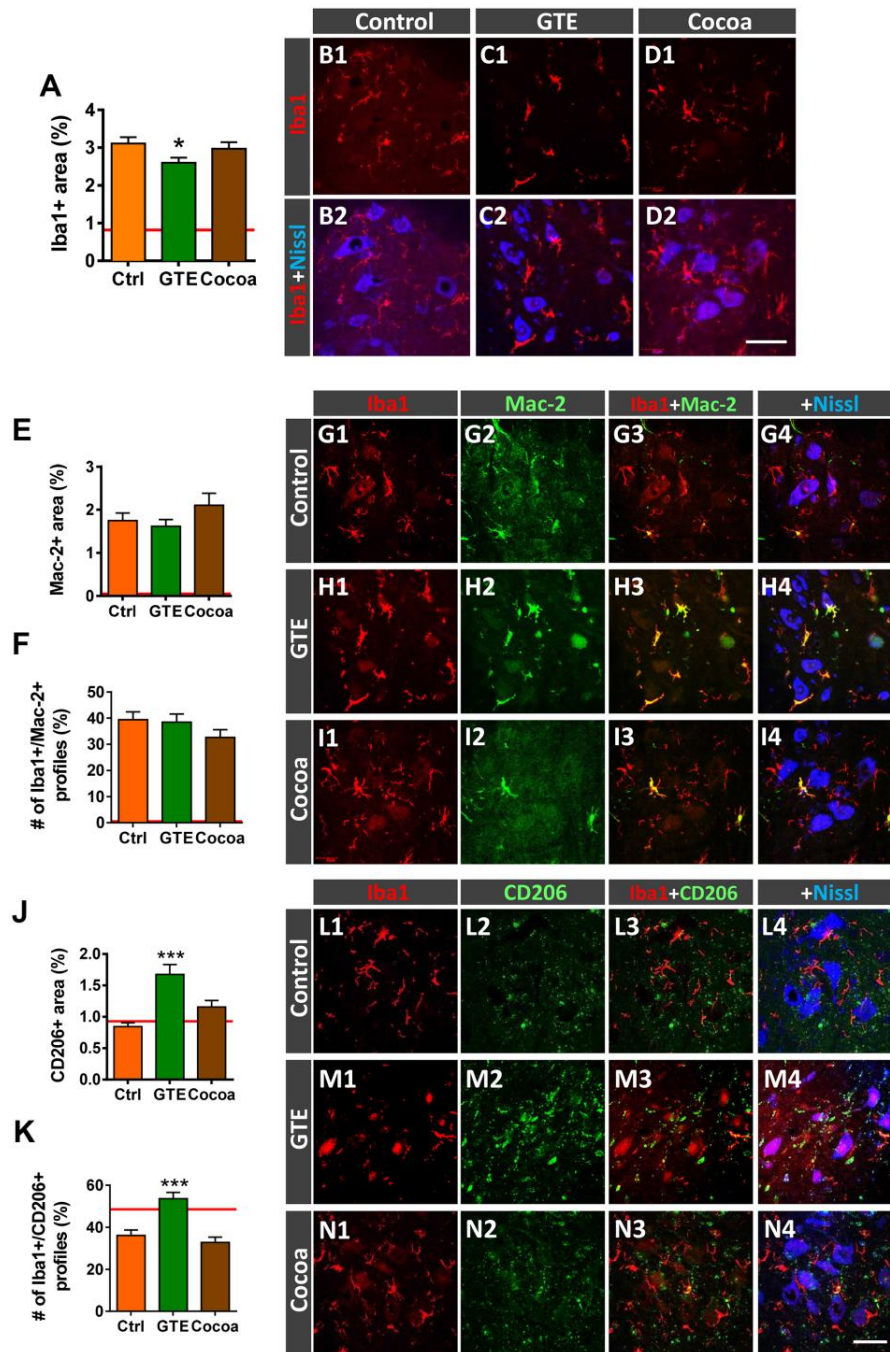


Figure 7. Impact of GTE- and cocoa-supplemented diets on the aging-associated microgliosis and imbalance in M1/M2 microglial phenotypes found in the ventral horn spinal cord of old mice. Lumbar spinal cord sections were immunostained for the microglial marker Iba1 (red), and either Mac-2 or CD206 (green), for M1 or M2 microglia, respectively; fluorescent Nissl staining (blue) was used for MN visualization. (A) Quantification of microglia expressed as the percentage of ventral horn occupied by Iba1-positive profiles. (B1–D2) Representative confocal images showing Iba1-staining around spinal cord MNs of animals from control, GTE and cocoa groups as indicated in panels. (E, F, J, K) Quantification of Mac-2-positive (E) and CD206-positive (J) profiles surrounding MNs shown as the percentage of ventral horn area occupied by the immunostained profiles; the proportion of microglial profiles expressing both Iba1 and either Mac-2 (F) or CD206 (K) is also shown. The average values of these parameters in adult mice from our previous study [6] are indicated in each graph (red lines) for comparison purposes. (G1–I4, L1–N4) Representative confocal micrographs used for data analysis showing Mac-2 (G1–I4) and CD206 (L1–N4) in combination with Iba1 and fluorescent Nissl staining, as indicated in panels. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM; a total of 45-50 images per experimental group were analyzed (number of animals per group: control [Ctrl] = 3, GTE = 4, cocoa = 5); * p < 0.05 and *** p < 0.001 vs. Ctrl (one-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test). Scale bar in N4 = 50 μ m (valid for B1–D1, G1–I4, L1–N3).

CD206-positive, M2, microglia around spinal MNs; this change was not found in animals that received a dietary supplementation with cocoa flavanols (Figure 7J–7N4). To further study the impact of our flavonoid-supplemented diets on modulating microglia, we examine the expression of the G-protein-coupled purinergic receptor P2Y12R in ventral horn. P2Y12R is exclusively expressed in microglia and allows to distinguish these cells from infiltrating monocytes and other peripheral macrophages [85–87]. P2Y12R has been shown to be increased during anti-inflammatory conditions and is considered as a marker for M2-like microglia [88, 89]. Spinal cord sections were double immunolabeled for Iba1 and P2Y12R, and the number and density of Iba1-positive profiles exhibiting P2Y12R positivity were analyzed in ventral horn. Compared to control spinal cords, those of animals fed with the GTE-, but not cocoa-, supplemented diet displayed a significantly higher amount of Iba1-positive profiles also expressing P2Y12R (Figure 8A, 8C1–8E4). Additionally, we noticed that whereas in the vast majority of control microglial profiles P2Y12R exhibited a cytoplasmic expression, in those of GTE group, P2Y12R-immunoreactivity is mainly located in the nucleus (Figure 8B, 8F1, 8F2), as previously reported to occur for M2 phenotype [90]. Overall, these findings indicate that age-associated reactive microgliosis can be potentially modulated to M2 neuro-protective phenotype by GTE.

Activated microglia undergo changes in the expression of the cluster differentiation 68 (CD68) protein, a member of the lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotein (LAMP) that regulates phagocytosis in macrophage lineage cells. CD68 is present in lysosomes and is commonly considered a marker of activated phagocytic microglia [91]. Resting mouse microglia exhibit some basal expression of CD68, which is prominently upregulated after activation [92]. Double immunohistochemistry for CD68 and Iba1 in spinal cords of adult and old mice revealed that virtually all CD68-positive profiles are located inside Iba1-immunolabeled cells. Interestingly, compared with adult spinal cords, those of aged mice exhibited a significant increase in CD68-expression in microglial cells located around MNs, as revealed by the percentage of ventral horn area occupied by CD68-positive profiles (adult mice: 3.12 ± 0.63 %, $n = 4$; old mice: 18.85 ± 1.58 %, $n = 5$; $p < 0.0001$, Student's *t*-test). Moreover, individual Iba1-immunolabeled microglial cells of aged mice exhibited significant larger CD68-positive puncta than those of adult animals (area of CD-68-positive profiles: adult mice, 2.85 ± 0.24 μm^2 , $n = 4$; old mice, 10.71 ± 0.69 μm^2 , $n = 5$; $p < 0.0001$, Student's *t*-test; 60 CD68-stained profiles per animal were analyzed). These data indicate that

microgliosis observed in the spinal cord in the course of aging is associated with a prominent increase in activated phagocytic microglial cells. Whereas no changes in the density of CD68-positive microglial cells were found in ventral horns of GTE-supplemented aged mice, the number of those profiles surrounding MNs was found significantly reduced in animals from cocoa group compared to controls (Figure 9A–9E4). This indicates that cocoa-, but not GTE-, flavonoids are able to prevent the activation of microglia and their increased phagocytic activity in the course of aging.

Changes in age-related alterations of DRG sensory neurons induced by either GTE- or cocoa-supplementation intake

We have reported that aging is associated with changes in nociceptive (CGRP-positive and *Bandeiraea simplicifolia* lectin [isolectin B₄, IB4]-positive) and proprioceptive (parvalbumin [PV]-positive) DRG neurons [6]. Thus, we have shown that L4 DRGs of aged mice exhibited increased proportions of sensory neurons expressing CGRP and PV, and stained with IB4. These changes have been found to be accompanied by a marked atrophy of cell bodies of all those neuronal populations. Here, we analyzed the effects of GTE and cocoa-flavanols on these age-related sensory neuron alterations. We found that, compared to control group, DRGs of GTE- or cocoa-supplemented animals displayed a significant decrease in the number of CGRP-positive and IB4-positive neurons; additionally, cocoa, but not GTE, promoted a significant enlargement of soma size of those neuronal populations. Moreover, cocoa, but not GTE intake, also significantly reduced the number, although increased soma size of PV-positive neurons (Supplementary Figure 6A–6O2).

GTE and cocoa flavanols do not impact locomotor activity decline or electromyographical changes found to occur with aging

The effects of GTE or cocoa supplementation on aging-related motor decline were examined using open-field and pen tests. In a previous study [6], we have shown that aging results in a gradual reduction in the locomotor activity, as measured after the automated recording of mouse movements using the open-field test. We found that neither GTE nor cocoa supplementation improved the impaired motor performance of old mice assessed with this test; in fact, motor activity, measured by open-field test, was even noticed to be slightly (although not significantly) reduced at the end of the experimental period in animals fed with any of the two tested supplemented diets (Supplementary Figure 7A, 7B). Additionally, compared to control diet, neither GTE nor cocoa

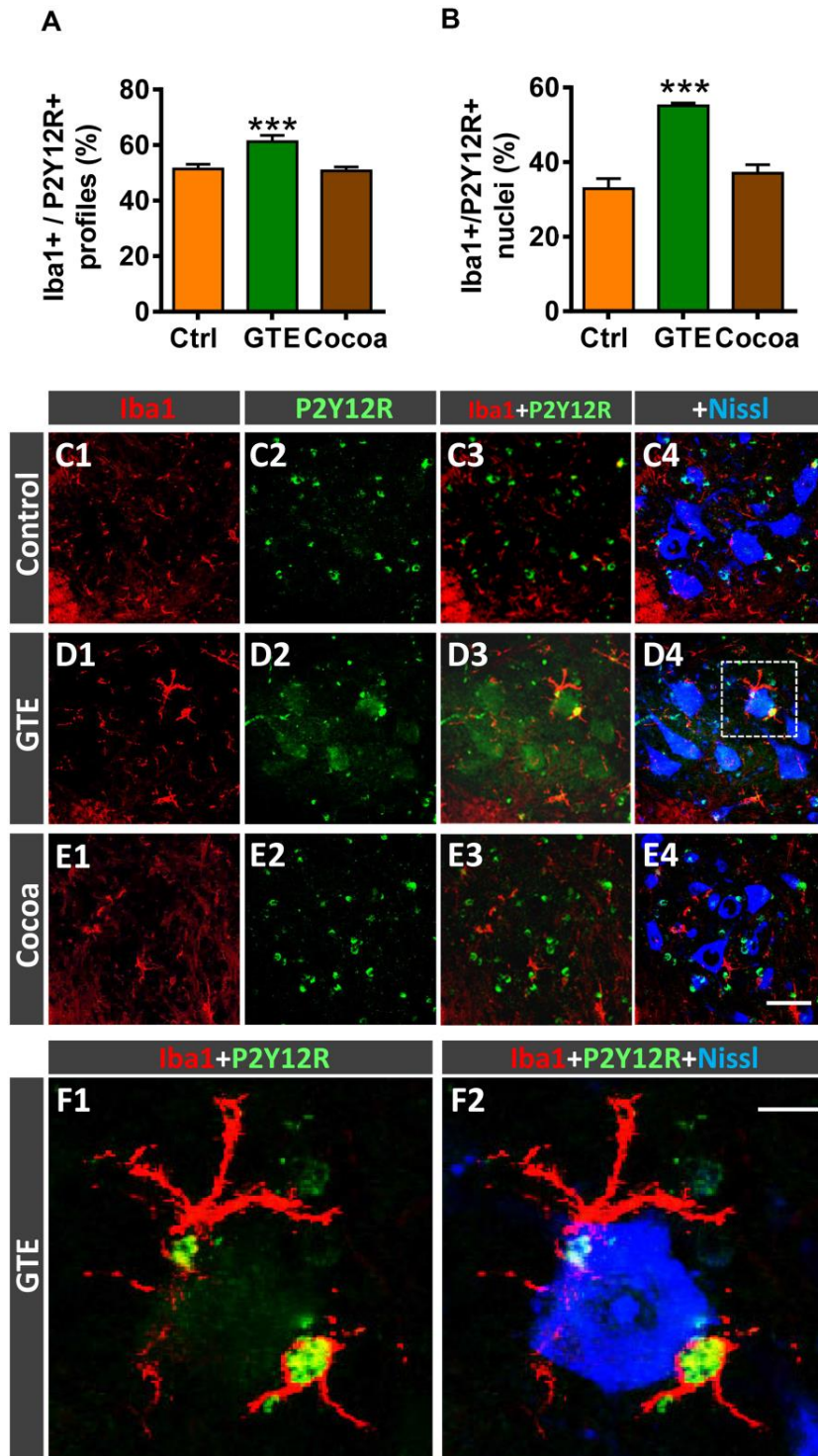


Figure 8. Impact of GTE- and cocoa-supplemented diets on P2Y12R expression in spinal cord microglia of old mice. Sections of lumbar spinal cords from mice of different experimental groups were double immunostained for Iba1 and P2Y12R. (A, B) Quantification of Iba1-positive profiles also exhibiting P2Y12R immunoreactivity (A) and of those displaying nuclear P2Y12R expression (B). (C1–F2) Representative confocal micrographs used for data analysis showing P2Y12R (green) in combination with Iba1 (red) and fluorescent Nissl staining (blue, for MN visualization), as indicated in panels. A higher magnification of area delimited by the dashed square in D4 is shown in (F1, F2). Note the nuclear expression of P2Y12R in Iba1-positive microglial cells in close contact with a MN. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM; a total of 40-50 images per experimental group were analyzed (number of animals per group: control [Ctrl] = 3, GTE = 4, cocoa = 5); *** p < 0.001 vs. Ctrl (one-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test). Scale bar: 50 μ m in (E4) (valid for C1–E3) and 10 μ m in (F2) (valid for F1).

supplementation modified the parameters of pen test performance observed in old mice (not shown).

We have previously demonstrated that aging in mice is accompanied by noticeable electrophysiological changes in form of significant reduction in nerve conduction velocity and compound muscle action potential (CMAP) amplitude and, also, by a mild decrease in functional motor unit number [6]. We examined whether GTE or cocoa supplemented diets were able to improve the age-related alterations in such electrophysiological parameters. Neither green tea extract nor cocoa intake induced any significant change in either the CMAP latency or CMAP amplitude found in old animals (Supplementary Table 1). The

excitability of the H reflex circuit was not significantly different, although the cocoa group had a lower H/M amplitude ratio closer to normal young adult values. It is of interest to note that the motor unit number estimation (MUNE) test gave a slight increase in the number of motor units in the TA muscle of both supplement groups compared with the control old group, which is in agreement with the results of NMJ innervation detailed above.

