



Universitat de Lleida

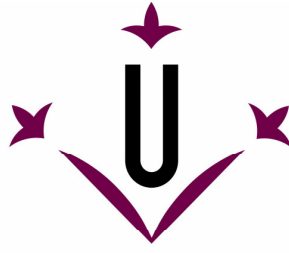
CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA I ASSAIG TERAPÈUTIC EN MODELS MURINS TRANSGÈNICS D'ATRÒFIA MUSCULAR ESPINAL

Elisabet Dachs i Cabanas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Lleida

**CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA I ASSAIG
TERAPÈUTIC EN MODELS MURINS
TRANSGÈNICS D'ATRÒFIA MUSCULAR
ESPINAL**

Tesi presentada per:

Elisabet Dachs i Cabanas

Per optar al títol de doctora en biologia per la
Universitat de Lleida

Sota la direcció de:
Dr. Josep E. Esquerda Colell
Dr. Jordi Calderó Pardo

Dedicada a les persones
que més m'estimo...

AGRAÏMENTS

Com tota història es comença amb hi havia una vegada... una noia que després d'uns anys d'estar per terres angleses va tornar a casa amb els ànims d'embrancar-se a la gran aventura que suposa fer el doctorat. Anava molt perduda i com tantes altres vegades, la M^a Àngels Rigola, amiga i cosina, em va orientar per on tirar. Van ser unes setmanes de passar per molts laboratoris on vaig conèixer gent meravellosa, però malauradament, i com passa massa sovint en aquest país no hi havia diners... No va ser fins que vaig conèixer en Joan Verdaguer que em va presentar un grup de Lleida, grup que em va acollir i on fins avui mateix he estat més de 5 anys unida.

D'entrada, em sembla de justícia agrair a tots els que formen part de FUNDAME, famílies que la genètica els hi ha jugat una mala passada, agrair-los-hi les energies i ganes de buscar fons per tal de trobar una cura per aquesta malaltia, tant devastadora, que pateixen els seus fills; a GENOMA España per haver acceptat el projecte i al Dr. Eduardo Tizzano, una persona excepcional que ha coordinat tot el projecte i que mai acaba les energies. Al grup de neurobiologia cel·lular per haver-me acollit, els que hi eren en aquells moments i que ja no hi són, la Núria, la Carme i l'Inma, als que han arribat nous, el Javi i en Fran i als que aguanten, l'Anna, la Dolo, en Jordi, en Josep, la Lúdia, la Marta, la Montse, l'Olga, la Sara i el Xavi Calomarde. Agrair, també, a l'IrbLleida pel finançament d'aquests últims 6 mesos.

A l'Anna per tenir el pols tan ferm a l'hora de tallar el nervi ciàtic dels ratolins; a la Dolo per compartir les disseccions del LAL; a en Jordi per introduir-me dins el món de les motoneurons i tota l'ajuda rebuda en l'experiment del liti; a la Montse, per tota l'ajuda rebuda i per portar alegria al grup; a la Marta per tenir la gran habilitat, rapidesa i perfecció en tallar les mostres al micròtom i a l'ultramicrotom per citar-ne algunes; a la Lúdia per ser tan eficient, perfeccionista i pel gran treball de qualitat que sempre fa, és un gust treballar al teu costat; a l'Olga per donar-me l'oportunitat d'enfrontar-me, per primera vegada a 140 futurs metges, semblarà una tonteria però em va ajudar a perdre (una mica) la por a parlar en públic; a la Sara per tot, per escoltar-me, per ser-hi sempre; a en Josep per tot el que m'ha ensenyat, que no es poc, no puc descriure l'admiració que sento cap a tu, tant a nivell científic com personal; i a en Javi i en Fran agrair-los-hi l'ajuda rebuda, a nivell informàtic, a portar les colònies de ratolins... i desitjar-los-hi molta sort en l'acabament de les seves tesis.

Agrair, també, a en Jaume l'ajuda per posar en marxa la conducta en els ratolins postnatsals.

A tots per comprendre'm en un dels pitjors moments que he tingut mai com és la desaparició d'una amiga i també per estar amb mi els dies més feliços de la meva vida.

A tots vosaltres, gràcies, ha estat un plaer!

Al grup d'immunologia, especialment a la Conxi i l'Alejandra, per ensenyar-me i ajudar-me en el fantàstic món de la citometria de flux; i a l'Anaïs i a la Rosa per ajudar-me amb el citòmetre. Al servei d'estabulari, per tot el suport rebut al llarg d'aquests anys. Als grups de Reus i de Sevilla per ensenyar-me a dissecar el LAL i el TVA.

Al grup de citogenètica de l'Arnau, en Ricard, l'Eli, la Domi, la Pilar i la Lourdes, gràcies per haver confiat en mi i per donar-me l'oportunitat de retrobar-me amb els cromosomes, per quan m'heu escoltat... per tot, gràcies, sou fantàstics!

A la Sara, la Núria Camats i la Judit Ribas per passar-me tants articles, que m'han fet la feina una mica més fàcil.

A nivell personal, donar les gràcies als amics de tota la vida: A l'Anna Sadurní i a la Belén Sánchez dues fantàstiques filòlogues que m'han ajudat en moments d'ofuscació lingüística, a la Bàrbara, en Manel, la Maira, en Sergi, l'Ester R, a les nenes de la Uni, la Núria la Marta i la Lorena; a la Joy, en John, la Carrie, l'Andrew i la May; a la colla de Ponts, en Josep, en Jaume, en Jordi, l'Ester B., la Marta..., a tots vosaltres que m'heu escoltat sempre que ho he necessitat, i que m'heu entès les vegades que no hem pogut quedar, que he hagut de marxar abans... A la Maribel, pels tangos, valsos, boleros... pels dimecres a la nit que sortim de classe carregats d'energia i oxigen; a en Ramon, per escoltar-me i ajudar-me. A la Isabel, que ens va deixar massa, massa aviat...

A l'Olga, l'Andrés, al Marc i al Xavi per obrir-me les portes de casa seva tantes vegades.

A la família Nicolau Talavera, L'Elisabet, en Joan, i als petitons de la casa, en Joan i la Cèlia, i a la Maria (l'àvia), per totes les vegades que m'heu i ens heu acollit a casa vostra, i per deixar-nos formar part de la vostra família.

A Victoria y a Mark, por todo lo compartido, sabeis lo importante que sois para mi!

Donar les gràcies a tota la meva família per entendre'm, escoltar-me i donar-me suport cada vegada que he pres una decisió, tot i que potser no hagi estat la més encertada. A la meva mare que m'ha aguantat tots els meus mals humors (i alegries..) i

que per molt que sigui un tòpic, ets la millor! Al meu pare, que des de les altures podrà celebrar, per fi, el que un dia havia desitjat. A la Mercè i a l'Ernesta, per acollir-me des del primer dia com a una filla i neta. I en Joan, per tot, per ser com ets, per comprendre'm, ajudar-me.. per "lo" fàcil que és compartir la meva vida amb tu, i pel nostre petit/a que sense saber-ho m'ha estat acompanyant gairebé des del primer dia que em vaig asseure a escriure, és indescriptible l'emoció que desperta la primera vegada que vàrem veure com et movies.