DISCUSSION

To evaluate nutritional ingredients that can mitigate sarcopenia progression, we tested the effects of two-flavonoid enriched plant extracts, green tea catechins or

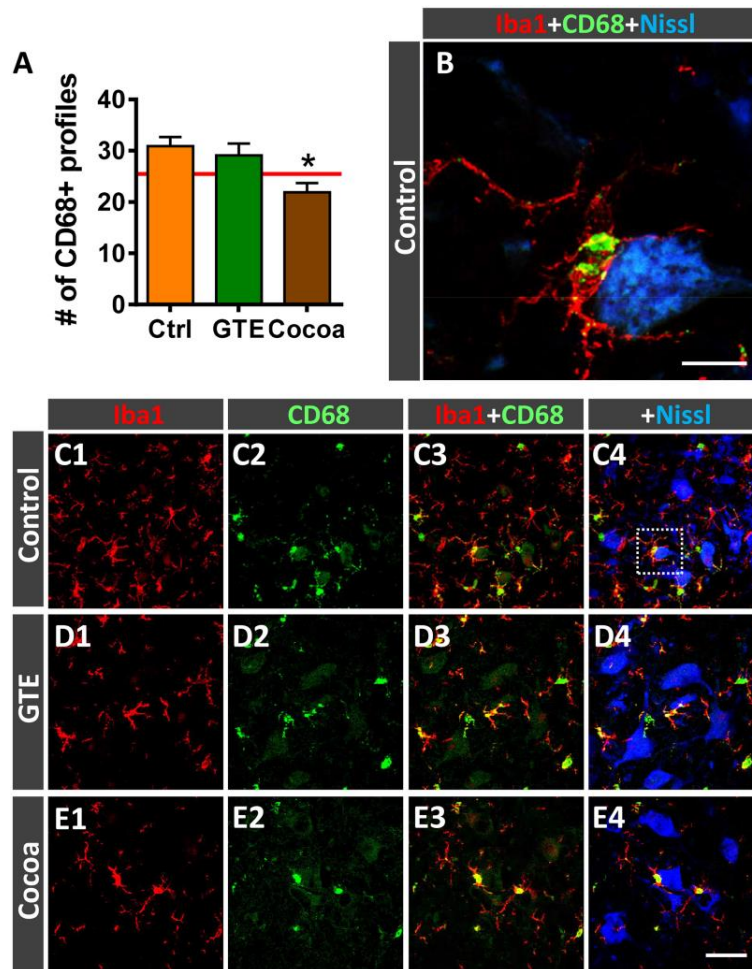


Figure 9. Impact of GTE- and cocoa-supplemented diets on microglial activation in ventral horn spinal cord of old mice. Sections of lumbar spinal cords from mice of different experimental groups were double immunostained for Iba1 and CD68, a marker of activated phagocytic microglia. **(A)** Quantification of CD68-positive profiles around MNs in control, GTE and cocoa groups. **(B–E4)** Representative confocal micrographs used for data analysis showing CD68 (green) in combination with Iba1 (red) and fluorescent Nissl staining (blue, for MN visualization), as indicated in panels. A higher magnification of area delimited by the dashed square in **C4** is shown in **(B)**. Data in the graph are expressed as the mean \pm SEM; a total of 40-50 images per experimental group were analyzed (number of animals per group: control [Ctrl] = 3, GTE = 4, cocoa = 5). * $p < 0.05$ vs. Ctrl (one-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test). Scale bar: 10 μ m in **(C)** and 50 μ m in **(E4)** (valid for **C1–E3**).

cocoa flavanols. Besides their potential benefits on aged muscles, the impact of these dietary supplements on aging-associated alterations in other constituents of the neuromuscular system was also examined. Our results indicate that GTE- and cocoa-flavonoid intake may ameliorate some aging-related neuromuscular regressive phenomena occurring in mice by: *a*) preventing MN deafferentation; *b*) elevating the proportion of anti-inflammatory microglial phenotypes, found to be reduced in the aged spinal cord; *c*) improving the degree of muscle innervation and NMJ maturity; and *d*) delaying some potential harmful aging-related changes in skeletal muscles.

Although GTE or cocoa supplementations are able to increase the survival rate of mice, we did not notice a significant impact on the motor activity decline or on the explored electrophysiological alterations associated with senescence. These results contrast with those from previous studies showing benefits of GTE catechins or cocoa flavanols on physical activity and muscle function in rat and mouse models of muscle dysfunction. In aged rats, GTE has been reported to improve muscle function after reloading following disuse [36]. In a murine model of accelerating aging, GTE catechins along with habitual exercise have been shown to suppress the aging-related decline of physical performance [34]. Other studies have revealed that GTE and its major catechin EGCg improve muscle function and endurance capacity in mouse models of Duchenne muscular dystrophy [30, 31]. The disparity between these and our results could be explained by differences in the animal models, and tests used to evaluate motor behavior and muscle function. Moreover, it is reasonable to assume that the tests used in the present study to assess motor phenotype of mice, although allow us to detect an age-related decline in muscle function [6] are not sensitive enough to detect subtle improvements in motor activity promoted by the dietary intervention. On the other hand, a previous study has shown that the cocoa flavanol-epicatechin could improve the age-associated decline of physical activity in mice [46]. However, this intervention was carried out for a longer length of time (~9 months) than our study, and the dose of epicatechin is much higher than that delivered in the present work. It is possible that higher doses of cocoa flavanols and longer intervention periods may be needed to impact motor output. Nevertheless, our study identified positive structural changes in the neuromuscular system as well as in muscle regenerative and energy pathways, a harbinger of positive impact of our tested compounds on the muscle.

Effects of green tea- and cocoa-enriched diets in skeletal muscles of aged mice

In the present study, we did not observe an effect of GTE or cocoa flavanol supplementations on mass, fiber size

and density, or connective tissue content of aged muscles. Nevertheless, both dietary supplements significantly: *a*) prevented the age-associated decline of SC numbers [6, 93, 94]; *b*) reduced the density of fibers with central nuclei (taken as an indicator of a degenerative/regenerative process of muscles [6, 11, 49, 95]); and *c*) attenuated the accumulation of the age pigment lipofuscin in myofibers [6]. SCs are essential for skeletal muscle regeneration [96–98], and the age-associated decline in number and function of SCs negatively affects the capacity to replace and/or repair damaged myofibers (reviewed by [53, 99]). However, although SCs are crucial for the genesis of new fibers during the regenerative process of the aged muscle, they do not seem to have any impact on fiber size during aging [100]. This is in agreement with the absence of significant changes in the cross-sectional area of myofibers we found in flavonoid-supplemented animals, despite the increased proportion of SCs noticed in muscles. Previous studies have shown that caloric restriction is able to preclude the age-related loss of myofibers [11] and to enhance SC function and muscle repair [20]. This indicates that metabolic factors are critical in the regulation of myofiber turnover and myogenic activity of SCs. The beneficial effects of caloric restriction on aged muscles appear to be associated to the enhancement of mitochondrial biogenesis and oxygen consumption resulting from this dietary intervention [20]. On the other hand, EGCg has been reported to significantly promote SC proliferation and differentiation in muscles of senescent rats after muscle disuse recovery [35, 36]. This action, which appears to be mainly mediated by oxidative stress inhibition, is able to attenuate the muscle mass loss but fails to improve muscle recovery during reloading following inactivity [36]. EGCg has also been shown to promote SC activation in aged mice and humans, although this effect has been mainly ascribed to the reduction of myostatin levels induced by the compound [101]. Here, we confirm the efficacy of GTE in maintaining the SC population in aged mice and also provide evidence that cocoa flavanols have a similar impact on preventing age-related SC loss. The benefits of these flavonoids on aged muscles could be a consequence of the enhancement and acceleration of myofiber turnover and repair, which would be facilitated by the increased SC proliferation, as reported previously for green tea catechins [99]. Nevertheless, the possibility that our dietary supplements promote a beneficial action by slowing down the aging process of muscles and, in this way, diminishing the number of SCs used for muscle regeneration, cannot be excluded. Indeed, aged muscles of animals that received the flavonoids, exhibited a significant increase in the proportion of apparent younger myofibers, with reduced lipofuscin deposition and decreased frequency of centrally located nuclei.

Due to the reported antioxidant activities of flavonoids [22, 43, 102], it is tempting to ascribe the muscular benefits of GTE and cocoa flavanols to their protective effects against reactive oxygen species. Reactive oxygen species are by-products of mitochondrial oxidative phosphorylation, which are increased in aging muscles due to mitochondrial dysfunction [60]. On the other hand, mitochondria play a crucial role in the regulation of apoptosis in the senescent muscle [103, 104]. Thus, age-related mitochondrial dysregulation appears to be a critical factor contributing to muscle wasting in the elderly [105, 106]. PGC-1 α is considered an essential transcription factor in the mitochondrial biogenesis and function [57], and its overexpression has been reported to increase mitochondrial mass [107]. Additionally, PGC-1 α is also critical in regulating numerous genes involved in muscle morphology and function throughout its interactions with signaling pathways that control mitochondria homeostasis and protein balance [108]. PGC-1 α content and activity have been shown to be reduced in aged muscles, although these findings are not free from certain controversy (reviewed by [108]). Redox regulation is an important mechanism in controlling PGC-1 α activity. Indeed, reactive oxygen species could negatively regulate PGC-1 α in aged skeletal muscle, as reported in cardiac myocytes [109]. On the other hand, there is evidence that PGC-1 α is able to activate the expression of endogenous antioxidant proteins (including superoxide dismutase and glutathione peroxidase), exert anti-inflammatory effects, promote neovascularization, and protect the senescent muscle from increased degradative processes such as proteolysis, autophagy and apoptosis [110–112]. Chronic physical training increases the levels of PGC-1 α in the skeletal muscle [113–115]. Here, we found that animals fed with either GTE- or cocoa flavanols exhibited increased muscular content of PGC-1 α compared to controls. The augmented levels of PGC-1 α after either of the two diets tested were observed in both TA (fast) and Sol (slow) muscles, although the effects on this transcription factor expression were slightly more prominent with GTE than with cocoa supplementation. In fact, we did not find statistically significant changes in the muscular content of PGC-1 α between control and cocoa group, although latter exhibited a remarkable increased expression of the transcription factor in both TA and Sol muscles. As aforementioned, reductions in PGC-1 α expression impairs mitochondrial dynamics, structure and function in muscles [105]. Although a number of metabolic regulators besides PGC-1 α could be involved in the maintenance of mitochondrial homeostasis, our results suggest that the beneficial effect of GTE and cocoa supplementation on mitochondrial content in aged muscles could be due, at least in part, to their capacity of restoring PGC-1 α levels.

Effects of green tea- and cocoa-enriched diets in neuromuscular junctions of aged mice

Aging is accompanied by structural and molecular changes at NMJs (reviewed by [5]). Although it is not yet clear whether these are a consequence of progressive aged-related alterations in either MNs or muscle fibers, it has been unambiguously demonstrated that an important proportion of NMJs in murine models of aging exhibit signs of partial or complete denervation, and changes compatible with structural remodeling [6, 9, 11, 63–65]. Here we found that some alterations in aged NMJs of mice could be mitigated by any of the two flavonoids-enriched diets tested. Indeed, compared to controls, muscles from animals fed with either GTE- or cocoa flavanol-supplements displayed a significant reduction in the proportion of denervated or partially innervated NMJs. Moreover, we also noticed that muscles of GTE and cocoa groups showed a significant decline in the number of fragmented endplates, and increased amounts of them exhibiting a pretzel-like appearance, indicative of a higher degree of NMJ maturity. Nevertheless, it is necessary to take into account that, compared to mouse NMJs, those from humans are structurally more stable across the entire adult lifespan, showing scarce signs of degeneration or remodeling with age [116]. This aspect must be taken into consideration regarding the applicability to our results to humans.

These improvements promoted by the dietary supplements in age-related NMJ alterations were not accompanied by significant changes in the expression of CGRP, GAP-43, or agrin, three developmentally regulated molecules involved in NMJ development, maintenance and plasticity. All them are synthesized in MN cell bodies, axonally transported and released at nerve terminals. CGRP is a neuropeptide which is highly expressed in NMJs during development, decreases its content with synaptic maturation, but is upregulated during nerve sprouting and muscle reinnervation [66–69]. Agrin, throughout the clustering of AChRs, plays an essential role in the initiation of NMJ formation, and later in the maintenance and regeneration of adult NMJs [70]. GAP-43 is expressed in growth cones, and its content is increased during motor axonal growth and plasticity, and in regeneration following axonal injury [71]. We have previously reported that the content of these synaptic proteins decreases in the course of the postnatal development, with NMJs of adult mice exhibiting significantly lower protein levels than those of young animals; nevertheless, their expression increases again in aged NMJs, suggesting a role for these molecules in the promotion of compensatory nerve sprouting and reinnervation of denervated muscles in aging [6]. We

observed that, GTE- and cocoa flavanols only promoted minor increases in the levels of CGRP and agrin regularly found in aged NMJs. Additionally, no significant differences were observed in GAP-43 expression at the NMJs of flavonoid-supplemented animals, although moderate reductions of this protein were noticed when determined by western blot in the total muscle. Overall, these results indicate that, at least at the concentrations and dietary regimens used here, our supplements are not able to significantly modulate the expression of these proteins linked to NMJ maintenance. The modest decline in GAP-43 content found in muscles of GTE and cocoa groups correlates in some way with the reduction of nerve terminal sprouting observed in NMJs following dietary supplementations and suggest that, in those conditions in which aged NMJs are more stable, intramuscular nerves have a diminished need to sprout for maintaining proper levels of innervation.

In our knowledge, this is the first study reporting the attenuation of age-associated alterations in NMJs promoted by flavonoid-enriched diets.

Effects of green tea- and cocoa-enriched diets in preserving afferent synaptic inputs to motoneurons

An interesting finding of our study is the prevention of age-associated MN deafferentation [6, 76, 77] observed, particularly, following GTE intake. As we have previously reported, aging is accompanied by a prominent loss of excitatory cholinergic (C-boutons) and glutamatergic synapses on MNs [6], a pathological change also observed in different murine models of MN diseases, such as spinal muscular atrophy (SMA) [117–121] and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [117, 122–125], and after nerve injury [126–128]. It is well known that MN excitability is accurately regulated by afferent synaptic inputs which mediate the genesis of coordinated firing patterns resulting in the appropriate muscle contraction during motor activities [129]. Since the control of MN excitability appears to be crucial for motor function, it seems clear that age-associated MN deafferentation can markedly alter the normal electrophysiological patterns and impair motor skills of aged mice, as we previously reported [6]. In this regard, cholinergic C-bouton synapses appear to be particularly important in the control of motor activity during locomotion, being involved in the task dependent regulation of motor outputs [130]. C-boutons also determine the existing differences in intrinsic cellular excitability between MN subtypes innervating slow- or fast-twitch muscles [131, 132]. Thus, MNs innervating slow-twitch muscles (slow MNs) have a higher excitability and slower firing than MNs innervating fast-twitch muscles (fast-fatigable MNs), and it is that

degree of intrinsic excitability which confers to slow MNs a higher resistance to degeneration compared to fast fatigable ones. Our results indicate a differential effect of GTE and cocoa supplementation in the preservation of excitatory synaptic afferents on aged MNs. GTE-, but not cocoa-, flavonoids promoted protection against cholinergic C-bouton- and glutamatergic VGluT2 synapse-deafferentation. However cocoa flavanols, but not GTE, reduced the age-associated decline of glutamatergic VGluT1 synaptic puncta on MNs. These results suggest the need to combine distinct flavonoids in order to achieve a wider effectiveness on MN afferent preservation during aging.