Molta més gent ha format part de mi al llarg de la vida, i tots ells han ajudat a que avui estigui aquí, i encara que no us mencioni, sempre us tinc presents.

GRÀCIES A TOTS!

3.1.3.1 Correlació entre l'AME i els defectes d'SMN en les snRNPs en <i>spliceosome</i> menor	56
3.1.4 SMN i la regulació del citoesquelet	58
3.1.4.1 Afectació dels microtúbuls	59
3.1.4.2 Afectació de l'actina	59
3.1.5 SMN en la transcripció	62
3.1.6 SMN i l'estrès	62
3.1.6.1 Estrès oxidatiu	63
3.1.7 SMN i l'apoptosi	63
3.1.8 SMN i la banda Z del múscul	65
4 Gens modificadors	65
4.1 Plastina 3	66
4.2 SMN2 com a gen modificador	67
4.3 ZPR1 com a gen modificador	68
4.4 NAIP com a possible gen modificador	69
4.5 Altres gens modificadors	69
5 Models animals en l'AME	70
5.1 Invertebrats	70
5.1.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	71
5.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	71
5.2 Vertebrats	73
5.2.1 <i>Xenopus laevis / tropicalis</i>	73
5.2.2 <i>Danio rerio</i>	74
5.2.3 <i>Mus musculus</i>	76
6 SMN i el sistema neuromuscular	77
6.1 La Motoneurona	77
6.2 Desenvolupament del sistema neuromuscular	77
6.2.2 La PCD en l'AME	78
6.2.2 Cèl·lules satèl·lit	79
6.2.2.1 Les cèl·lules satèl·lit i el gen SMN	81
6.2.3 Macròfags	82
6.3 Motoneurona <i>versus</i> múscul com a causa principal de l'AME	83
6.3.1 SMN en la Motoneurona	84

6.3.2 SMN en el Múscul	85
6.3.3 Conclusió	87
7 Sinapsis neuromusculars	88
7.1 Diferenciació pre- i postsinàptica	88
7.2 Diferenciació dels terminals presinàptics	90
7.3 Diferenciació dels terminals postsinàptics	92
7.4 Modelatge i maduració de les NMJs	93
7.5 Assemblatge de les zones actives en els terminals presinàptics	94
7.6 Vesícules sinàptiques	97
7.6.1 Composició de les vesícules	98
7.6.2 <i>SMN</i> i les vesícules sinàptiques, zones actives i organització dels microtúbuls a les NMJs	99
7.6.3 Trànsit de vesícules a la membrana	100
7.6.4 Molècules determinants en les ZAs presinàptiques	100
7.6.4.1 Transportador vesicular d'acetilcolina (VACHT)	100
7.6.4.2 Molècules que participen en l'ancoratge i la fusió vesicular	101
7.6.4.2.a Sinaptobrevina/VAMP	101
7.6.4.3 Molècules reguladores de l'exocitosi	102
7.6.4.3.a Munc13	102
7.6.4.3.b Munc18	103
7.6.4.3.c Sinaptotagmina	103
7.6.4.4 Molècules d'estructura/bastida de les ZAs	104
7.6.4.4a Piccolo i Bassoon	104
7.6.4.4b RIM (Rab3A interacting protein)	105
7.6.4.5 Proteïnes vàries per classificar	106
7.6.4.5.a Rab	106
7.6.4.5.b Rabphilina	107
7.6.4.5.c Cystein string proteins (CSP)	107
7.6.4.5.d Synaptophysin (SyPhys)	108
7.6.4.5.e SV2	108
7.6.4.5.f Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)	109
7.6.4.5.g Canals de calci	110
7.7 Afectació de les NMJs en l'AME	111

8 Tractament de l'atròfia muscular espinal	113
8.1 Estratègies terapèutiques en l'AME	115
8.1.1 Teràpia gènica	115
8.1.1.1 Increment de l'expressió d' <i>SMN</i>	115
8.1.1.2 Potenciar la inclusió de l'exó 7 (<i>ASO</i> i <i>trans-splicing</i>)	117
8.1.1.3 Restabliment complet del gen <i>SMN</i>	118
8.1.1.4 Transplantament amb cèl·lules mare	118
8.1.1.5 Suplement neurotròfic i neuroprotecció	120
8.1.2 La proteïna <i>SMN</i> com a diana terapèutica	121
8.1.2.1 Inhibició de la degradació de la proteïna <i>SMN</i>	122
8.1.2.2 Estabilització de la proteïna <i>SMN</i> , potenciant l'estabilització i/o inhibint la degradació d' <i>SMN</i>	122
8.1.3 El múscul com a diana terapèutica	123
8.2 Importància de la restauració primerenca d' <i>SMN</i>	124
8.3 El liti com a tractament de malalties neurodegeneratives	125
8.3.1 Història del liti	125
8.3.2 Dianes moleculars del liti	127
8.3.3 Mecanismes d'acció del liti	128
8.3.3.1 Hipòtesi de la depleció de l'inositol	128
8.3.3.2 Efectes del liti sobre la <i>GSK3</i>	129
8.3.3.3 Efectes del liti sobre la via de senyalització <i>Wnt</i>	130
8.3.3.4 Efectes neuroprotectors del liti	132
8.3.3.5 Efectes del liti sobre la família <i>Bcl-2</i> i <i>Bax</i>	132
8.3.3.6 Efectes del liti sobre l'exitotoxicitat pel glutamat, el kainat i l'estrès de reticle	133
8.3.3.7 Efectes del liti sobre la regulació a l'alça del <i>brain-derived neurotrophic factor</i> (<i>BDNF</i>)	133
8.3.3.8 El liti i l'activació de les vies de senyalització de supervivència cel·lular	134
8.3.3.9 <i>cAMP-responsive element binding protein</i> (<i>CREB</i>)	134
8.3.3.10 El liti i els seus efectes sobre la neurogènesi i la regeneració neuronal	135
8.3.3.10a Mecanismes moleculars de la neurogènesi induïda pel liti	135