In an attempt to explore further the cellular targets of these flavonoids linked to their preventive benefits on age-associated MN deafferentation, we examined potential changes in the neuronal sources of C-boutons, VGluT1 and VGluT2 synapses contacting spinal MNs. GTE significantly increased the number of V0_C interneurons (the source of motoneuronal C-boutons), which were depleted in control aged spinal cords. This suggests that the attenuation of aging-related C-bouton loss is, in part, a consequence of the flavonoid action on the maintenance of V0_C interneurons during senescence. On the other hand, a substantial number of VGluT1 synaptic terminals on MNs arise from DRG proprioceptive (PV-positive) sensory neurons that peripherally innervate muscle spindles, stretch-sensitive mechanoreceptors embedded in skeletal muscles. These VGluT1 proprioceptive terminals, named Ia afferents, establish highly selective excitatory monosynaptic connections with spinal MNs, and are essential for the muscle stretch reflex and, consequently for posture and motor coordination [133]. Our finding that cocoa, but not GTE, are able to remarkably ameliorate aging-related changes found in proprioceptive PV-positive DRG neurons correlates with the effects of this flavonoid on preventing VGluT1 afferent synaptic loss on aged MNs. This suggests that the improvement provided by cocoa flavanols on aging-associated glutamatergic MN deafferentation could be mediated, at least in part, by their actions on DRG sensory neurons.

Despite the preventive action of these flavonoids on age-related MN deafferentation, this effect was not associated to any noticeable improvement in motor axon degeneration that occurs with age [6, 72]. This could contribute to explain the lack of improvement of the electromyographical alterations observed in aged animals [6]. Our results also suggest that preventing MN deafferentation is not enough to achieve the appropriate morphofunctional state of MNs necessary for maintaining or ameliorating the impaired motor activity. On the other hand, more studies are required to

examine whether the preserved synaptic afferents are able to mediate a proper neuromodulatory action for an accurate MN firing and adjust muscle activation to demands of different motor tasks.

Effects of green tea- and cocoa-enriched diets in preventing age-associated microgliosis

Interestingly, GTE supplementation induced conspicuous changes in aging-associated spinal cord microgliosis. We have previously shown that age is accompanied by a neuroinflammatory reaction in ventral horn, which is particularly prominent around MNs [6]. Neuroinflammation in aged spinal cord could be considered as a part of a more general process chronically affecting different regions of the central nervous system, as reported in healthy elderly [134, 135]. The fact that neuroinflammation has been found to be also associated to a number of neurodegenerative disorders, including the MN diseases ALS and SMA [118–120, 136–139], suggests that age-related gliosis can enhance the neuronal vulnerability to dysfunction and degeneration. Gliosis in aged spinal cord entails a marked increase in harmful microglial (M1) and astroglial (A1) phenotypes, and a depletion of neuroprotective M2 microglia and A2 astroglia [6]. Activation of proinflammatory M1 and A1 cells in spinal cord during aging could exert detrimental actions on MNs that may negatively affect their structure and function, with the subsequent impairment of NMJs. In this regard, it has been recently shown that pharmacological reduction of microglia is able to maintain the NMJ integrity during normal aging [140]. This indicates that microglial activation is a critical step in the pathogenic changes leading to neuromuscular decline during aging. However, the cellular mechanisms by which microglia exert their detrimental actions in the aged neuromuscular system, and how we can modulate the microglial reaction in aging are not clarified. A line of evidence assigns to microglia an active role in synapse elimination during neurodegeneration, as occurs in ALS, and after peripheral nerve injury [79, 128]. Therefore, age-related changes in the microglial cell state could be responsible for the synaptic loss observed on aged MNs. Thus, it is tempting to assume that aging entails an altered microenvironment in the spinal cord, which triggers a microglial reaction leading to central synapse elimination. Indeed, in a model of sciatic nerve axotomy, we have recently demonstrated that microglia are recruited by injured MNs and displayed positive chemotaxis to afferent synapses; activated microglia establish close contacts with degenerating afferent terminals, suggesting a role for those cells in the disintegration of defective synapses on MNs

[128]. We do not know, however, whether microglial activation in aging is a primary event resulting in the elimination of normal functional nerve afferents on MNs with the consequent neuronal impairment, or a secondary process occurring in response to a previous altered synaptic function. Nevertheless, as we show here, aging-associated imbalance in M1/M2 phenotypes may be partially modulated by a dietary intervention based on GTE. In fact, we found that a diet enriched with GTE, but not cocoa flavanols, not only significantly reduces the density of microglial profiles, but also increases the proportion of neuroprotective (M2) microglia in the ventral horn spinal cord of aged mice. This was placed in evidence by the increased proportion of microglial profiles displaying CD206 and P2Y12R, two molecules associated with the M2 phenotype, [82, 88, 89], in spinal cords of GTE-supplemented mice. The elevated presence of P2Y12R-positive cells with GTE supplementation is particularly interesting, since the purinergic receptor P2Y12 has been shown to be exclusively expressed in microglia and not in other infiltrating myeloid cells, and appears to be critical for microglial chemotaxis and extension of processes in response to injury [141]. In normal conditions, P2Y12R-positive microglia is a relative stable cell population throughout the lifespan, and this stability seems to be important to ensure the homeostatic functions of central nervous system during aging [142]. P2Y12R expression has been reported to decline in hippocampal demyelinating lesions of aged mice [143] and in multiple sclerosis patients [142], but increases in human brain after anti-inflammatory stimuli [88, 89]. In line with these results and in agreement with the anti-inflammatory and anti-oxidative actions of GTE, we found that P2Y12R-positive, neuroprotective M2, microglia significantly increases after chronic intake of GTE and translocate P2Y12R to the nucleus. The nuclear expression of this purinergic receptor in microglia following GTE supplementation is difficult to conciliate with the role of a G-protein coupled receptor such as P2Y12R, considered as a cell-surface receptor whose primary function is to transduce extracellular stimuli into intracellular signals [144]. Nevertheless, our results are in concordance with previous data on microglial activation in gliomas, in which it has been reported a shift from cytoplasmic to nuclear expression of P2Y12R linked to the acquisition of the M2 phenotype [90]. The functional consequences of this nuclear translocation of P2Y12R are not unraveled yet. In any case, the increase of neuroprotective M2 microglia we found correlates with the prevention of MN deafferentation observed in aged animals subjected to dietary supplementation. However, more work is necessary to analyze whether GTE- intake

results in a direct action on microglia, dampening their anti-inflammatory phenotype or, conversely, flavonoids have their primary effect stabilizing MN afferent inputs, this resulting in the preclusion of microglial reaction.

The effects of supplementation with cocoa flavanols on age-associated microglia activation found here are striking. Although cocoa did not reduce microgliosis in ventral horn of aged animals, it significantly decreased the density of activated/phagocytic, CD68-positive, microglia located close to MNs. Microglia activation appears to be necessary for the removal of VGluT1 synapses on MNs, as reported following peripheral nerve injury [145]. In this regard, we have previously shown that microglia expressing CD68 are involved in the phagocytosis of VGluT1 nerve terminals in ventral horn of SMA mice [118]. Mechanisms underlying the elimination of afferent nerve terminals contacting MNs by microglia in pathological conditions are still not well clarified; it seems likely, however, that not all types of synaptic contacts on MNs are eliminated in the same way by microglia. Thus, it is tempting to speculate that, during the neuroinflammatory response occurring in the ventral horn with aging, the removal of VGluT1 nerve terminals contacting MNs requires specific mechanisms different from those operating to eliminate VACHT or VGluT2 synapses. In fact, in a previous work, we have reported that after peripheral nerve transection, activated microglial cells are recruited to injured MNs, with a predominant positive chemoattraction to VGluT1 and less to VACHT synapses, but with minor preferences for contacting other synapse types, such as GABAergic and serotonergic boutons [146]. Accordingly, it is plausible that activated microglia remove VGluT1 synapses more easily and in a higher extent than VACHT and VGluT2 boutons. This would explain the differential effect on preventing MN deafferentation observed with GTE- and cocoa-supplementation and why dampening microglial activation (indicated by the reduced density of CD68-positive profiles) in areas surrounding MNs following cocoa supplementation precludes VGluT1, but not VACHT and VGluT2, synapse loss.

CONCLUSIONS

In summary, dietary intake of flavonoids from green tea or cocoa was able to significantly increase the survival rate of aged mice and to prevent some regressive structural changes occurring with senescence in distinct cellular components of the neuromuscular system (Figure 10). Both diets clearly preserved NMJ innervation and maturity, delayed the senescence process of the skeletal muscle, and enhanced its regenerative capacity, as inferred from the more

“youthful” cellular phenotype of myofibers, the apparent reduction of myofiber degeneration/regeneration cycles, the preservation of the myogenic SC population, and the increased expression of PGC-1 α . Additionally, GTE- and cocoa-flavonoids differentially promoted the stability of excitatory synaptic inputs to MN, alleviate microgliosis and modulate the balance between proinflammatory (M1) and neuroprotective (M2) microglial phenotypes. The differential effects of flavonoids from GTE and cocoa on changes occurring in the spinal cord with age, suggest that there might be a benefit to combine different flavonoids to counteract the negative effects of aging in the neuromuscular system. Furthermore, the association of flavonoid supplementations with regular physical exercise must be taken in consideration in the therapy of sarcopenia. Future research is needed to investigate whether higher doses of flavonoids are needed and/or longer-term interventions can help restore proper motor function. In any case, the results shown here provide insight into the use of flavonoids as nutritional interventions for the treatment of aging-related neuromuscular alterations that occur with sarcopenia. Our data should be also considered in the context of the dietary management of patients affected by muscular and MN diseases.

MATERIALS AND METHODS

Animals and dietary regimens

Male C57BL/6JRj mice were obtained from Janvier Labs (Saint Berthevin, France), housed in a standard cage (3 animals per cage) containing a nest box (Smart-House, ZOOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Germany), and maintained in a 12-h light/dark cycle, and controlled room temperature ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) and humidity (50%). A total of 45 mice (22 month-old) were randomly distributed in 3 groups ($n = 15$ per group) and fed with either: a standard AIN-93M diet (control group), the AIN-93M diet supplemented with 0.5% GTE (Suphenon 90D, Taiyo, GTE group), or the AIN-93M diet supplemented with 0.133% high-flavanol cocoa powder (Acticoa, Barry Callebaut, cocoa group). The GTE group was designed to receive an average dose of ~ 200 mg EGCg/Kg body weight/d. The cocoa group was designed to receive an average dose was ~ 13.33 mg flavanols/kg body weight/d. Diets started at week 92 (21 months) and were maintained until week 116 (27 months). Daily food intake was measured across groups. Animals were allowed ad libitum access to drinking water and to either the control, or GTE- or cocoa-supplemented diets. Feed intake was estimated by subtracting the weight of the remaining food from that of the food administered the week before. For some analyses,

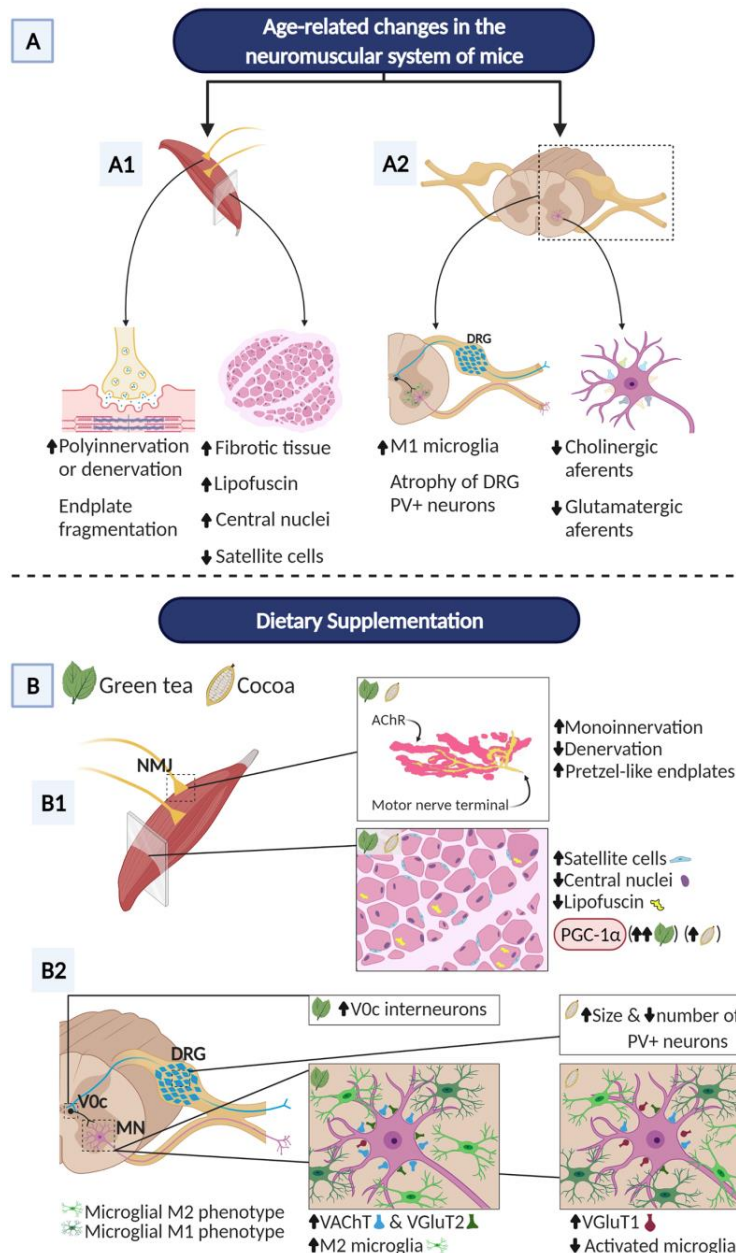


Figure 10. Overview of main benefits promoted by GTE and cocoa dietary supplementations on aging-associated changes in the neuromuscular system of C57BL/6JRj mice. The hallmark neuromuscular alterations occurring in these mice in the course of aging [6] are also summarized. **(A)** NMJs of aged mice display signs of either denervation or polyinnervation, and endplate fragmentation, suggesting an active process of NMJ remodeling and muscle reinnervation. Additionally, aged muscles show increased fibrosis, abundant fibers with lipofuscin accumulation and centrally located nuclei (indicative of muscle regeneration), and a marked reduction in the proportion of SCs. Aged mouse spinal cords exhibit reactive gliosis in ventral horn with increased proportion of harmful M1 microglia and significant loss of excitatory cholinergic (C-boutons) and glutamatergic synapses on MNs; atrophy of sensory proprioceptive (PV-positive) DRG neurons was also seen. **(B)** GTE and cocoa supplementations significantly decrease muscle denervation and signs of NMJ degeneration; both supplements augment the proportion of NMJs exhibiting single innervation, reduce fragmentation of endplates and increase the number of them exhibiting a healthier, “pretzel-like”, appearance. Furthermore, GTE- and cocoa-enriched diets increase the density of satellite cells, and reduce lipofuscin deposition in myofibers and the proportion of them displaying central nuclei. PGC-1 α , a key regulatory factor of mitochondrial biogenesis, shows increased muscular levels in animals fed with GTE and cocoa-supplemented diets. GTE-, but not cocoa-, supplementation prevents the aging-associated loss of cholinergic (C-bouton) and VGlut2-positive glutamatergic synapses on lumbar spinal cord MNs; cocoa, but not GTE, increases the density of VGlut1-positive glutamatergic nerve terminals contacting MNs. The prevention of age-related C-bouton loss promoted by GTE is associated with increased numbers of V0_c interneurons, the neuronal origin of cholinergic C-

bouton inputs to MNs. Additionally, the prevention of aging-associated loss of VGLUT1-positive MN-afferents by cocoa is accompanied by the increased body size of PV-positive proprioceptive DRG neurons, the source of Ia VGLUT1 afferents to MNs. Moreover, GTE-supplementation improves age-related reactive microgliosis in the spinal cord and increases the proportion of neuroprotective M2 microglial cells around MNs, indicating that the imbalance of M1/M2 microglia found to occur with aging can be potentially modulated by GTE. Created with BioRender.com.

adult (4 month-old) C57BL/6JRj mice, feed with the standard diet, were also used.