8.4 Efectes del liti en malalties no psiquiàtriques	136
8.3.1 Alzheimer i taupaties	136
8.3.2 Diabetis	137
8.3.3 Malaltia de Huntington	138
8.3.4 La síndrome del fràgil X	138
8.3.5 Esclerosi lateral amiotròfica	139
8.3.6 Atròfia muscular espinal	139
V HIPÒTESI I OBJECTIUS	151
VI MATERIALS I MÈTODES	157
9 Llista de productes	159
10 Llista d'anticossos	162
10.1 Anticossos primaris	162
10.2 Anticossos secundaris	165
11 Genotipat SMA tipus I i SMA delta 7	166
12 Dissecció i processament de les mostres	168
13 Mètodes de tinció clàssica	170
13.1 Tinció hematoxilina- Eosina	171
13.2 Tinció amb violeta de Cresil	171
13.3 Tinció PAS	171
14 Tècniques immunocitoquímiques	173
14.1 Immunocitoquímica en seccions de criostat per a fluorescència	173
14.2 Immunocitoquímica en seccions de criostat per a peroxidasa	175
14.3 Whole mount	176
14.4 Marcatge TUNEL	177
14.5 Morfometria	178
14.6 Tractament de les mostres en el microones per a Immunocitoquímica	180
15 Recompte de motoneurons	180
16 Western blot	183
17 Microscòpia electrònica	187
18 Tractament amb liti	189

18.1 Corba de litèmia en ratolins CD1	189
18.2 Procediment d'injecció del LiCl i sèrum fisiològic	190
18.3 Proves de comportament	190
18.3.1 Righting reflex	190
18.3.2 Hind-Limb Suspension test (HLST) o tub test	191
18.3.3 Negative geotaxis	192
19 Citometria de flux	193
20 Processament d'imatges i anàlisi estadística	195
VII RESULTATS	197
21 Fenotip, supervivència i canvis en la medul·la espinal de dos models animals d'atròfia muscular espinal: SMA tipus I i SMAΔ7	201
22 Expressió defectuosa de proteïnes sinàptiques en ratolins SMAT1 i SMAΔ7	207
22.1 Els canals de calci	215
22.2 Expressió defectuosa de proteïnes associades al Rab3A en ratolins prenatals	217
22.3 Estudi de la complexitat de l'aparell postsinàptic en el múscul pla transversus abdominis	219
23 Canvis ultraestructurals en els ratolins SMAT1	225
24 Increment de l'apoptosi en els músculs dels ratolins SMA tipus 1 i SMA delta 7	230
25 Depleció dels macròfags intersticials en SMAT1	237
26 Afectació dels òrgans del sistema immunològic en ratolins SMA tipus 1 i SMA delta7	239
26.1 Estudi de les poblacions de limfòcits al timus amb citometria de flux	241
27 Estudi del tractament amb liti en animals SMA delta7	249
27.1 Millor dosi estimada pel tractament	249
27.2 Efectes del liti en el fenotip AME en ratolins SMA delta7	252
27.3 Efectes del liti en la supervivència i les habilitats motores dels ratolins SMA delta7	253
27.4 Efectes del liti en la motoneurona	256
27.5 Efectes del liti en les proteïnes SMN i GSK	257

27.6 Efectes del liti en el múscul	261
27.7 Toxicitat del liti en els ratolins SMA delta7	262
VIII DISCUSSIÓ	269
IX CONCLUSIONS	285
X REFERÈNCIES	293
XI ANNEX	323

II ABREVIATURES

A

Aa(s)	Aminoàcid (s)
α -Bgtx	α -bungarotixina
AC	Adenilat ciclase
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolina esterasa
AChR	Receptors d'acetilcolina
AchT	Acetilcolina transferasa
AD	Malaltia d'Alzheimer
AME	Atròfia muscular espinal
APP	Proteïna precursora amiloide
ASF	Factor d'splicing alternatiu
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ASO	Oligonucleòtids anti-sentit
AVV	Adeno-virus associat

B

BHE	Barrera hemato-encefèlica
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BPD	Transtorn bipolar

C

CAZ	Matriu del citoesquelet
CB(s)	Coiled Body/ cos de Cajal
CBC	<i>Cap-binding</i> complex
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ChAT	Choline acetyl transferase
CTD	Domini carboxi terminal

D

d	Dia
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DcpS	Scavenger mRNA decapping enzyme
dH ₂ O	Aigua destil.lada
Diaph	Diafragma
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DN	Doble negatives
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DP	Doble positives
Dr	<i>Danio rerio</i>
DRG	Gangli de l'arrel dorsal

E

EDL	Extensor digitalis longus
ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ES	Embryonic stem cells

ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	Exonic Splice Supressor
etOH	Etanol
F	
FL-SMN	Full-length Survival Motor Neuron protein
FBP	FUSE-binding protein
FKN	<i>Fractalkine</i>
G	
GN	Gastrocnemius
GSK3	Glicogen sintasa quinasa 3
H	
H	Hora
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
HDAC	Histone deacetylase
H-E	Hematoxilina-Eosina
HLS	Hind limb score
HStCs	Cèl·lules mare hematopoiètiques
I	
IC	Intercostalis
ICV	Intracerebroventricular
IGF-1	Insulin-like growth factor
Igfals	<i>IGF- binding protein, acid labile subunit</i>
INF	Interferó
ip	Intraperitoneal
iPS	Pluripotencial induïdes
IV	Intravenous
J	
JAK2	Janus quinasa 2
K	
KD	<i>Knocked-down</i>
KO	<i>Knocked-out</i>
L	
LDCV	<i>Large Dense Core Vesicles</i>
LAL	<i>Levator auris longus</i>
Ling	Lingual
M	
Magic factor1	Met-Activating Genetically Improved Chimeric Factor-1

MAPK	<i>Mitogen-activated-protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDC	<i>MP-derived chemokine</i>
ME	Medul·la espinal
MeOH	Methanol
min	minuts
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
mm	mil·lmetres
Mm	<i>Mus musculus</i>
MN(s)	Motoneurona (s)
mRNA	RNA missatger
MSCs	Mesenchymal stem cells
MyHC	Myosin heaavy chain
µm	micres
N	
NAIP	Proteïna inhibidora de l'apoptosi neuronal
NF	Neurofilament
NGF	Factor de creixement nerviós
NGS	Normal goat serum
NHS	Normal horse serum
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMJ(s)	Unions neuro-mucular(s)
NRF2	Transcription factor erythoid 2-related
NSC	Neural Stem cells
NT(s)	Neurotransmissor(s)
NTF	Factor neurotròfic
O	
OH	Alcohol absolut (100°)
P	
PB	Phenylbutyrate
PBH	Regions d'homologia Piccolo/Bassoon
PBS	Phosphate buffer solution
PCD	Mort cel·lular programada
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Factor de creixement derivat de les plaquetes
p.e	Per exemple
PEBP2β	Core-binding factor beta/ polyomavirus enhancer binding protein
2beta	
PFA	Paraformaldehid
PHAX	<i>Phosphorylated adaptor for RNA export</i>
pICln	<i>Chloride conductance regulatory protein</i>
PKA	Proteïna quinasa A
PKC	Proteïna quinasa C
PLS/Pls	Plastina humans/ plastina animals
PRMT	Complex arginin-metiltransferase
PTN	Pleiotropina

PTV(s) Vesícules de transport del Bassoon/Piccolo i vesícules precursors de la zona activa

Q

R

RAN *Ras-related nuclear protein* GTP
REr Reticle endoplasmàtic
RHA ARN de l'helicasa A
RIM Rab3A interacting protein
RIM-BP RIM binding proteins
RNA Àcid Ribonucleic
RNP(s) Ribonucleoproteïna(s)
ROCK Complexes Rho quinasa
ROS Molècules reactives d'oxigen
r.p.m Revoluciones per minut
rRNA RNA ribosòmic
RR Righting reflex
RTK Receptor de tirosina quinasa

S

SB Butirat de sodi
SC Subcutani
scaRNA Small Cajal bodies RNA
SDS Sodium dodecil sulphate
Seg Segons
SF Sèrum Fisiològic
SF2 Factor d'splicing 2
SG Grànuls d'estrès
SOL Soleus/ Soli
SMA Spinal Muscular Atrophy
SLm Proteïnes *Sm-like*
Sm Proteïnes Smith-core
SMN Survival Motor Neuron
SNC Sistema Nerviós Central
snRNA Small nuclear RNA
snoRNA Small nucleolar RNA
snRNP Small nuclear Ribonucleoproteïns
SR Proteïnes d'unió a l'ARNm riques en Serina/arginina
Stat5 Signal transducers and activators of transcription 5
StC Stem cells/cèl·lules mare
Stg Sinaptotagmina
StM Esternomastoideu
SyPhys Sinaptofisina
SyGy Sinaptogirina

T

TA Tibialis anterior
TF Tampó fosfat

TFM	Tissue freezer medium
TGS	<i>Trimethylguanosine sythetase 1</i>
TNF	Tumor necrosis factor
tRNA	RNA transferència
TSA	Trichostatin A
TT	Tube test
TUNEL	Terminal Deoxynucleotydil Transferase dUTP Nick-End Labeling
TVA	Transversus abdominis

U

UPS	Sistema d'ubiquitinització del proteasoma
URNRIP	URN interacting protein

V

VAcHT	Transportador vesicular d'acetilcolina
VAMP2	Synaptobrevina
VDCCs	Canals de calci voltatge depenent
VEGF	Factor de creixement vascular endotelial
VGCC	Voltage gate calcium channels
VGLUT	Transportadors de glutamat
VPA	Valproic acid
vs	<i>versus</i>

W

WB	Western blot
WT	Wild type

X

Xl	<i>Xenoups laevis</i>
Xpo 1	Exportina
Xt	<i>Xenoups tropicalis</i>

Y

Z

ZA(s)	Zona activa(s)
ZBP(s)	Proteïnes d'unió al DNA Z
ZED	Zona electro-densa
ZF	Zinc finger

III RESUMS

RESUM

L'atròfia muscular espinal (AME) és una malaltia d'origen genètic que afecta, majoritàriament a la població infantil. La malaltia cursa amb una mort de les motoneurons α i atròfia muscular. El gen implicat és el survival motor neuron (*SMN*) que està delectonat en un 95% dels casos. El nostre estudi està dividit en dues parts: 1- l'aprofundiment de les alteracions musculars en dos models animals murins transgènics que pateixen les formes més greus d'AME (Tipus 1-2) i 2- estudi dels possibles efectes terapèutics del liti en un d'aquests models d'AME. S'ha trobat alteracions greus en les unions neuromusculars d'animals nous i prenats en marcadors relacionats amb l'ancoratge de les vesícules a la membrana presinàptica, organització dels canals de calci presinàptics i altres proteïnes presinàptiques, desorganització i apoptosi de les cèl·lules musculars, apoptosi massiva del timus i alteracions generalitzades en els òrgans limfoides. L'estudi ultraestructural del múscul ens indica que hi ha una mort, per apoptosi, de les cèl·lules satèl·lit, confirmat amb la tècnica de TUNEL. L'augment de les apoptosi, però no es reflexa en un increment, per altra banda esperat, de la densitat dels macròfags. El tractament amb concentracions terapèutiques del liti no millora l'evolució de la malaltia en els ratolins que manifesten l'AME, s'observa una acumulació progressiva dels nivells de liti, provocant toxicitat en l'animal. L'efecte del liti inhibint la GSK3 no es tradueix en el increment d'expressió d'*SMN*, tal com s'ha deduït d'alguns experiments publicats.

RESUMEN

La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad de origen genético que afecta, mayoritariamente a la población infantil. La enfermedad cursa con muerte de las motoneuronas α y atrofia muscular. El gen implicado es el “survival motor neuron” (*SMN*) que está delecionado en un 95% de los casos. Nuestro estudio está dividido en dos partes: 1 - la caracterización de las alteraciones musculares en dos modelos animales murinos transgénicos que sufren las formas más graves de AME (Tipo 1-2) y 2 - estudio de los posibles efectos terapéuticos del litio en uno de estos modelos. Se han encontrado alteraciones pre y postnatales graves en las sinapsis neuromusculares a nivel de marcadores relacionados con el anclaje de las vesículas en la membrana presináptica, en la organización de los canales de calcio presinápticos y en otras proteínas presinápticas, Asimismo se ha hallado desorganización y apoptosis de las células musculares, apoptosis masiva del timo y alteraciones generalizadas en los órganos linfoides. El estudio ultraestructural del músculo nos revela muerte, por apoptosis, de las células satélite, confirmado con la técnica de TUNEL. El aumento de las apoptosis muscular no conlleva un incremento, por otra parte esperado, de la densidad de los macrófagos. El tratamiento con litio no mejora la evolución de la enfermedad en los ratones con AME. Se observa un incremento progresivo de los niveles de litio, provocando toxicidad en el animal. Por otra parte, el efecto del litio inhibiendo la GSK3 no se traduce en un aumento de la expresión de *SMN*, tal como se ha deducido de algunos experimentos publicados.

SUMMARY

The spinal muscular atrophy (SMA) is a pediatric genetic disease. The SMA is a motor neuron disease that affects the α motor neurons causing its death and muscle atrophy. The gene involved is the survival motor neuron (*SMN*) that is mutated in the 95% of the cases. Our study is divided into two parts: 1 – studies of the neuromuscular junction in two transgenic SMA murine models that develop the most severe forms of SMA (type 1-2) and 2 - study of the possible therapeutic effects of lithium on one of these models of SMA. We found severe alterations in the neuromuscular junctions of newborn animals and also in prenatal markers related to the vesicle docking at the presynaptic membrane, lack of organization of presynaptic calcium channels and defects in the expression of other presynaptic proteins. We found also, disruption and apoptosis of muscular cells, massive apoptosis of the thymus and widespread alterations in lymphoid organs. The ultrastructural study of muscle identifies apoptotic satellite cells that was confirmed by the TUNEL technique. The increase in apoptosis is not followed by the expected increase, in the macrophage density. Treatment with therapeutic concentrations of lithium does not improve the course of the disease in SMA mice. There was a progressive accumulation of lithium, causing toxicity in the animal. The effect of lithium inhibiting GSK3 does not determine an increased expression of *SMN*, as could be deduced from some published experiments.