All animal handling and experimentation procedures were conducted in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments, and the European Communities Council Directive 2010/63/EU for the care and use of laboratory animals and the norms established by the Generalitat de Catalunya (published in the *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* [DOGC] 2073, 1995). All experiments were previously evaluated and approved by the Committee for Animal Care and Use of the Universitat de Lleida, and the Committee for Ethics on Experimental Animal and Human Research of the Universitat Autònoma de Barcelona. All efforts were made to minimize suffering and reduce the number of animals in agreement with the European Communities Council Directive (November 24, 1986; 86/609/EEC). According to previous defined criteria [147, 148], mice displaying tumors, physical abnormalities and/or evidence of disease were excluded from the study and euthanized by an overdose of pentobarbital (30 mg, intraperitoneally).

Motor behavior tests

To evaluate the impact of different diets on motor skills, mice were periodically weighed and carefully examined. Open-field (for assessing locomotor activity), and pen (balance beam, for assessing motor coordination and balance) tests were subsequently performed every 4 weeks according to previously described guidelines [149]. Tests were conducted by the same investigator in a blinded manner. In the pen test, every mouse was evaluated 3 times, with a 15-minutes recovery period between them; the value obtained in the best test performance was used as the final score. Open-field test was performed by the automated recording of mouse movements using Smart Video Tracking software (v2.5.21, Panlab Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA); different parameters such as time, distance, entries in zones, and average speed were measured.

Electrophysiology tests

For motor nerve conduction tests, the sciatic nerve was stimulated percutaneously by means of single pulses of 25 μ s duration delivered through a pair of needle electrodes placed at the sciatic notch. The CMAP (M wave) and the H-reflex wave were recorded from TA

and plantar interossei (PL) muscles by using microneedle electrodes [150]. The H/M ratio was calculated as the quotient of the maximal H wave and maximal M wave amplitude for each recorded muscle. For sensory nerve conduction tests, the recording electrodes were placed near the digital nerves of the fourth toe, recording the compound sensory nerve action potential (SNAP) following stimulation of the sciatic nerve as above. Signals were amplified and displayed on a digital oscilloscope (Tektronix 450S, Tektronix, Beaverton, OR, USA) at appropriate settings to measure the amplitude from baseline to the maximal negative peak, and the latency from stimulus to the maximal negative peak. To ensure reproducibility, the recording needles were placed under microscope guided by anatomical landmarks to secure the same placement on all animals. During the tests, the mice body temperature was maintained constant between 34-36°C by means of a thermostat-controlled heating pad.

MUNE test was performed in the TA muscle, using the same setting as for the motor nerve conduction test. The protocol used was based on the incremental technique [151]. Starting from subthreshold intensity, the sciatic nerve was stimulated with single pulses of gradual increased intensity until the first CMAP response appeared, representing the first motor unit recruited. With the next stimuli, quantal increases in the response were recorded. Increments >50 μ V were considered as the recruitment of an additional motor unit. The amplitude of a single motor unit action potential (SMUA) was calculated as the mean of more than 15 consistent increases. The estimated number of motor units resulted from the equation: MUNE = CMAP maximal amplitude/mean amplitude of SMUA.

Tissue sample collection and histological analysis

Mice were anaesthetized and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After animal perfusion, spinal cords, L4 DRGs, L4 VRs, and entire individual hindlimb skeletal muscles were rapidly dissected from each mouse. VRs were then immersed in 1% PFA and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4) for 24 hours.

Muscle samples were processed for histology and further morphometry according to previously described procedures [152]. Muscles examined were the TA, a fast-twitch muscle, which helps with dorsiflexion and inversion of the foot, and the Sol, a relative slow-twitch

muscle in mice, which plays an important function in maintaining the standing posture and is also used for plantarflexion during walking [153]; to examine whether some changes also occurred in a more proximal hindlimb muscle, the fast-twitch Gra muscle, which is mainly involved in the adduction of the limb and knee flexion [153], was also included in some experiments. Muscles were cleaned, cleared of the excess of connective tissue, blotted dry and weighed. After this, they were post-fixed in 4% PFA in 0.1 M PB (pH 7.4), cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PB, embedded in Tissue Freezing Medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC) and frozen. Some cryostat transverse sections (16- μ m thick), obtained from the mid-belly of the muscle, were stained with hematoxylin and eosin for histological examination.

VRs were post-fixed in 1% osmium tetroxide, and embedded in Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) epoxy resin, following standard procedures. Semithin transversal sections (1- μ m thick) were stained with methylene blue and imaged using an Olympus 60x/1.4NA PlanApo oil immersion objective (Olympus) and a DMX 1200 Nikon (Tokyo, Japan) digital camera.

Immunohistochemistry and imaging

For immunohistochemical analysis, lumbar spinal cords, L4 DRGs and skeletal muscles were post-fixed by immersion in 4% PFA in 0.1M PB (pH 7.4), either overnight (for spinal cords and DRGs) or for 2 hours (for muscles), and cryoprotected. Tissue samples were embedded in tissue freezing medium and frozen. Longitudinal (16- μ m thick, for muscles) and transverse (16- μ m thick, for muscles, and 14- μ m thick, for spinal cords and DRGs) serial cryostat sections were obtained and stored at -80° C.

Tissue sections were sequentially rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Triton X-100 for 30 min, blocked in normal goat serum or normal horse serum, and subsequently incubated with the chosen primary antibody. The primary antibodies used are indicated in Table 1.

After incubation with the primary antibody, sections were washed with PBS and incubated for 1 hour at room temperature (RT) with the appropriate secondary antibodies labeled with one of the following fluorochromes (1:500): Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), Cy3, or Cy5 (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA). The spinal cord sections were finally counterstained with blue fluorescent NeuroTrace Nissl staining (1:100; Molecular Probes). Muscle sections

were incubated with Alexa Fluor 555-conjugated α -Bgtx (1:500; Molecular Probes) to identify postsynaptic acetylcholine receptors. Some sections were also stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 50 ng/ml, Molecular Probes) for DNA staining. To avoid lipofuscin-like autofluorescence, slides with sections of spinal cord from old mice were treated with the Autofluorescent Eliminator Reagent (Merck, Kenilworth, NJ, USA), following incubation with the secondary antibodies. Some slides with DRG were stained with FITC-conjugated IB4 (1:25; Sigma-Aldrich).

After washing, slides were coverslipped using an anti-fading medium containing 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 20% glycerol, 10% Mowiol, and 0.1% 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane. Slides were examined with an Olympus BX51 epifluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a DP30BW camera, or with FluoView 500 or FluoView 1000 Olympus laser scanning confocal microscopes. For comparisons, slides from different animals and experimental conditions were processed in parallel for immunohistochemistry and subsequent imaging. The same scanning parameters were used for the acquisition of images corresponding to different experimental groups. For spinal cord immunohistochemical studies, digital images of the entire lumbar region were obtained from every 30th section.

Image analysis and morphometry

Image and morphometric examinations were performed by two independent investigators. Digital images were analyzed with ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Myofiber cell counts and size measurements were performed in a single random image per muscle taken from its mid-belly and immunostained for laminin. The proportion of myofibers showing central nuclei was also counted on images from DAPI-stained sections. The percentage of myofibers showing lipofuscin aggregates, the number and the area of these aggregates, and the area and intensity of ATP5A immunostaining, used as mitochondrial marker, were also measured by ImageJ. The number of DAPI-stained nuclei exhibiting Pax7-positive immunolabeling, as a marker of satellite cells, was also counted in confocal images of muscle sections.

The cytoarchitecture of the NMJs was assessed in longitudinal immunostained sections of muscles. Z-stack optical sections (1- μ m thick) were obtained with the confocal microscope and projected to reconstruct NMJs; maximum intensity projections of stacks were created using the microscope software. Three-five

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry.

Target	Abbreviation	Host species	Source /catalog no.	Dilution
Agrin	Agrin	mouse monoclonal	Millipore (Temecula, CA) / MAB5204	1:100
ATP5A	ATP5A	mouse monoclonal	Abcam (Cambridge, UK) / ab14748	1:100
Calcitonin gene-related peptide	CGRP	rabbit polyclonal	Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) / C8198	1:1000
Macrophage Mannose Receptor	MMR/CD206	goat polyclonal	R&D Systems (Minneapolis, MN) / AF2535	1:100
Cluster differentiation 68	CD68	rat monoclonal	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA) / MCA1957	1:100
Growth associated protein 43 (H-100)	GAP-43	rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) / sc-10786	1:50
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba 1	rabbit polyclonal	Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan) / 019-19741	1:500
Ionized calcium-binding adaptor molecule 1	Iba 1	goat polyclonal	Abcam / ab5076	1:500
Laminin 2	Laminin 2	rat monoclonal	Sigma-Aldrich / L0663	1:100
Mac-2/Galectin 3	Mac-2	rat monoclonal	Cedarlane (Burlington, Canada) / CL8942AP	1:800
Neurofilament 68 KDa	NF	chicken polyclonal	Abcam / ab72997	1:1000
G-protein-coupled purinergic receptor P2Y12R	P2Y12R	rat monoclonal	Biologend (San Diego, CA) / 848001	1:100
Paired box protein 7	Pax7	mouse monoclonal	R&D Systems / MAB1675	1:50
Parvalbumin	PV	mouse monoclonal	Swant (Marly, Switzerland) / PV235	1:2000
Synaptic vesicle protein 2	SV2	mouse monoclonal	DSHB / SV2	1:1000
Vesicular acetylcholine transporter	VAcHT	guinea pig polyclonal	Synaptic Systems (Göttingen, Germany) / #139105	1:500
Vesicular glutamate transporter 1	VGluT1	rabbit polyclonal	Synaptic Systems / #135302	1:1000
Vesicular glutamate transporter 2	VGluT2	guinea pig polyclonal	Synaptic Systems / #135404	1:200

sections were examined for each muscle, in which NMJs from different randomly selected visual fields were analyzed. NMJ size was measured by determining the area of manually outlined α -Bgtx-labeled postsynaptic site. Full or partial denervation was considered when the postsynaptic site was not completely apposed by the nerve terminal immunostained for both NF and SV2, as presynaptic marker: 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 axon terminals, stained with anti-NF+SV2 antibodies, entering a single postsynaptic site: an NMJ was defined as polyinnervated when it was occupied by two or more axons. Terminal sprouting was quantified by counting the number of NF+SV2-stained axonal processes coming from a nerve terminal that escaped from a α -Bgtx-labeled postsynaptic site; the number of NMJs showing sprouts was referred as a percentage of the total number of NMJs examined per muscle. On the basis of the morphological appearance of the postsynaptic site, the degree of NMJ maturity was classified as plaque, folds, perforations, or pretzel-like

(secondary) structure ranging from immature to mature, according to previously described criteria [154]. An NMJ was defined as fragmented when its postsynaptic site displayed a discontinued appearance, with 5 or more AChR-islands stained with α -Bgtx, and/or unusually small and irregular clusters of AChR. Immunostaining for CGRP, GAP-43 and agrin was estimated based on pixel intensity after background subtraction in NMJs which postsynaptic site was visualized with α -Bgtx. An average of 50 NMJs per muscle was examined to assess the different morphometric parameters and the intensity of immunostaining. Any NMJ that was difficult to examine due to its location and/or orientation was excluded from the analysis. An average of 35 muscle sections from 3-5 animals per condition were analyzed.

The analysis of afferent synapses on MNs and glia in the ventral horn was performed on confocal images taken from every 30th section of the entire lumbar spinal cord. The number and area of VAcHT-, VGluT1- and VGluT2-immunoreactive synaptic boutons on MN somata were counted and measured by delineating their periphery on the screen; only boutons that were in close

contact with MNs displaying a large nucleus and visible nucleolus were included in the counts, and numbers were normalized to the perimeter of MN soma. Levels of immunoreactivity for Iba1, Mac2, CD206, P2Y12R and CD68 in the spinal cord were quantified by analyzing pixel intensity following background subtraction. Spinal cord microglia morphology was quantified in confocal images from Iba1 immunostained sections by using ImageJ software for skeleton analysis (AnalyzeSkeleton [2D/3D] from <http://imagej.net/AnalyzeSkeleton>). Analysis was performed according to a previously described procedure [80]. For this, digital photomicrographs were transformed to 8-bit grayscale, and then binarized to obtain a black and white image by means of a formerly established threshold. Every image was manually edited to obtain a continuous set of pixels and gaps between processes belonging to neighboring cells. The image was then saved and the plugin AnalyzeSkeleton(2D/3D) run. The accuracy of skeletonized images was assessed, by creating an overlay of the obtained skeleton with the corresponding original image.

The density of V0_C neurons in lumbar spinal cord was measured by counting on digital images the number of VAcHT-immunolabeled interneurons in a 0.1 mm² area around the central canal where these cells are placed.

The number and soma area of CGRP, IB4 and PV-immunolabeled sensory neurons in DRGs were also measured on digital images. The number and diameter of healthy and degenerating myelinated axons were determined on 60x images taken from VR semithin cross-sections stained with methylene blue. The images were joined together to obtain a whole picture of an entire nerve root transverse section. The diameter of the myelinated axons was measured by delineating the outer profile of the myelin sheath. Axon diameter and g-ratio measurements were performed on micrographs of VRs; ImageJ g-ratio plug-in was used to obtain semiautomated measurements of randomly selected nerve fibers; the axon diameter was divided by the outer diameter of the myelin sheath. At least 100 myelinated axons per mouse (4-5 mice per condition) were measured.

Western blotting

Frozen hindlimb muscles were fragmented and homogenized using an electric homogenizer with ice-cold RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with protease inhibitor (Sigma-Aldrich, cat. # P8340) and PhosSTOP (Roche, Laval, Canada). The homogenized samples were centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4° C. The

protein concentrations of supernatants were determined by BIO-RAD Micro DC protein assay (BIO-RAD, Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Loading buffer 4 x SS (20% sucrose and 0.05% bromophenol blue, 0.1% sodium azide) containing 5-10% β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 15-50 μg of protein were loaded in either 7.5% or 10% polyacrylamide electrophoresis gel. Proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon™-P, Millipore) in Tris-glycine-methanol-buffered solution. Membranes were blocked with 5% dried skim milk in 0.1% Tween 20 and Tris-buffered saline pH 8 (TBST) for 1 hour at RT, and then extensively washed in TBST. Immunodetection was performed by incubating the membranes overnight at 4° C with rabbit polyclonal anti-PGC-1α (1:500; Santa Cruz Biotechnology, cat. # sc-13067), rabbit polyclonal anti-GAP-43 (diluted 1:1000; Santa Cruz Biotechnology cat # sc-10786), mouse monoclonal anti-α-tubulin (diluted 1:1000; Sigma-Aldrich; cat. # T5168), and mouse monoclonal anti-glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH, diluted 1:10,000; Abcam, cat. # ab8245) antibodies, the two latter used for loading controls. The membranes were washed in TBST, incubated with the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10,000; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) for 60 minutes at RT, washed in TBST and visualized using the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent detection kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, 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

Data are shown as the mean ± standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was performed by either one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Bonferroni's test or two-tailed Student's *t*-test when only two different groups were compared. Gehan-Breslow-Wilcoxon test was used for comparing survival curves between groups. The level of significance was established at $p \leq 0.05$. GraphPad Prism 6 software was used for statistical analysis and graph presentations of data.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JC, JEE, SLP, ABa, TD and RR contributed to conception of the research, and JC and JEE designed the study. AB, SG, GM-C, OT, AC and LP performed the research. AB, SG, OT, XN and JC analyzed the data. JC, JEE, XN and SLP contributed to writing the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sara Salvany, Sara Hernández, Alao Gatus, Mònica Esteve, Maria Beltrán, Clara Paniagua and Pol Garcia for collaborating in some experiments, Anaïs Panosa and Alba Garcia from the SCT of Microscopy of the Universitat de Lleida for technical support with confocal microscopy, and the staff from the SCT Animal Facility of the Universitat de Lleida for mouse care and housing.

CONFLICTS OF INTEREST

SLP, TD and RR are employees and stock holders of Abbott. ABa was employee and stock holder of Abbott during initiation of study. The other authors declare that they have no conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by Abbott and a grant from the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (RTI2018-099278-B-I00 to JC and JE).