IV INTRODUCCIÓ

1 Atròfia muscular espinal

L'atròfia muscular espinal (AME), és després de la fibrosi quística, la segona malaltia d'origen genètic i la més freqüent en mortalitat infantil (Lefebvre *et al.*, 1995). La causa de la malaltia és la deleció del gen *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)* en un 95% dels casos, el 5% restant tenen mutacions dins el mateix gen o bé hi ha una conversió del gen *SMN1* a l'*SMN2* (una petita mutació dins l'exó 7 o un canvi en el marc de lectura en *SMN1*). Es caracteritza per un debilitament i atròfia muscular progressiva associat a la degeneració de les motoneurons (MNs) α lumbar i bulbar inferiors (**Fig. 1**; Lunn i Wang, 2008; Markowitz *et al.*, 2012). El gen *SMN1* (o telomèric) juntament amb el gen *SMN2* (o centromèric) es troba al cromosoma 5q13. *SMN2* és una còpia invertida duplicada d'*SMN1* amb la transició d'un nucleòtid C per una T a l'exó 7. Aquesta transició produeix errors a l'*splicing* provocant l'eliminació de l'exó 7 i donant lloc a una proteïna més curta i inestable que es degrada amb molta facilitat (Coady i Lorson, 2011). Els humans i alguns primats tenim dues còpies d'*SMN1* (una a cada al·lel) i 0, 1 o més còpies d'*SMN2* (s'estima que entre un 10 i un 15% de la població no té cap còpia d'*SMN2*). Fins ara no es té constància d'individus sense cap còpia ni d'*SMN1* ni d'*SMN2*, suposadament, perquè no superen la fase de blàstula i moren; de fet, embrions de ratolí amb ambdós gens *Smn* eliminats pateixen una mort pre-implantacional (Schrank *et al.*, 1997). *SMN* és per tant un gen essencial. La gravetat de la malaltia és inversament proporcional a la quantitat de còpies d'*SMN2* i a la presència de gens modificadors (Schrank *et al.*, 1997; Frugier *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000 b; Burghes i Beattie 2009; Markowitz *et al.*, 2012). *SMN* és una proteïna àmpliament estudiada i se'n coneixen múltiples funcions i interaccions amb altres proteïnes. No obstant, diverses preguntes estan per resoldre, és l'AME realment una malaltia de la motoneurona o bé hi ha una afectació muscular prèvia, essent la mort de la MN secundària? En el cas que sigui una malaltia de la motoneurona Monani *et al.* (2000 b) presenten tres propostes: la primera, *SMN* té les mateixes funcions a totes les cèl·lules però les MNs són especialment sensibles a baixos nivells d'*SMN*; la segona, *SMN* té una única funció a les MNs; i la tercera, baixos nivells d'*SMN* a les MNs causen diversos *splicing* erronis crítics per a la supervivència d'aquestes cèl·lules.

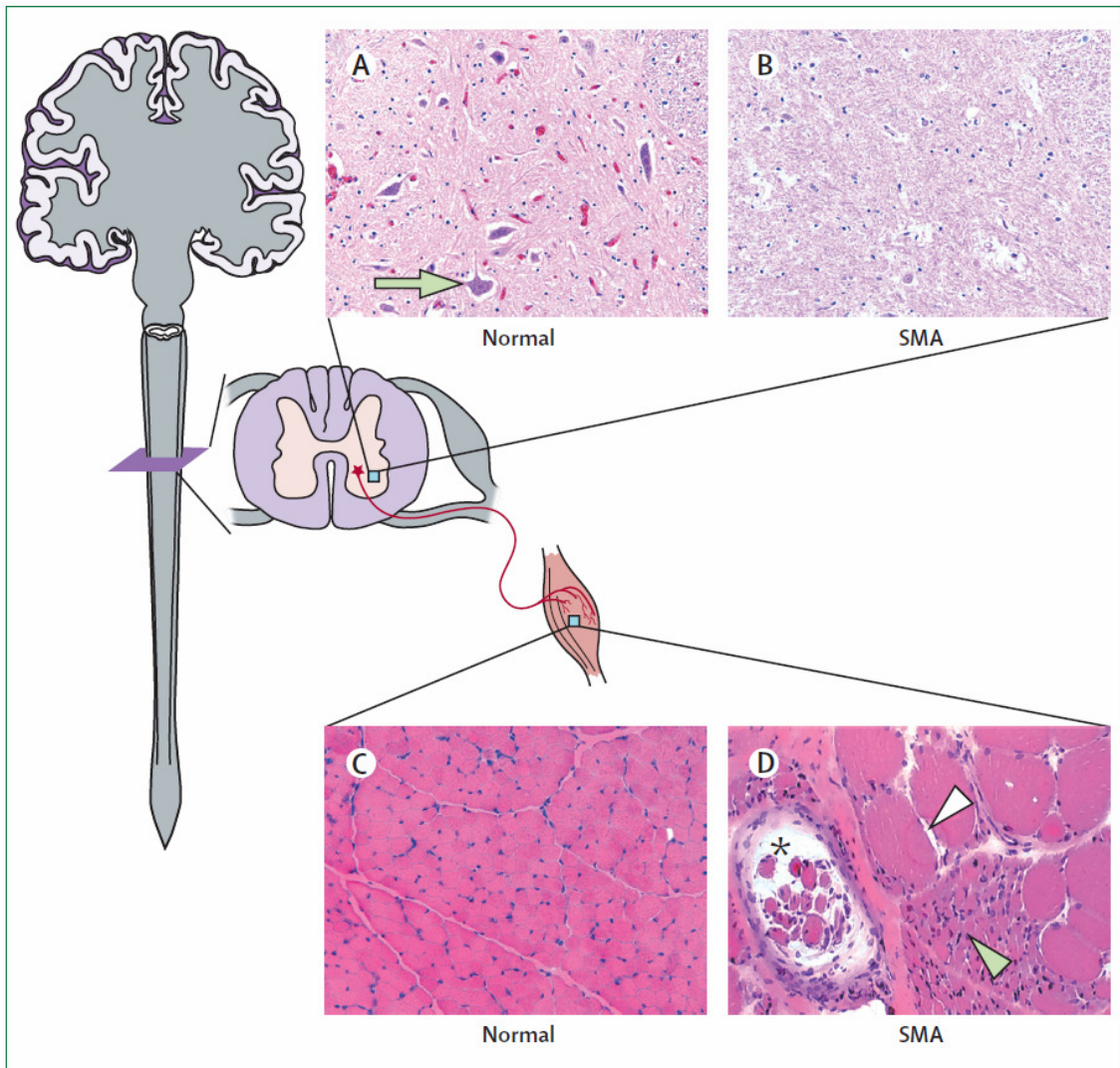


Figura 1. Histopatologia de l'atròfia muscular espinal (AME).