REFERENCES

- Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R. Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol*. 2004; 159:413–21. <https://doi.org/10.1093/aje/kwh058> PMID:14769646
- Abellan van Kan G. Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J Nutr Health Aging*. 2009; 13:708–12. <https://doi.org/10.1007/s12603-009-0201-z> PMID:19657554
- von Haehling S, Morley JE, Anker SD. An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2010; 1:129–33. <https://doi.org/10.1007/s13539-010-0014-2> PMID:21475695
- Gava P, Kern H, Carraro U. Age-associated power decline from running, jumping, and throwing male masters world records. *Exp Aging Res*. 2015; 41: 115–35. <https://doi.org/10.1080/0361073X.2015.1001648> PMID:25724012
- Larsson L, Degens H, Li M, Salviati L, Lee YI, Thompson W, Kirkland JL, Sandri M. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol Rev*. 2019; 99:427–511. <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017> PMID:30427277
- Blasco A, Gras S, Mòdol-Caballero G, Tarabal O, Casanovas A, Piedrafita L, Barranco A, Das T, Pereira SL, Navarro X, Rueda R, Esquerda JE, Calderó J. Motoneuron deafferentation and gliosis occur in association with neuromuscular regressive changes during ageing in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020; 11:1628–60. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12599> PMID:32691534
- Tintignac LA, Brenner HR, Rüegg MA. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol Rev*. 2015; 95:809–52. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014> PMID:26109340
- Li L, Xiong WC, Mei L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol*. 2018; 80:159–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255> PMID:29195055
- Willadt S, Nash M, Slater C. Age-related changes in the structure and function of mammalian neuromuscular junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 2018; 1412:41–53. <https://doi.org/10.1111/nyas.13521> PMID:29291259
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8:457–65. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49> PMID:22473333
- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD Jr, Gage FH, Lichtman JW, Sanes JR. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:14863–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002220107> PMID:20679195
- Kougiyas DG, Das T, Perez AB, Pereira SL. A role for nutritional intervention in addressing the aging neuromuscular junction. *Nutr Res*. 2018; 53:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.02.006> PMID:29804584
- Haramizu S, Mori T, Yano M, Ota N, Hashizume K, Otsuka A, Hase T, Shimotoyodome A. Habitual exercise plus dietary supplementation with milk fat globule membrane improves muscle function deficits via neuromuscular development in senescence-accelerated mice. *Springerplus*. 2014; 3:339. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-339> PMID:25110626
- Yano M, Haramizu S, Ota N, Minegishi Y, Shimotoyodome A. Continuous Supplementation of

- Milk Fat Globule Membrane with Habitual Exercise from a Young Age Improves Motor Coordination and Skeletal Muscle Function in Aged Mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2019; 65:405–13.
<https://doi.org/10.3177/jnsv.65.405> PMID:[31666477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31666477/)
15. Nishimune H, Stanford JA, Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*. 2014; 49:315–24.
<https://doi.org/10.1002/mus.24095>
PMID:[24122772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24122772/)
 16. Marzetti E, Lees HA, Wohlgemuth SE, Leeuwenburgh C. Sarcopenia of aging: underlying cellular mechanisms and protection by calorie restriction. *Biofactors*. 2009; 35:28–35.
<https://doi.org/10.1002/biof.5> PMID:[19319843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19319843/)
 17. Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44:160–68.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.028>
PMID:[18191752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18191752/)
 18. Faitg J, Leduc-Gaudet JP, Reynaud O, Ferland G, Gaudreau P, Gouspillou G. Effects of Aging and Caloric Restriction on Fiber Type Composition, Mitochondrial Morphology and Dynamics in Rat Oxidative and Glycolytic Muscles. *Front Physiol*. 2019; 10:420.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00420>
PMID:[31114501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31114501/)
 19. Jang YC, Liu Y, Hayworth CR, Bhattacharya A, Lustgarten MS, Muller FL, Chaudhuri A, Qi W, Li Y, Huang JY, Verdin E, Richardson A, Van Remmen H. Dietary restriction attenuates age-associated muscle atrophy by lowering oxidative stress in mice even in complete absence of CuZnSOD. *Aging Cell*. 2012; 11:770–82.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00843.x>
PMID:[22672615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22672615/)
 20. Cerletti M, Jang YC, Finley LW, Haigis MC, Wagers AJ. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2012; 10:515–19.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.002>
PMID:[22560075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22560075/)
 21. Chopek JW, Gardiner PF. Life-long caloric restriction: Effect on age-related changes in motoneuron numbers, sizes and apoptotic markers. *Mech Ageing Dev*. 2010; 131:650–59.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.09.001>
PMID:[20851712](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851712/)
 22. Zhang PY. Polyphenols in Health and Disease. *Cell Biochem Biophys*. 2015; 73:649–64.
<https://doi.org/10.1007/s12013-015-0558-z>
PMID:[27259307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27259307/)
 23. Arent SM, Senso M, Golem DL, McKeever KH. The effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: a randomized, double-blind, crossover study. *J Int Soc Sports Nutr*. 2010; 7:11.
<https://doi.org/10.1186/1550-2783-7-11>
PMID:[20178632](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178632/)
 24. Bowtell JL, Sumners DP, Dyer A, Fox P, Mileva KN. Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011; 43:1544–51.
<https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31820e5adc>
PMID:[21233776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21233776/)
 25. Herrlinger KA, Chirouzes DM, Ceddia MA. Supplementation with a polyphenolic blend improves post-exercise strength recovery and muscle soreness. *Food Nutr Res*. 2015; 59:30034.
<https://doi.org/10.3402/fnr.v59.30034>
PMID:[26689317](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26689317/)
 26. Trombold JR, Reinfeld AS, Casler JR, Coyle EF. The effect of pomegranate juice supplementation on strength and soreness after eccentric exercise. *J Strength Cond Res*. 2011; 25:1782–88.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e318220d992>
PMID:[21659887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21659887/)
 27. Machin DR, Christmas KM, Chou TH, Hill SC, Van Pelt DW, Trombold JR, Coyle EF. Effects of Differing Dosages of Pomegranate Juice Supplementation after Eccentric Exercise. *Physiology Journal*. 2014; 2014:1–7.
<https://doi.org/10.1155/2014/271959>
 28. Beyer KS, Stout JR, Fukuda DH, Jajtner AR, Townsend JR, Church DD, Wang R, Riffe JJ, Muddle TW, Herrlinger KA, Hoffman JR. Impact of Polyphenol Supplementation on Acute and Chronic Response to Resistance Training. *J Strength Cond Res*. 2017; 31:2945–54.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002104>
PMID:[29068862](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29068862/)
 29. Davoodi J, Markert CD, Voelker KA, Hutson SM, Grange RW. Nutrition strategies to improve physical capabilities in Duchenne muscular dystrophy. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012; 23:187–99.
<https://doi.org/10.1016/j.pmr.2011.11.010>
PMID:[22239883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22239883/)
 30. Call JA, Voelker KA, Wolff AV, McMillan RP, Evans NP, Hulver MW, Talmadge RJ, Grange RW. Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. *J Appl Physiol (1985)*. 2008; 105:923–32.

- <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00028.2008>
PMID:[18583385](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18583385/)
31. Dorchies OM, Wagner S, Vuadens O, Waldhauser K, Buetler TM, Kucera P, Ruegg UT. Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290:C616–25.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00425.2005>
PMID:[16403950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16403950/)
32. Buetler TM, Renard M, Offord EA, Schneider H, Ruegg UT. Green tea extract decreases muscle necrosis in mdx mice and protects against reactive oxygen species. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75:749–53.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/75.4.749>
PMID:[11916763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11916763/)
33. Meador BM, Mirza KA, Tian M, Skelding MB, Reaves LA, Edens NK, Tisdale MJ, Pereira SL. The Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate (EGCg) Attenuates Skeletal Muscle Atrophy in a Rat Model of Sarcopenia. *J Frailty Aging*. 2015; 4:209–15.
<https://doi.org/10.14283/jfa.2015.58> PMID:[27031020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27031020/)
34. Murase T, Haramizu S, Ota N, Hase T. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295:R281–89.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00880.2007>
PMID:[18480242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18480242/)
35. Alway SE, Bennett BT, Wilson JC, Edens NK, Pereira SL. Epigallocatechin-3-gallate improves plantaris muscle recovery after disuse in aged rats. *Exp Gerontol*. 2014; 50:82–94.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.011>
PMID:[24316035](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24316035/)
36. Alway SE, Bennett BT, Wilson JC, Sperringer J, Mohamed JS, Edens NK, Pereira SL. Green tea extract attenuates muscle loss and improves muscle function during disuse, but fails to improve muscle recovery following unloading in aged rats. *J Appl Physiol* (1985). 2015; 118:319–30.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00674.2014>
PMID:[25414242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414242/)
37. Meador BM, Pereira SL, Edens NK. Green Tea Supplementation: Current Research, Literature Gaps, and Product Safety. *Journal of Food and Nutritional Disorders*. 2013; 02.
<https://doi.org/10.4172/2324-9323.1000126>
38. Valcic S, Burr JA, Timmermann BN, Liebler DC. Antioxidant chemistry of green tea catechins. New oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin from their reactions with peroxy radicals. *Chem Res Toxicol*. 2000; 13:801–10.
<https://doi.org/10.1021/tx000080k> PMID:[10995252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10995252/)
39. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*. 2000; 33:423–47.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)
40. Lamuela-Raventós RM, Romero-Pérez AI, Andrés-Lacueva C, Tornero A. Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International*. 2016; 11:159–76.
<https://doi.org/10.1177/1082013205054498>
41. Fraga CG, Litterio MC, Prince PD, Calabró V, Piotrkowski B, Galleano M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; 48:63–67.
<https://doi.org/10.3164/jcbn.11-010FR>
PMID:[21297914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21297914/)
42. Munguia L, Rubio-Gayosso I, Ramirez-Sanchez I, Ortiz A, Hidalgo I, Gonzalez C, Meaney E, Villarreal F, Najera N, Ceballos G. High Flavonoid Cocoa Supplement Ameliorates Plasma Oxidative Stress and Inflammation Levels While Improving Mobility and Quality of Life in Older Subjects: A Double-Blind Randomized Clinical Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019; 74:1620–27.
<https://doi.org/10.1093/gerona/glz107>
PMID:[31056655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31056655/)
43. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Cocoa and Dark Chocolate Polyphenols: From Biology to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017; 8:677.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00677>
PMID:[28649251](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28649251/)
44. Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, Kaltsatou A, Cicchella A. Effect of Cocoa Products and Its Polyphenolic Constituents on Exercise Performance and Exercise-Induced Muscle Damage and Inflammation: A Review of Clinical Trials. *Nutrients*. 2019; 11:1471.
<https://doi.org/10.3390/nu11071471>
PMID:[31261645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31261645/)
45. Ramiro-Puig E, Casadesús G, Lee HG, Zhu X, McShea A, Perry G, Pérez-Cano FJ, Smith MA, Castell M. Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on *in vitro* oxidative stress. *Eur J Nutr*. 2009; 48:54–61.
<https://doi.org/10.1007/s00394-008-0761-4>
PMID:[19043659](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19043659/)
46. Si H, Wang X, Zhang L, Parnell LD, Admed B, LeRoith T, Ansah TA, Zhang L, Li J, Ordovás JM, Si H, Liu D, Lai CQ. Dietary epicatechin improves survival and delays skeletal muscle degeneration in aged mice. *FASEB J*. 2019; 33:965–77.

- <https://doi.org/10.1096/fj.201800554RR>
PMID:30096038
47. Nogueira L, Ramirez-Sanchez I, Perkins GA, Murphy A, Taub PR, Ceballos G, Villarreal FJ, Hogan MC, Malek MH. (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J Physiol*. 2011; 589:4615–31.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.209924>
PMID:21788351
48. Carlson BM. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am J Anat*. 1973; 137:119–49.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001370202>
PMID:4350147
49. Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol*. 2013; 4:363.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00363>
PMID:24376424
50. Day K, Shefer G, Shearer A, Yablonka-Reuveni Z. The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Dev Biol*. 2010; 340:330–43.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.006>
PMID:20079729
51. Gopinath SD, Rando TA. Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche. *Aging Cell*. 2008; 7:590–98.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00399.x>
PMID:18462272
52. Snow MH. The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res*. 1977; 185:399–408.
<https://doi.org/10.1007/BF00220299>
PMID:597854
53. Sousa-Victor P, García-Prat L, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation. *Trends Endocrinol Metab*. 2015; 26:287–96.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.006>
PMID:25869211
54. Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005; 2005:re1.
<https://doi.org/10.1126/sageke.2005.5.re1>
PMID:15689603
55. Nakae Y, Stoward PJ, Kashiyama T, Shono M, Akagi A, Matsuzaki T, Nonaka I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J Mol Histol*. 2004; 35:489–99.
<https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000045947.83628.a7>
PMID:15571326
56. Nakae Y, Stoward PJ. The high correlation between counts and area fractions of lipofuscin granules, a biomarker of oxidative stress in muscular dystrophies. *Histochem Cell Biol*. 2016; 146:627–34.
<https://doi.org/10.1007/s00418-016-1462-3>
PMID:27394427
57. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002; 418:797–801.
<https://doi.org/10.1038/nature00904> PMID:12181572
58. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM. PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:16260–65.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607795103>
PMID:17053067
59. 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; 21:770–83.
<https://doi.org/10.1101/gad.1525107>
PMID:17403779
60. Chabi B, Ljubcic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*. 2008; 7:2–12.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x>
PMID:18028258
61. Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, Befroy D, Pypaert M, Hardie DG, et al. Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*. 2007; 5:151–56.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.008>
PMID:17276357
62. Baker DJ, Betik AC, Krause DJ, Hepple RT. No decline in skeletal muscle oxidative capacity with aging in long-term calorically restricted rats: effects are independent of mitochondrial DNA integrity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006; 61:675–84.
<https://doi.org/10.1093/gerona/61.7.675>
PMID:16870628
63. Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One*. 2012; 7:e34640.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034640>
PMID:22485182

64. Chai RJ, Vukovic J, Dunlop S, Grounds MD, Shavlakadze T. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS One*. 2011; 6:e28090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028090> PMID:[22164231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22164231/)
65. Willadt S, Nash M, Slater CR. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Sci Rep*. 2016; 6:24849. <https://doi.org/10.1038/srep24849> PMID:[27094316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27094316/)
66. Sala C, Andreose JS, Fumagalli G, Lømo T. Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions. *J Neurosci*. 1995; 15:520–28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00520.1995> PMID:[7823160](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7823160/)
67. 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. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(96\)13174-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(96)13174-8) PMID:[8961304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8961304/)
68. Tarabal O, Calderó J, Ribera J, Sorribas A, López R, Molgó J, Esquerda JE. 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: 829–36. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01269.x> PMID:[9081635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9081635/)
69. Matteoli M, Balbi S, Sala C, Chini B, Cimino M, Vitadello M, Fumagalli G. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. *J Mol Neurosci*. 1990; 2: 175–84. <https://doi.org/10.1007/BF02896842> PMID:[2275848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2275848/)
70. Samuel MA, Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Sanes JR. Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions. *PLoS One*. 2012; 7:e46663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046663> PMID:[23056392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23056392/)
71. Holahan MR. A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11:266. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00266> PMID:[28912688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28912688/)
72. Chung T, Park JS, Kim S, Montes N, Walston J, Höke A. Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline. *Muscle Nerve*. 2017; 55:894–901. <https://doi.org/10.1002/mus.25267> PMID:[27464347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27464347/)
73. Sheard PW, Anderson RD. Age-related loss of muscle fibres is highly variable amongst mouse skeletal muscles. *Biogerontology*. 2012; 13:157–67. <https://doi.org/10.1007/s10522-011-9365-0> PMID:[22048817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22048817/)
74. Hashizume K, Kanda K. Differential effects of aging on motoneurons and peripheral nerves innervating the hindlimb and forelimb muscles of rats. *Neurosci Res*. 1995; 22:189–96. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(95\)00889-3](https://doi.org/10.1016/0168-0102(95)00889-3) PMID:[7566699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7566699/)
75. Oertel G. Changes in human skeletal muscles due to ageing. Histological and histochemical observations on autopsy material. *Acta Neuropathol*. 1986; 69:309–13. <https://doi.org/10.1007/BF00688309> PMID:[3962608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3962608/)
76. Maxwell N, Castro RW, Sutherland NM, Vaughan KL, Szarowicz MD, de Cabo R, Mattison JA, Valdez G. α -Motor neurons are spared from aging while their synaptic inputs degenerate in monkeys and mice. *Aging Cell*. 2018; 17:e12726. <https://doi.org/10.1111/acer.12726> PMID:[29397579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29397579/)
77. Krishnan VS, Shavlakadze T, Grounds MD, Hodgetts SI, Harvey AR. Age-related loss of VGLUT1 excitatory, but not VGAT inhibitory, immunoreactive terminals on motor neurons in spinal cords of old sarcopenic male mice. *Biogerontology*. 2018; 19:385–99. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9765-5> PMID:[30084046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30084046/)
78. Zagoraoui L, Akay T, Martin JF, Brownstone RM, Jessell TM, Miles GB. A cluster of cholinergic premotor interneurons modulates mouse locomotor activity. *Neuron*. 2009; 64:645–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.10.017> PMID:[20005822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005822/)
79. Henstridge CM, Tzioras M, Paolicelli RC. Glial Contribution to Excitatory and Inhibitory Synapse Loss in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13:63. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00063> PMID:[30863284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30863284/)
80. Young K, Morrison H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *J Vis Exp*. 2018; 57648. <https://doi.org/10.3791/57648> PMID:[29939190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939190/)
81. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the

- bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014; 11:98.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
PMID:[24889886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24889886/)
82. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016; 53:1181–94.
<https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
PMID:[25598354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25598354/)
83. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009; 29:13435–44.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009>
PMID:[19864556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19864556/)
84. Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015; 131:65–86.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003>
PMID:[26067058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26067058/)
85. Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, Kohsaka S. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y₁₂ in microglia in rat brain. *Glia*. 2003; 44:242–50.
<https://doi.org/10.1002/glia.10293> PMID:[14603465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14603465/)
86. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: E1738–46.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
PMID:[26884166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26884166/)
87. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, et al. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*. 2014; 17:131–43.
<https://doi.org/10.1038/nn.3599> PMID:[24316888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24316888/)
88. Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VT, Michell-Robinson M, Leong SY, Butovsky O, Ludwin SK, Séguéla P, Bar-Or A, Antel JP. P2Y₁₂ expression and function in alternatively activated human microglia. *Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015; 2:e80.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000080>
PMID:[25821842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25821842/)
89. Beaino W, Janssen B, Kooij G, van der Pol SM, van Het Hof B, van Horssen J, Windhorst AD, de Vries HE. Purinergic receptors P2Y₁₂R and P2X₇R: potential targets for PET imaging of microglia phenotypes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2017; 14:259.
<https://doi.org/10.1186/s12974-017-1034-z>
PMID:[29273052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29273052/)
90. Zhu C, Kros JM, van der Weiden M, Zheng P, Cheng C, Mustafa DA. Expression site of P2RY12 in residential microglial cells in astrocytomas correlates with M1 and M2 marker expression and tumor grade. *Acta Neuropathol Commun*. 2017; 5:4.
<https://doi.org/10.1186/s40478-016-0405-5>
PMID:[28073370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28073370/)
91. Walker DG, Lue LF. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*. 2015; 7:56.
<https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>
PMID:[26286145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26286145/)
92. Rotterman TM, Alvarez FJ. Microglia Dynamics and Interactions with Motoneurons Axotomized After Nerve Injuries Revealed By Two-Photon Imaging. *Sci Rep*. 2020; 10:8648.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65363-9>
PMID:[32457369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32457369/)
93. Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci*. 2005; 118:4813–21.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02602> PMID:[16219688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219688/)
94. Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, Brack AS. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature*. 2012; 490:355–60.
<https://doi.org/10.1038/nature11438> PMID:[23023126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23023126/)
95. Sacco A, Puri PL. Regulation of Muscle Satellite Cell Function in Tissue Homeostasis and Aging. *Cell Stem Cell*. 2015; 16:585–87.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.007>
PMID:[26046757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26046757/)
96. Lepper C, Partridge TA, Fan CM. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011; 138:3639–46.
<https://doi.org/10.1242/dev.067595>
PMID:[21828092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828092/)
97. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 2011; 138:3625–37.
<https://doi.org/10.1242/dev.064162>
PMID:[21828091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828091/)
98. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*. 2011; 138:

- 3647–56.
<https://doi.org/10.1242/dev.067587>
PMID:[21828093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21828093/)
99. Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6:246.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00246>
PMID:[25295003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25295003/)
100. Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med.* 2015; 21:76–80.
<https://doi.org/10.1038/nm.3710> PMID:[25501907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25501907/)
101. Gutierrez-Salmeán G, Ciaraldi TP, Nogueira L, Barboza J, Taub PR, Hogan MC, Henry RR, Meaney E, Villarreal F, Ceballos G, Ramirez-Sanchez I. Effects of (-)-epicatechin on molecular modulators of skeletal muscle growth and differentiation. *J Nutr Biochem.* 2014; 25:91–94.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.09.007>
PMID:[24314870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24314870/)
102. Malaguti M, Angeloni C, Hrelia S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; 2013:825928.
<https://doi.org/10.1155/2013/825928>
PMID:[23983900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23983900/)
103. Dirks A, Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282:R519–27.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00458.2001>
PMID:[11792662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11792662/)
104. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, Chung HY, Giovannini S, Leeuwenburgh C. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129:542–49.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.05.005>
PMID:[18579179](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18579179/)
105. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu Rev Physiol.* 2019; 81:19–41.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114310> PMID:[30216742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30216742/)
106. Anagnostou ME, Hepple RT. Mitochondrial Mechanisms of Neuromuscular Junction Degeneration with Aging. *Cells.* 2020; 9:197.
<https://doi.org/10.3390/cells9010197>
PMID:[31941062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31941062/)
107. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999; 98: 115–24.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
PMID:[10412986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10412986/)
108. Ji LL, Kang C. Role of PGC-1 α in sarcopenia: etiology and potential intervention - a mini-review. *Gerontology.* 2015; 61:139–48.
<https://doi.org/10.1159/000365947> PMID:[25502801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25502801/)
109. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res.* 2010; 87:449–58.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvq080> PMID:[20211864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211864/)
110. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell.* 2006; 127:397–408.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
PMID:[17055439](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17055439/)
111. Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature.* 2008; 451:1008–12.
<https://doi.org/10.1038/nature06613>
PMID:[18288196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18288196/)
112. Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:20405–10.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0911570106>
PMID:[19918075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19918075/)
113. Ruas JL, White JP, Rao RR, Kleiner S, Brannan KT, Harrison BC, Greene NP, Wu J, Estall JL, Irving BA, Lanza IR, Rasbach KA, Okutsu M, et al. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell.* 2012; 151:1319–31.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.050>
PMID:[23217713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23217713/)
114. Derbré F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE, Tresguerres JA, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Viña J. Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise

- training. *Age (Dordr)*. 2012; 34:669–79.
<https://doi.org/10.1007/s11357-011-9264-y>
PMID:21590341
115. Feng H, Kang C, Dickman JR, Koenig R, Awoyinka I, Zhang Y, Ji LL. Training-induced mitochondrial adaptation: role of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , nuclear factor- κ B and β -blockade. *Exp Physiol*. 2013; 98:784–95.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.069286>
PMID:23104933
116. Jones RA, Harrison C, Eaton SL, Llavero Hurtado M, Graham LC, Alkhamash L, Oladiran OA, Gale A, Lamont DJ, Simpson H, Simmen MW, Soeller C, Wishart TM, Gillingwater TH. Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep*. 2017; 21:2348–56.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>
PMID:29186674
117. Gallart-Palau X, Tarabal O, Casanovas A, Sábado J, Correa FJ, Hereu M, Piedrafita L, Calderó J, Esquerda JE. Neuregulin-1 is concentrated in the postsynaptic subsurface cistern of C-bouton inputs to α -motoneurons and altered during motoneuron diseases. *FASEB J*. 2014; 28:3618–32.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-248583> PMID:24803543
118. Tarabal O, Caraballo-Mirallas V, Cardona-Rossinyol A, Correa FJ, Olmos G, Lladó J, Esquerda JE, Calderó J. Mechanisms involved in spinal cord central synapse loss in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014; 73:519–35.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000074>
PMID:24806302
119. Cerveró C, Blasco A, Tarabal O, Casanovas A, Piedrafita L, Navarro X, Esquerda JE, Calderó J. Glial Activation and Central Synapse Loss, but Not Motoneuron Degeneration, Are Prevented by the Sigma-1 Receptor Agonist PRE-084 in the Smn2B/- Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018; 77:577–97.
<https://doi.org/10.1093/jnen/nly033> PMID:29767748
120. 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.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015457>
PMID:21085654
121. Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, Alvarez FJ, Sumner CJ, O'Donovan MJ. Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neuron*. 2011; 69:453–67.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.032>
PMID:21315257
122. Milan L, Courtand G, Carroit L, Masmajeán F, Barrière G, Cazalets JR, Garret M, Bertrand SS. Age-Related Changes in Pre- and Postsynaptic Partners of the Cholinergic C-Boutons in Wild-Type and SOD1G93A Lumbar Motoneurons. *PLoS One*. 2015; 10:e0135525.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135525>
PMID:26305672
123. Sunico CR, Domínguez G, García-Verdugo JM, Osta R, Montero F, Moreno-López B. Reduction in the motoneuron inhibitory/excitatory synaptic ratio in an early-symptomatic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. 2011; 21:1–15.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2010.00417.x>
PMID:20653686
124. Saxena S, Roselli F, Singh K, Leptien K, Julien JP, Gros-Louis F, Caroni P. Neuroprotection through excitability and mTOR required in ALS motoneurons to delay disease and extend survival. *Neuron*. 2013; 80:80–96.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.027>
PMID:24094105
125. Pullen AH, Athanasiou D. Increase in presynaptic territory of C-terminals on lumbar motoneurons of G93A SOD1 mice during disease progression. *Eur J Neurosci*. 2009; 29:551–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06602.x>
PMID:19187267
126. 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; 106:2450–70.
<https://doi.org/10.1152/jn.01095.2010>
PMID:21832035
127. Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ. Normal distribution of VGLUT1 synapses on spinal motoneuron dendrites and their reorganization after nerve injury. *J Neurosci*. 2014; 34:3475–92.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4768-13.2014>
PMID:24599449
128. Salvany S, Casanovas A, Tarabal O, Piedrafita L, Hernández S, Santafé M, Soto-Bernardini MC, Calderó J, Schwab MH, Esquerda JE. Localization and dynamic changes of neuregulin-1 at C-type synaptic boutons in association with motor neuron injury and repair. *FASEB J*. 2019; 33:7833–51.
<https://doi.org/10.1096/fj.201802329R>
PMID:30912977
129. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev*. 2000; 80:767–852.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.767>
PMID:10747207

130. Dearnorff AS, Romer SH, Sonner PM, Fyffe RE. Swimming against the tide: investigations of the C-bouton synapse. *Front Neural Circuits*. 2014; 8:106. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00106> PMID:25278842
131. Roselli F, Caroni P. From intrinsic firing properties to selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2015; 85:901–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.063> PMID:25741719
132. Nijssen J, Comley LH, Hedlund E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2017; 133:863–85. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1708-8> PMID:28409282
133. Chen HH, Hippenmeyer S, Arber S, Frank E. Development of the monosynaptic stretch reflex circuit. *Curr Opin Neurobiol*. 2003; 13:96–102. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00006-0) PMID:12593987
134. Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016; 323: 170–82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007> PMID:25595973
135. Spittau B. Aging Microglia-Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2017; 9:194. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00194> PMID:28659790
136. Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol*. 2011; 10: 253–63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70015-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70015-1) PMID:21349440
137. Papadimitriou D, Le Verche V, Jacquier A, Ikiz B, Przedborski S, Re DB. Inflammation in ALS and SMA: sorting out the good from the evil. *Neurobiol Dis*. 2010; 37:493–502. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.005> PMID:19833209
138. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017; 35:441–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358> PMID:28226226
139. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2018; 21:1359–69. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x> PMID:30258234
140. Giorgetti E, Panesar M, Zhang Y, Joller S, Ronco M, Obrecht M, Lambert C, Accart N, Beckmann N, Doelemeyer A, Perrot L, Fruh I, Mueller M, et al. Modulation of Microglia by Voluntary Exercise or CSF1R Inhibition Prevents Age-Related Loss of Functional Motor Units. *Cell Rep*. 2019; 29: 1539–54.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.003> PMID:31693894
141. Haynes SE, Höllopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*. 2006; 9:1512–19. <https://doi.org/10.1038/nn1805> PMID:17115040
142. Mildner A, Huang H, Radke J, Stenzel W, Priller J. P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*. 2017; 65:375–87. <https://doi.org/10.1002/glia.23097> PMID:27862351
143. Klein B, Mrowetz H, Barker CM, Lange S, Rivera FJ, Aigner L. Age Influences Microglial Activation After Cuprizone-Induced Demyelination. *Front Aging Neurosci*. 2018; 10:278. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00278> PMID:30297998
144. Odoemelam CS, Percival B, Wallis H, Chang M-W, Ahmad Z, Scholey D, Burton E, Williams IH, Kamerlin CL, Wilson PB. G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC Advances*. 2020; 10:36337–48. <https://doi.org/10.1039/D0RA08003A>
145. Rotterman TM, Akhter ET, Lane AR, MacPherson KP, García VV, Tansey MG, Alvarez FJ. Spinal Motor Circuit Synaptic Plasticity after Peripheral Nerve Injury Depends on Microglia Activation and a CCR2 Mechanism. *J Neurosci*. 2019; 39:3412–33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2945-17.2019> PMID:30833511
146. Casanovas A, Salvany S, Lahoz V, Tarabal O, Piedrafita L, Sabater R, Hernández S, Calderó J, Esquerda JE. Neuregulin 1-ErbB module in C-bouton synapses on somatic motor neurons: molecular compartmentation and response to peripheral nerve injury. *Sci Rep*. 2017; 7:40155. <https://doi.org/10.1038/srep40155> PMID:28065942
147. Miller RA, Nadon NL. Principles of animal use for gerontological research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000; 55:B117–23.

<https://doi.org/10.1093/gerona/55.3.b117>

PMID:[10795715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10795715/)

148. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2012; 2:145–65.

<https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>

PMID:[22822473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22822473/)

149. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10:519–29.

<https://doi.org/10.1038/nrn2652> PMID:[19513088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19513088/)

150. Navarro X, Udina E, Ceballos D, Gold BG. Effects of FK506 on nerve regeneration and reinnervation after graft or tube repair of long nerve gaps. *Muscle Nerve.* 2001; 24:905–15.

<https://doi.org/10.1002/mus.1088>

PMID:[11410918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11410918/)

151. Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R, Navarro X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol.* 2011; 122:1660–70.

<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.01.045>

PMID:[21354365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21354365/)

152. Bonetto A, Andersson DC, Waning DL. Assessment of muscle mass and strength in mice. *Bonekey Rep.* 2015; 4:732.

<https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.101>

PMID:[26331011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26331011/)

153. Hebel R, Stromberg MW. *Myology. Anatomy of the laboratory rat.* Baltimore, U.S.A.: Williams and Wilkins Company, pp.18–42.