Ordres motors generades a l'escorça cerebral es transmeten a través de la medul·la espinal per les motoneurons (MNs) α per -les neurones motores (cèl·lula vermella a la banya ventral de la medul·la espinal (ME) i fletxa verda en (A). Absència de MNs a la banya ventral de la ME dels pacients AME (B) comparat amb un pacient sa (A). El múscul esquelètic d'un pacient AME (D) mostra fibres hipertròfiques (cap de fletxa buit), envoltada per un grup de cèl·lules atròfiques (punta de fletxa verda) en comparació amb les fibres sanes amb morfologia uniforme en el múscul infantil normal (C). Tot i l'atròfia de les fibres musculars presents a l'AME, els fusos musculars (asterisc negre) no estan afectats i es tornen més evidents (D). Totes les mostres es van tenyir amb hematoxilina i eosina. Lunn i Wang 2008.

1.1 Diagnòstic

Clàssicament, el diagnòstic clàssic de la malaltia es feia a través d'electromiografies que mostraven patrons de denervació, activitat espontània i fibril·lació, amb fasciculacions ocasionals i amb la histopatologia de biòpsies de múscul esquelètic que presentaven alteracions a les fibres musculars: fibres atròfiques i

hipertròfiques (**Fig. 1**) (Fidzianska V, 1990; Lunn *et al.*, 2008). Actualment amb l'aparició de noves tècniques moleculars, el diagnòstic es fa a través de: 1) la *polymerase chain reaction* (PCR) per detectar la presència o no de la mutació; 2) la *polymerase chain reaction-based dose assay* on es detecta la presència total o parcial (és a dir heterozigot per la mutació) o absència del gen *SMN1*; 3) la tècnica *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA), que juntament amb tècniques de seqüenciació es poden detectar individus heterozigots per la deleció i heterozigots per mutació a l'altre al·lel.

Swoboda *et al.* (2005) estudiant nadons amb AME tipus I, detectats per diagnòstic prenatal, va trobar evidències electrofisiològiques de la denervació precipitada associada amb l'inici dels signes o disminució de la funció d'aquests nadons. Es qüestiona per tant, l'*screening* de l'AME en nadons acabats de néixer, com succeeix en el cas de la fenilcetonúria, que és crucial per tal de detectar la malaltia en etapes assintomàtiques i poder començar un tractament abans que hi pugui haver mort neuronal (Markowitz *et al.*, 2012).

1.2 Epidemiologia

La incidència de la malaltia és de 1/6.000-10.000 naixements, essent la freqüència de portadors entre 35-50%. Aquesta freqüència varia en funció dels diferents grups ètnics essent més comú en els humans d'origen caucàsic (2,7%), seguits dels jueus Askhenazi (2,2%), els africans americans (1,8%) i amb menys freqüència els d'origen hispà (0,8%). La baixa incidència de la malaltia comparada amb l'elevada freqüència de portadors suggereix una incidència d'afectats major a la real, aquest fet es pot explicar perquè un elevat percentatge de fetus tindria un genotip amb absència d'*SMN1* i *SMN2* (0/0) conegut en altres espècies com a letal (Schrank *et al.*, 1997; Frugier *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2005; Markowitz *et al.*, 2012).

1.3 Classificació

La classificació dels pacients amb AME sempre s'ha basat en la severitat de la malaltia i en el nombre de còpies d'*SMN2* (**Taula 1**), aquesta classificació, però, és discutible, donat que molts pacients no acaben d'encaixar en cap de les tres formes i

presenten formes intermèdies. Per exemple (p.e.), hi ha famílies amb els dos gens *SMN1* eliminats i amb presència de 5 còpies d'*SMN2* presenten un fenotip normal, mentre que pacients AME tipus III amb el mateix nombre d'*SMN2* presenten fenotip AME, aquest fet es deu a la presència de gens modificadors (Markowitz *et al.*, 2012).

1.3.1 Atròfia muscular espinal tipus 0 o congènita

L'AME tipus 0 o congènita, es presenta en nounats amb hipotonia i debilitat muscular severa. Es manifesta al moment del naixement, probablement amb l'aparició de la malaltia a nivell prenatal i amb una història de baixa freqüència de moviments intrauterins, segons les mares gestants (Dubowitz *et al.*, 1999). Un estudi acurat dels moviments fetals amb tècniques d'ultrasons 2D entre les setmanes 11 i 14, indica que no hi ha diferències entre els fetus sans, els fetus portadors o els fetus afectats per l'AME (Parra *et al.*, 2011). Al moment del naixement, a part de debilitat muscular, sovint presenten asfíxia. Són nadons amb paràlisi corporal, unió de les articulacions, no tenen reflexes, i presenten defectes als septes auriculars i greus problemes respiratoris (fet que requereix ventilació assistida o intubació). Generalment moren al voltant dels 6 mesos de vida (Dubowitz *et al.*, 1999; Briese *et al.*, 2005; Markowitz *et al.*, 2012).

MacLeod *et al.*, (1999) estudiant la regió del gen *SMN*, en pacients amb AME, van observar que cinc pacients que presentaven el fenotip AME molt sever tenien els exons 7 i 8, del gen *SMN*, delecionats i 4 d'aquests pacients presentaven també deleccions al gen *NAIP*; per altra banda, Devriendt *et al.* (1996), en nadons recent nascuts que presentaven greus afectacions, van observar reorganitzacions dins el gen *SMN* i la deleció homozigota del gen *NAIP*. El gen *NAIP*, per tant, juga un paper important en la severitat del fenotip AME.

Table 1. Clinical classification of spinal muscular atrophy

SMA Type	Other Names	Age of Onset	Life Span	Highest Motor Milestone Achieved	Other Features
Type 0	Prenatal, congenital SMA	Prenatal	<6 months	Mostly unable to achieve motor milestones	Severe weakness at birth Profound hypotonia Facial diplegia Areflexia Early respiratory failure Joint contractures
Type I	Werdnig-Hoffman disease, severe SMA ("nonsitters")	0-6 months	<2 years without respiratory support	Never sits supported	Weakness "Frogleg" posture, hypotonia Tongue fasciculations Hyporeflexia, areflexia Suck and swallow difficulties Respiratory failure
Type II	Intermediate SMA ("sitters")	6-18 months	Approximately 70% alive at age 25 years	Sits independently, never stands or walks	Proximal weakness, hypotonia Postural hand tremor Hyporeflexia Average or above average intellectual skills by adolescence Scoliosis
Type III	Kugelberg-Welander disease, mild SMA ("walkers")	>18 months	Almost normal	Stands and walks	May manifest hand tremor
Type IV	Adult SMA	>21 years	Normal	Normal	Resembles muscular dystrophy

Abbreviation:
SMA = Spinal muscular atrophy

Taula 1. Classificació clínica de l'atròfia muscular espinal. Extreta de Markowitz *et al.*, 2012.