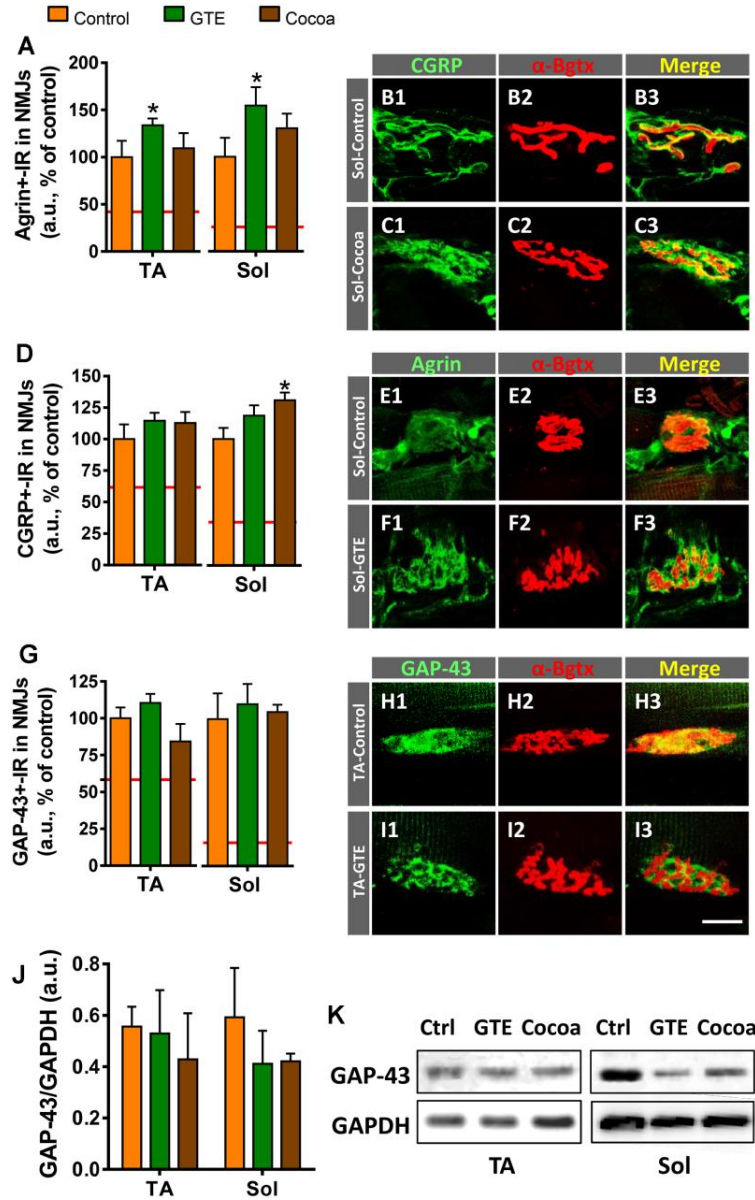
154. Cerveró C, Montull N, Tarabal O, Piedrafita L, Esquerda JE, Calderó J. Chronic Treatment with the AMPK Agonist AICAR Prevents Skeletal Muscle Pathology but Fails to Improve Clinical Outcome in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy. *Neurotherapeutics.* 2016; 13:198–216.

<https://doi.org/10.1007/s13311-015-0399-x>

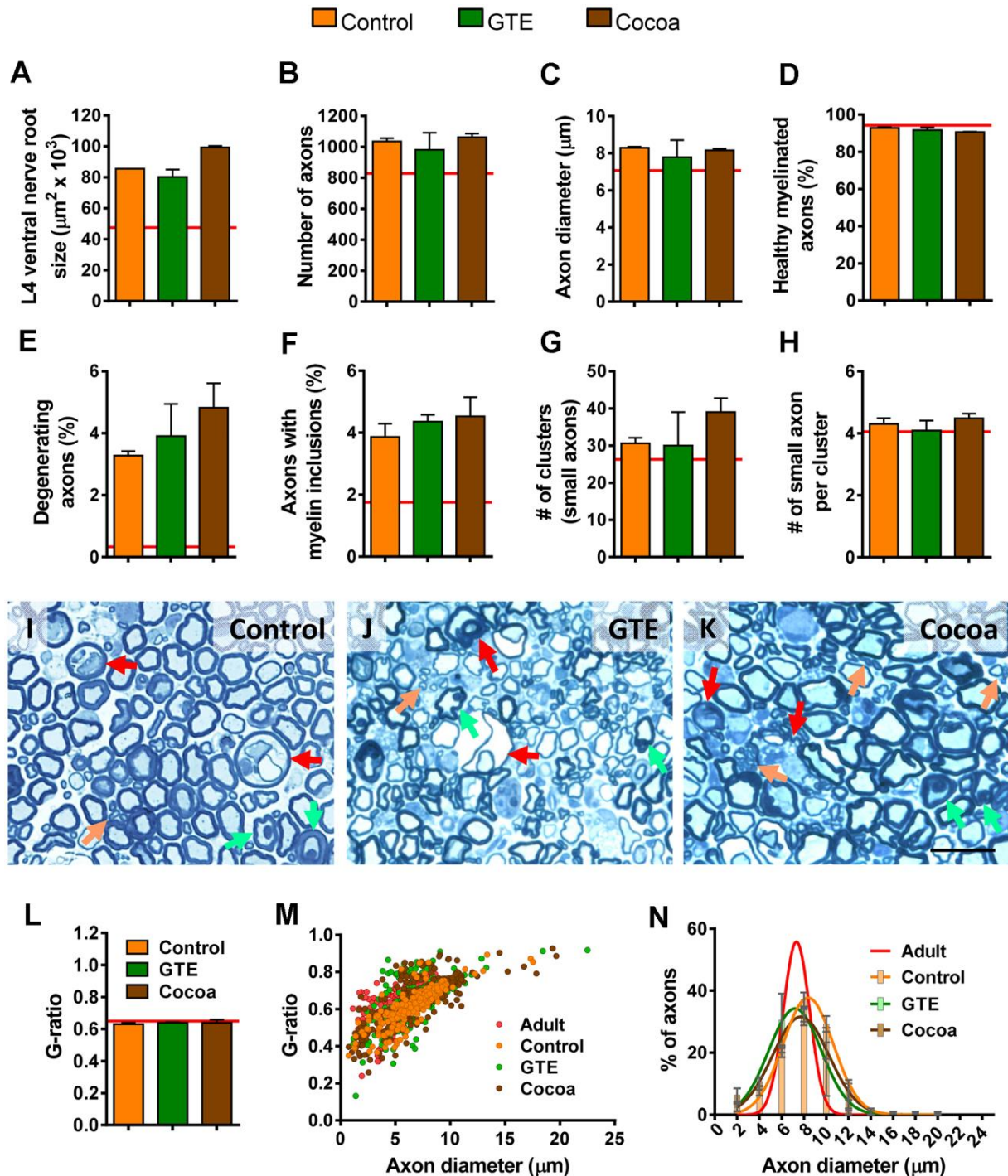
PMID:[26582176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26582176/)

SUPPLEMENTARY MATERIALS

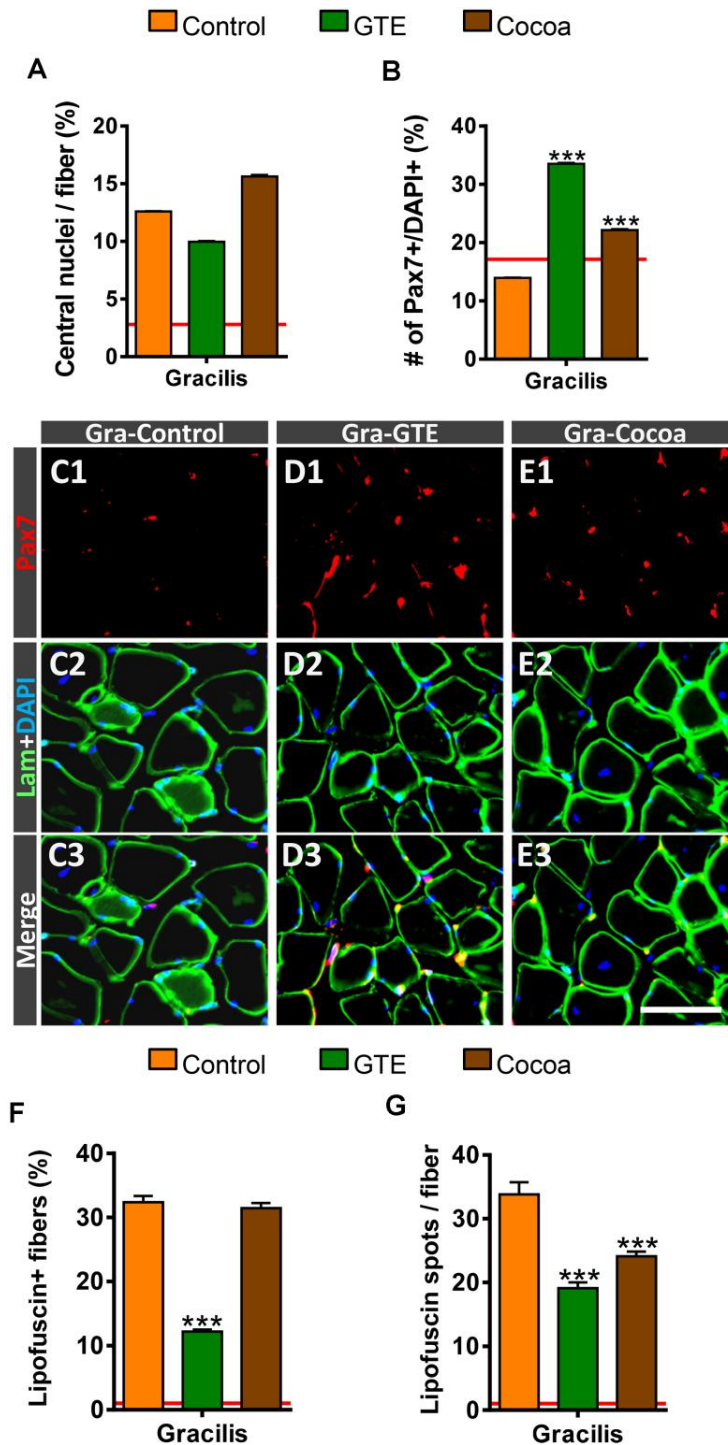
Supplementary Figures



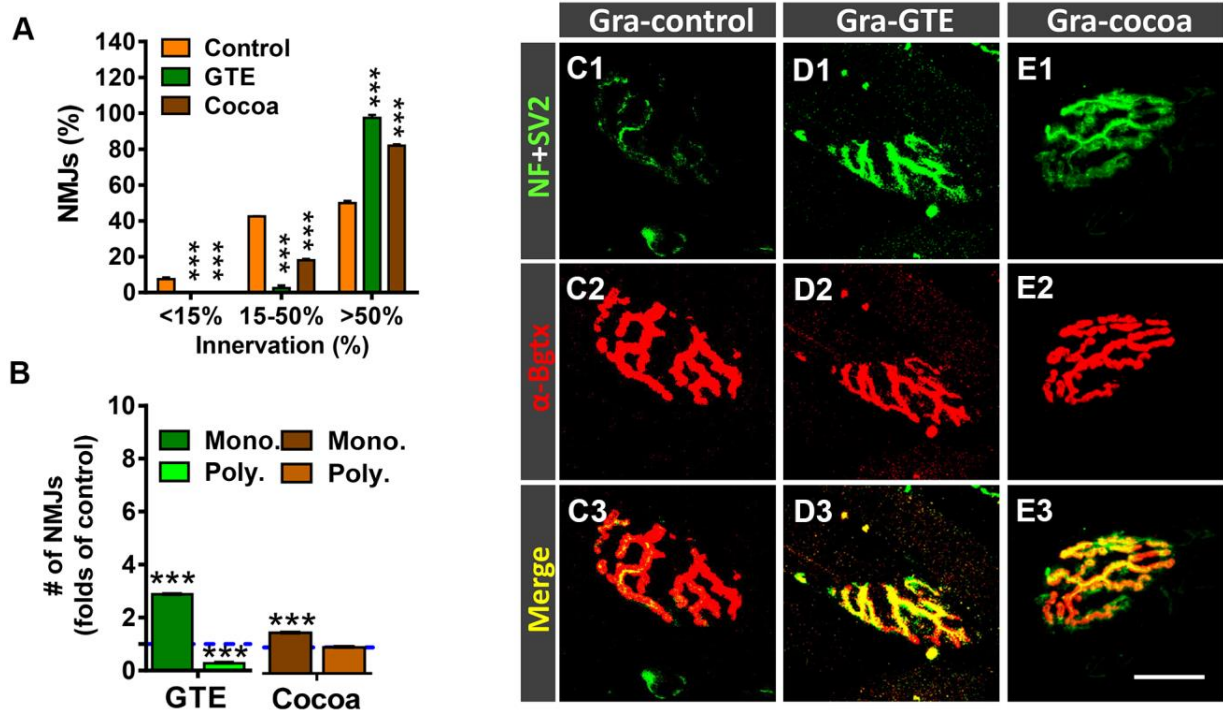
Supplementary Figure 1. Effects of GTE- and cocoa-supplemented diets on CGRP, agrin and GAP-43 expression in NMJs of aged muscles. The quantification of CGRP- (A) agrin- (D) and GAP-43- (G) immunoreactivity (IR, arbitrary units, [a.u.]) in NMJs of TA and Sol muscles from control, GTE and cocoa groups is shown. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM, and shown as the percentage of change compared with controls; two-way ANOVA, Bonferroni's; *post hoc* test 40-70 NMJs per muscle type were examined; one TA and Sol muscle per animal (3, control; 4 GTE; and 5 cocoa) were used for analysis. (B1–C3, E1–F3, H1–I3) Representative confocal micrographs of NMJs from Sol and TA muscle sections immunolabeled for either, CGRP, agrin or GAP-43 (all in green), as indicated; sections were also stained with α -Bgtx (red) for endplate visualization. Note the slightly, although non-significant increase in agrin-immunoreactivity at NMJs, particularly of Sol muscles, of animals fed with the GTE-supplemented diet. (J) Densitometric analysis of GAP-43 content in TA and Sol muscles of animals belonging to the three experimental groups; data were normalized to GAPDH. Bars represent the values (mean \pm SEM) of 3 mice per condition from 2 independent western blot analysis; two-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test). (K) Representative western blots of GAP-43 and GAPDH (as loading control) proteins in TA and Sol muscles from mice of control (Ctrl), GTE and cocoa groups. Scale bar in I3 = 20 μ m (valid for B1–C3, E1–F3, H1–I2).



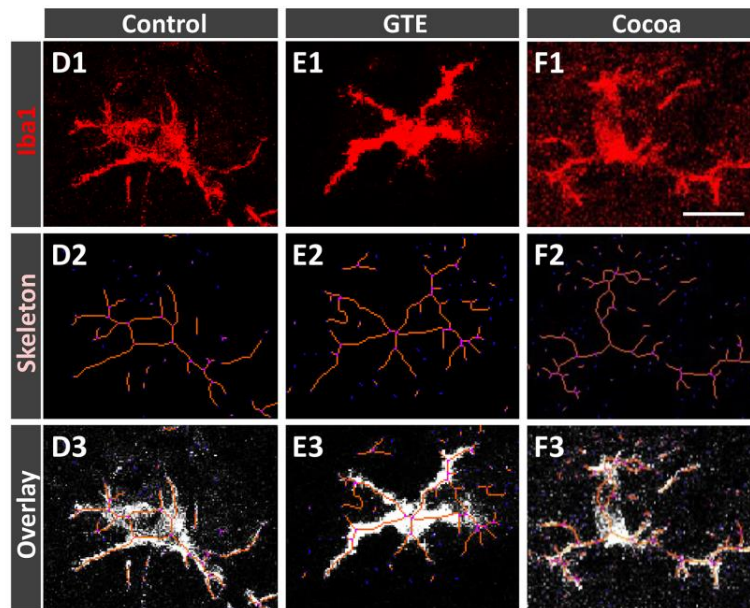
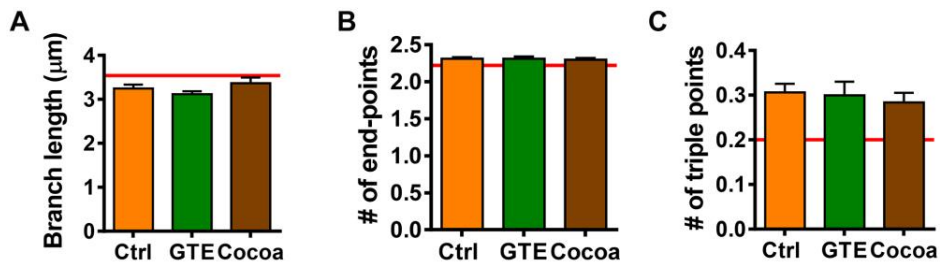
Supplementary Figure 2. Effects of GTE- and cocoa-supplementations in motor axons of aged mice. Analysis was performed in L4 VRs. (A–C) VR size (in μm^2 , A), total number of axons (B) and axon diameter (including myelin sheath, in μm , [C]) in VRs. (D–F) Proportion of healthy myelinated axons (D), axons exhibiting a degenerate appearance (E), and those with myelin inclusions (F). (G, H) Number of small ($\leq 6 \mu\text{m}$ diameter) axon clusters (≥ 3 axons) (G) and number of small axons per cluster (H) in VRs. (I–K) Representative images of methylene blue-stained semithin cross-sections of VRs from mice belonging to control (I), GTE (J) and cocoa (K) groups; arrows indicate: degenerating axons (red), axons with myelin inclusions (green) and clusters of small axons (orange). (L, M) Quantification of myelin thickness by *g*-ratio analysis (L) and scatter plot depicting *g*-ratios in relation to axon diameter in (M) VRs. (N) Relative frequency of myelinated axon diameter (in μm); note the slight displacement to left of GTE and cocoa curves, indicative of a diameter reduction of motor axons of animals subjected to dietary flavonoid intake. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM of 3 VRs from different mice per condition. Scale bar in (K) = 25 μm (valid for [I] and [J]).



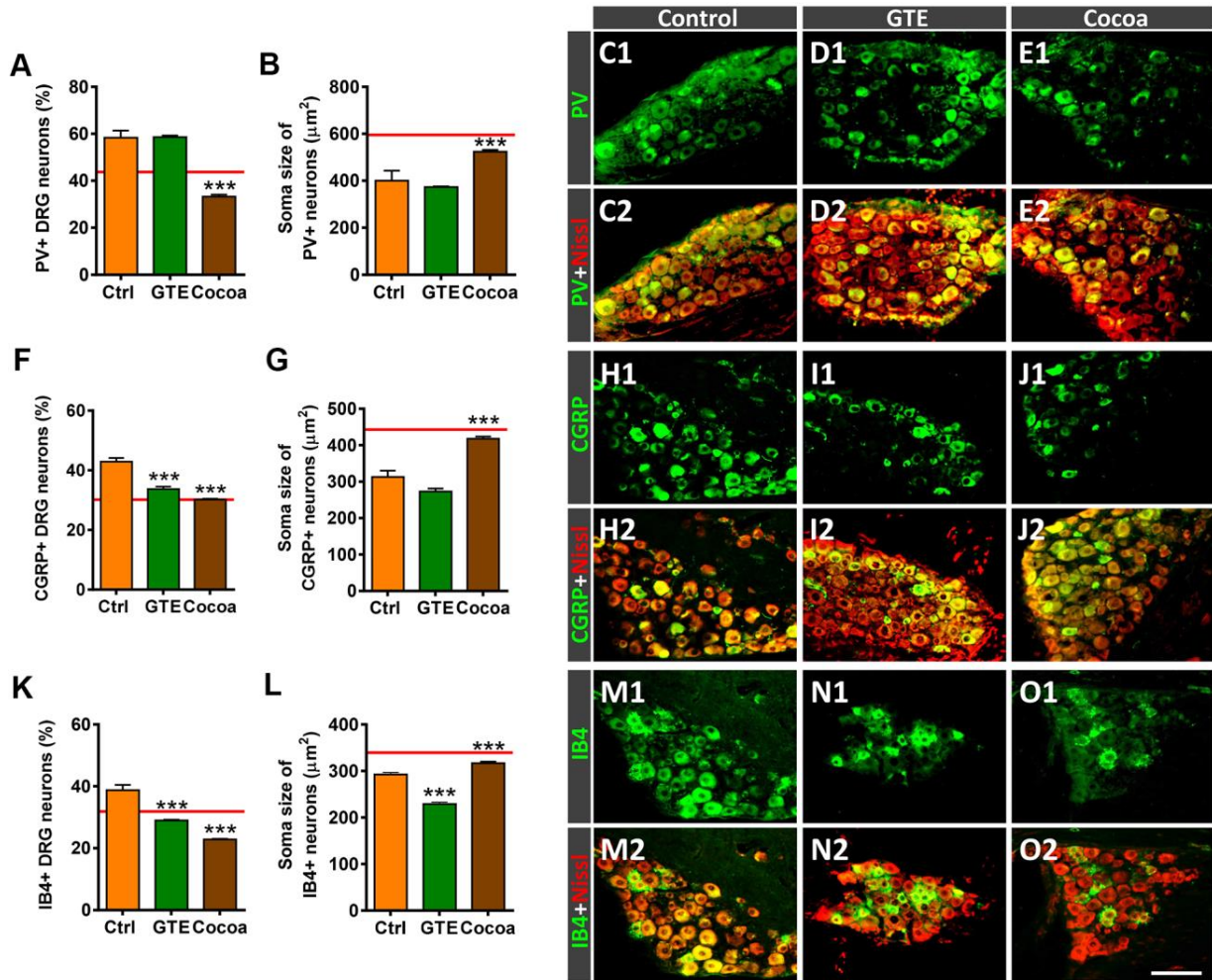
Supplementary Figure 3. Effects of GTE- and cocoa-supplemented diets on aging-associated changes in the proximal hindlimb Gra muscle. (A) Proportion of myofibers displaying central nuclei. (B) Percentage of Pax7-immunostained cells (SCs) with respect to DAPI-positive nuclei. Representative images of a combined immunolabeling for Pax7 (red) and laminin (green), and DAPI staining (blue) in transversal cryosections of Gra muscles from control, GTE and cocoa groups, as indicated. (F, G) Percentage of myofibers containing lipofuscin aggregates (F), and average number of lipofuscin granules per myofiber (G). Data in graphs are expressed as the mean \pm SEM. The average values of different parameters analyzed in adult Gra muscles in a previous study [6] were indicated by a red line in each graph for comparative purposes. *** $p < 0.001$ vs. control (Ctrl), two-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; sample size (myofibers): (A) = 1500-2500, (B) = 1700-2200, (F, G) = 1200-1700, from 3-5 mice per condition. Scale bars: 40 μ m in E3 (valid for C1-E2).



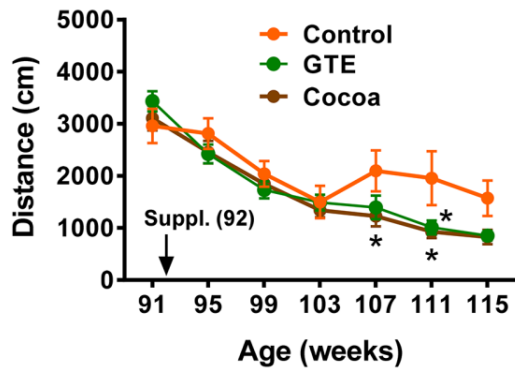
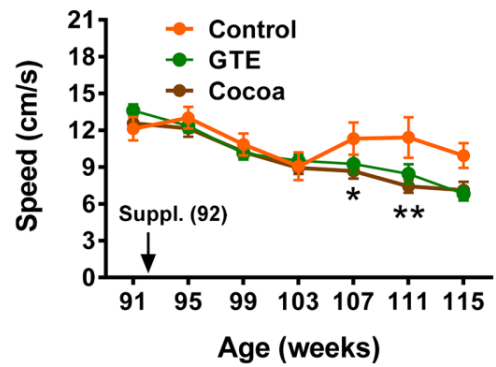
Supplementary Figure 4. Changes in the innervation degree of NMJs of Gra muscle in animals fed with GTE- or cocoa-supplemented diets. (A) Proportion of NMJs displaying different degrees of innervation; quantification was based on the percentage of α -Bgtx-labeled postsynaptic site area covered by SV2-immunostained presynaptic terminals (see Materials and Methods, <15% innervation was considered as denervated). (B) Number of NMJs exhibiting single (mono.) or multiple (poly.) innervation expressed as the percentage of control (blue dashed line). (C1–E3) Representative maximal projections of confocal stacks of NMJs from mice of control, GTE and cocoa groups (as indicated in panels); muscle sections were stained with antibodies against NF and SV2 (green, for presynaptic nerve terminals), and α -Bgtx (red, for postsynaptic AChR). Data in graphs are expressed as the mean \pm SEM, *** p < 0.001 vs. control, one or two-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test; sample size: 40-64 NMJs per muscle from 3-5 animals per condition. Scale bar in (E3) = 20 μ m (valid for C1–E2).



Supplementary Figure 5. Morphometric analysis of microglial complexity by using the skeleton approach (see Materials and Methods). The average branch length (in μm) (A), number of endpoints (B) and triple points (C) are shown in graphs. (D1–F3) Representative images showing Iba1-positive profiles (D1–F1), the skeletonized images (D2–F2), and the overlay of the skeleton and the original image of microglia (D3–F3) in control, GTE and cocoa groups as indicated in panels. Data in the graphs are expressed as the mean \pm SEM; spinal cords of 3 control (Ctrl)-, 4 GTE- and 5 cocoa-group animals were used for analysis; a total of 50-130 images per experimental group were examined; the average values of the different parameters analyzed in adult animals [6] are shown in graphs as a red line for comparison. Scale bar in F1 = 50 μm (valid for D1, E1).



Supplementary Figure 6. Impact of GTE- and cocoa-supplemented diets in age-related changes in DRG sensory neurons. Proportion (A, F, K) and soma area (in μm^2 , B, G, L) of neurons expressing PV (A, B) or CGRP (F, G), or stained with IB4 (K, L). (C1–E2, H1–J2, M1–O2) Representative micrographs obtained from DRG cryostat sections processed for PV, CGRP and IB4 staining (green) as indicated in panels; sections were also counterstained with fluorescent Nissl (red) for neuron visualization. Data in graphs are expressed as the mean \pm SEM, $***p < 0.001$ vs. control (Ctrl) (one-way ANOVA, Bonferroni's *post hoc* test); 30-80 images for each condition were analyzed; number of DRG examined: Ctrl = 2, GTE = 3, cocoa = 5 from different animals; the red lines in graphs indicate the mean values in adult mice [6]. Scale bar: in O2 = 100 μm (valid for C1–E2, H1–J2, M1–O1).

A**B**

Supplementary Figure 7. Motor behavior analysis. Motor performance shown as the distance (in cm, **A**) and average speed (cm/s, **B**) assessed by the open-field test in mice from the three groups during the experimental period; the age-related decline in motor performance observed in the animals subjected to the standard (control) diet was not prevented by either GTE or cocoa supplementations; conversely, open-field parameters were even worsened in mice subjected to these dietary supplementations. Data are shown as the mean \pm SEM (number of animals per group: 91 weeks of age, $n = 15$ in all groups; 107 weeks, control $n = 8$, GTE $n = 13$; cocoa $n = 15$; 114 weeks, control $n = 6$, GTE $n = 12$, cocoa $n = 11$); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control; multiple t -test.

Supplementary Table

Supplementary Table 1. Results from motor and sensory nerve conduction tests performed in old mice (24 months) fed with a standard (AIN-93M) diet (control), or the AIN-93M diet supplemented with either GTE- or cocoa flavanols.

Parameter	Old control (n=7)	Old GTE (n=5)	Old cocoa (n=5)
TA Lat peak (ms)	1.55 ± 0.08	1.52 ± 0.03	1.48 ± 0.02
TA CMAP (mV)	50.5 ± 2.7	47.0 ± 4.9	53.4 ± 4.7
SMUA (mV)	1.20 ± 0.08	1.01 ± 0.04	1.18 ± 0.12
MUNE	40.8 ± 1.5	44.5 ± 2.6	44.9 ± 0.7
PL Lat peak (ms)	2.44 ± 0.19	2.64 ± 0.07	2.34 ± 0.10
PL CMAP (mV)	4.60 ± 0.55	4.22 ± 0.75	4.80 ± 0.58
PL H wave Lat (ms)	6.92 ± 0.40	7.51 ± 0.36	6.52 ± 0.21
PL H/M ratio (%)	32.1 ± 3.6	28.0 ± 8.8	17.8 ± 3.3
DgN Lat (ms)	1.39 ± 0.06	1.29 ± 0.07	1.32 ± 0.05
DgN CNAP (µV)	29.1 ± 1.8	31.0 ± 5.4	32.0 ± 4.7
Weight (g)	29.7 ± 0.7	25.1 ± 1.3	27.8 ± 0.9

TA, tibialis anterior muscle; PL, plantar interosseus muscle; DgN, 4th digital nerve; Lat, latency at the peak of the wave; CMAP, compound muscle action potential; CNAP, compound nerve action potential; MUNE, motor unit number estimation; SMUA, singer motor unit amplitude.

Statistical comparisons between groups were performed with one-way ANOVA (Bonferroni's *post hoc* test); no significant differences were found.

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair als meus directors de tesi, el Dr. Jordi Calderó i la Dra. Olga Tarabal, haver-me ofert l'oportunitat de realitzar aquesta tesi al laboratori de patologia neuromuscular experimental, així com per haver-me ensenyat, aconsellat i guiat durant tots aquests anys; a més, al Dr. Josep Esquerda, que ha dirigit el grup durant molt de temps, i a qui acudim cada vegada que tenim algun dubte que sabem que ningú més podrà resoldre. També voldria fer menció de la resta de membres que formen o han format part del grup durant la meva estada: la Dra. i degana Anna Casanovas; la Dra. Sara Hernández, pel seu suport, pels riures entre experiments, cafès i xafardeigs i perquè sé que sempre puc comptar amb ella; la Lúdia Piedrafita, la tècnica del grup; i les companyes de tesi, la Sara Salvany, la Sílvia Gras i l'Alaó Gatiús, per la seva companyonia, el seu ajut en alguns experiments i els seus ànims quan aquests no tenien el final esperat.

A més, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Xavier Navarro per la seva participació en els experiments d'electrofisiologia realitzats a la universitat autònoma de Barcelona, així com als membres d'Abbott, especialment a la Dra. Suzette Pereira i a Alejandro Barranco, pel finançament que ha permès la realització d'aquesta tesi.

També a la diputació de Lleida, pel fet d'haver-me concedit l'ajut de promoció de la recerca en salut per a la finalització de la tesi doctoral.

D'altra banda, he d'agrair a l'Alba Casanovas que m'hagi ajudat a guanyar la guerra contra el *Word* durant la redacció de la tesi i al Jordi Heredia que m'hagi fet un súper disseny per a la portada.

Al grup dels IRBExcursionistes, que tot i que la majoria d'ells ja no formen part de l'IRBLleida i encara fa més temps que no som gaire excursionistes, són d'aquelles persones amb qui saps que, per molt temps que passi, pots comptar-hi quan sigui i per al que sigui.

Finalment, estic molt agraïda als meus pares per l'educació que m'han donat, pel recolzament que he rebut en tot moment, per animar-me a seguir sempre endavant i lluitar per aconseguir els meus propòsits. Perquè me'ls estimo molt i, tot i que el pare m'hagi dit que no han de sortir als agraïments, sé que sense ells jo no hauria arribat fins on soc ara.

Tampoc em puc oblidar del Miquel, que, a diferència del pare, ell sí que m'ha dit "posa'm als agraïments, eeeeh"; i la veritat és que hi ha de ser. Gràcies per haver-me acompanyat durant gran part d'aquest camí, per haver-me ajudat a quantificar durant el confinament aquelles imatges que semblava que no s'acabaven mai; per haver-me fet companyia durant aquelles llargues jornades a l'IRB que s'allargaven fins a l'hora de sopar i, fins i tot, algun cap de setmanana; per haver suportat el meu mal humor en els mals moments i per haver celebrat amb mi els que eren bons.

I en especial a la TATA, que, si hagués estat el dia de la defensa de la meva tesi, l'hauria d'haver avisat mil vegades que no s'aplaudeix al finalitzar l'exposició i que, tot i així, segur que se li hauria escapat un aplaudiment. Porque aunque ya no estás aquí, no hay ni un solo día en que no me acuerde de ti. Te quiero ♥.