1.3.2 Atròfia muscular espinal tipus I o de Werdnig-Hoffman



El 60% de casos AME que es detecten són AME tipus I (Coady i Lorson, 2011). La malaltia apareix entre els 0 i els 6 mesos d'edat. Els nadons presenten un debilitament muscular progressiu en els músculs proximals amb més afectació a les cames. No poden controlar el cap, presenten hipotonia i no arriben mai a assentar-se. La forma del pit (tòrax) acostuma a ser en forma de campana donada la debilitat en el múscul intercostals que provoca una respiració abdominal; no obstant, el diafragma es conserva bastant inalterat. Malgrat la debilitat facial en estadis avançats de la malaltia, l'afectació dels nervis cranials és variable, presenten fasciculacions de la llengua i sovint tenen problemes per empassar l'aliment i la saliva. Les seves facultats cognitives estan inalterades, fet que contrasta amb la debilitat general. Clàssicament aquests pacients patien una aturada respiratòria al voltant dels 2 anys de vida; avui en dia, però, el suport de la respiració assistida fa que la supervivència hagi augmentat.

L'AME, s'ha considerat sempre una malaltia de la motoneurona, estudis recents però, indiquen que almenys en el cas de l'AME tipus I la malaltia es manifesta a diversos òrgans com en el cor amb la síndrome d'hipoplàsia del costat esquerre del cor i al sistema vascular, amb necrosi i ulceracions als dit de les mans i dels peus, entre d'altres. Un 80% dels pacients amb AME tipus I tenen 1 o 2 còpies d'*SMN2* (Markowitz *et al.*, 2012).

1.3.3 Atròfia muscular espinal tipus II o intermèdia



Els malalts amb AME tipus II desenvolupen la malaltia entre els 6 mesos i els 18 mesos de vida. Presenten una debilitat progressiva als músculs proximals, essent l'afectació més severa a les cames que als braços, hipotonia i absència de reflexes. A diferència dels AME tipus I, tenen la capacitat d'assentar-se. A mesura que van creixent presenten escoliosi severa de la columna vertebral que juntament amb la debilitat dels músculs intercostals provoca baixa capacitat pulmonar. A més a més, desenvolupen contractures de les articulacions i poden patir anquilosi de la mandíbula i tremolors a les mans. Generalment són nens amb baix pes corporal, no obstant, en alguns casos donat que no poden fer exercici i hi ha acumulació de greix i poden presentar problemes

d'obesitat. Les facultats cognitives són normals i la intel·ligència pot superar la mitjana de la dels nens a la seva edat. La mortalitat generalment és deu a problemes respiratoris i és variable (~2% als 5 anys) i tot i que en un 70% dels casos supera els 25 anys, la supervivència acostuma a ser més curta que en la població normal. Un 82% dels pacients amb AME tipus II tenen 3 còpies d'*SMN2* (Markowitz *et al.*, 2012).

1.3.4 Atròfia muscular espinal tipus III o Kugelberg-Welander



A diferència dels dos tipus anteriors els AME tipus III tenen la capacitat de caminar en algun moment de les seves vides, en alguns casos però acaba essent necessari l'ús de la cadira de rodes. Manifesten debilitat muscular proximal amb afectació prominent a les cames, poden tenir tremolors a les mans i generalment no pateixen problemes pulmonars ni escoliosi de la columna vertebral. La supervivència és igual a la de la resta d'adults no malalts. Un 96% dels pacients amb AME tipus III tenen 3 o 4 còpies d'*SMN2* (Markowitz *et al.*, 2012).

1.3.5 Atròfia muscular espinal tipus IV

L'AME tipus IV és la forma adulta de progressió molt lenta. Generalment es comença a notar debilitat muscular a partir dels 18 anys, però molts casos es detecten a partir dels 35 anys. Rarament tenen afectats els músculs relacionats amb la respiració i la deglució (Families of SMA).

1.3.6 Altres atròfies musculars espinals

Hi ha un grup de malalties que comparteixen alguns aspectes amb el fenotip de l'AME però són genèticament diferents, i sovint afecten altres tipus de neurones i músculs. En aquest grup hi trobem, per exemple: les formes dominants de la malaltia (7p15), l'AME amb estrès respiratori (SMARD; IGHMBP2;11q13.2), l'AME lligada al cromosoma X (Xp11.3q11.2) i formes recessives que afecten els músculs distals (afectació a 11q13), entre d'altres (Monani *et al.*, 2005).

2 Survival motor neuron gene

L' *SMN* és un gen essencial i altament conservat al llarg de l'evolució (Monani *et al.*, 2000b; Briese *et al.*, 2005). Lefebvre *et al.* (1995) van identificar el gen dins la regió 5q11.1-13.3, que es trobava absent o interromput en un 98,6% dels pacients amb AME estudiats. L'*SMN* es troba dins una regió complexa, rica en gens i molt inestable, amb una duplicació invertida de 500kb, a la part més telomèrica de la qual s'hi troba el gen *SMN1* (evolutivament més vell) i a la part més centromèrica el gen *SMN2* que es creu que es va originar per una duplicació intra-cromosòmica del gen *SMN1* i que es diferencia només en 5 nucleòtids (**Fig. 2**; Briese *et al.*, 2005). Sembla ser que la duplicació del gen *SMN* es va produir després de la separació dels rosegadors i els primats ja que els rosegadors, tot i tenir també una regió duplicada, els manca el gen *SMN2* (Monani *et al.*, 2000 b; Lunn i Wang, 2008). La diferència principal entre *SMN1* i *SMN2* és la transició d'una C per una T a la posició +6 de l'exó 7; zona on hi ha un *exonic splicing enhancer* (ESE). Aquesta transició no causa un canvi de la seqüència d'aminoàcids (aa), però afecta l'*splicing* alternatiu causant l'exclusió de l'exó7 en la majoria dels àcids ribonucleics missatgers (RNAm) (90% dels casos) donant lloc a una proteïna truncada que és degradada ràpidament. No obstant, el 10% de transcrits inclouen l'exó 7 obtenint així una minsa quantitat d'RNAm sencer que donarà lloc a la proteïna SMN sencera (FL-SMN). Estudis recents (Jodelka *et al.*, 2010) indiquen que *SMN* pot autoregular-se a partir d'un procés de feedback, on la presència d'*SMN* potencia la inclusió de l'exó 7 en l'*splicing* d'*SMN2* i *viceversa*; per tant, en l'AME on *SMN* ja està reduït la probabilitat que hi hagi FL-SMN2 és inferior respecte a un individu sa.

El percentatge de la proteïna FL-SMN provinent d'*SMN2* (FL-SMN2) en pacients que pateixen formes suaus de l'AME pot arribar a ser del 50%; hi ha diversos factors que poden explicar les divergències que hi ha entre els nivells de proteïna en els diferents pacients com són els gens modificadors, la metilació i/o mutacions del gen *SMN2* (Lunn *et al.*, 2008; Oprea *et al.*, 2008; Burghes i Beattie, 2009; Hauke *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 2009; Jodelka, *et al.* 2010; Markowitz *et al.*, 2012). Zhang *et al.* (2003) van determinar la importància de l'exó 7 en la localització citoplasmàtica que rau en una seqüència de 4 aa. L'absència d'aquest exó repercuteix en el creixement de

les neurites i la distribució d'SMN als cossos de Cajal. La seqüència de l'exó 7, però, està relativament conservada al llarg de l'evolució, i estudis en *Drosophila* on aquesta seqüència no existeix, la proteïna SMN es troba bàsicament al citoplasma; van concloure que la localització citoplasmàtica d'SMN venia determinada per l'exó 6 i que l'exó 7 era un modulador. Resultats semblants amb cèl·lules HeLa i fibroblasts de pacients amb AME van indicar que l'exó 7 no és una seqüència estrictament necessària i que actua com a una cua no específica que facilita la localització d'SMN al citoplasma, tal i com fan altres seqüències heteròlogues unides al C-terminal (Hua i Zhou, 2004b; Wolstencroft *et al.*, 2005).

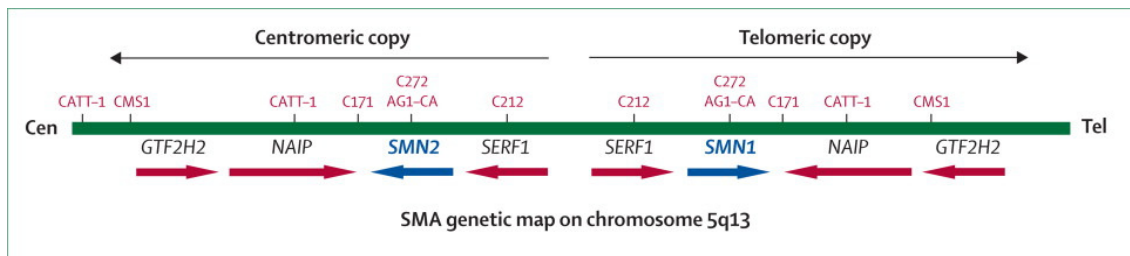


Figura 2. Mapa genètic del locus de l'atròfia muscular espinal. Les còpies del gen *SMN* es troben dins de dos grans fragments genòmics invertits (línies negres horitzontals) en el cromosoma 5q13. *SMN1* (blau) es troba dins de la còpia telomèrica, mentre que almenys un *SMN2* (blau) està continguda en la còpia centromèrica. Altres gens en les proximitats d'*SMN* estan en negre. Les fletxes blaves i vermelles denoten la direcció de la transcripció dels gens *SMN* i dels altres gens, respectivament. Les multicòpies de marcadors de microsatèl·lits (vermell) estan indicades dins d'aquestes repeticions genòmiques. Lunn i Wang 2008.

2.1 Regulació de l' *Splicing* del gen *SMN*

En el procés d'*splicing* hi intervien diverses proteïnes i ribonucleoproteïnes (RNPs). L'excisió dels introns i el posterior lligament 5'-3' dels exons el porten a terme les RNPs nuclears petites (snRNPs): U1, U2, U4/6 i U5 i les proteïnes d'unió a l'RNA riques en serina/arginina (SR). Les proteïnes SR s'uneixen al domini *exonic splicing enhancer* (ESE). Els ESEs són elements *cis* que: (a) regulen el processament de l'RNA reclutant la maquinària d'*splicing* i promovent l'assemblatge dels diferents complexos que hi intervien i (b) compensen els llocs 3' subòptims promovent la inclusió d'exons vagament definits. En la inclusió de l'exó 7 hi participa un o més ESEs. Lorson i Androphy (2000) van identificar 3 possibles regions d'acció: la SE1 rica en CA i situada a l'extrem 5'; la SE2 regió altament conservada, rica en AG i que està situada en

una regió intermèdia, es pot dividir en subregions d'entre les quals la SE2c és crucial per a l'increment de FL-SMN (Hofmann *et al.*, 2000); i SE3 que conté seqüències CA i que està situada a l'extrem 3'. SE2 és una regió que actua com a un ESE i és determinant per a la inclusió de l'exó 7. La unió del factor d'*splicing* Htra2- β 1 i SE2c promou la inclusió de l'exó 7 (Hofmann *et al.*, 2000; Lorson i Androphy, 2000). SMN també requereix ser processat i s'autoregula per un procés de *feedback* controlant la inclusió/exclusió de l'exó 7 en funció de les necessitats que tingui la cèl·lula de la síntesi de les snRNPs i d'altres funcions d'SMN. És d'esperar, per tant, que cèl·lules metabòlicament més actives, com les neurones, necessitin més snRNPs. Jodelka *et al.* (2010) van demostrar que la disminució de FL-SMN provoca una disminució de les snRNPs reclutades i influenciava, negativament, l'*splicing* de l'exó 7.

L'*splicing* de l'exó 7 del gen *SMN* es fa a través de l'*spliceosome* major on hi ha implicades les snRNPs U1, U2, U4, U5 i U6. Les tres primeres snRNPs estan disminuïdes (23, 41 i 34% respectivament) en cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS) provinents d'un pacient amb AME; U5, en canvi, està incrementada. En l'observació de les snRNPs en cèl·lules HEK-293T, que tenen una disminució d'un 64% del gen *SMN*, van veure una disminució d'U1, U2 i U4, però no van detectar diferències respecte a un wild-type (WT) en els reguladors de l'*splicing* de l'exó 7 com són les ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies (hnRNP) Q/R i A1, Tra2b1, SF2/ASF i SRp55. Per tant, el causant de la disminució de la inclusió de l'exó 7 degut als baixos nivells d'SMN pot ser que sigui la disminució de l'abundància dels snRNAs o el canvi relatiu de l'abundància d'aquests. La reducció d'U1 snRNP en l'AME és la més crítica perquè la snRNP no reconeix el lloc d'*splicing* de l'exó 7 (*splice site* dèbil i poc definit) a *SMN2* i per tant l'exclou en la major part dels casos. Aquest fet pot causar també diferències d'*splicing* entre els diferents tipus cel·lulars i al llarg del desenvolupament; es possible que en les MNs passi això i que aquestes siguin més sensibles a aquests canvis (Jodelka *et al.*, 2010).

2.2 *Splicing* alternatiu del gen *SMN2*

El principal problema en l'*splicing* dels pre-mRNAs és el reconeixement de l'exó. Reconeixement en el qual hi participa la maquinària de l'*spliceosome* i altres proteïnes no-*spliceosomals* com les SR, proteïnes SR-like i les hnRNP. Algunes

d'aquestes proteïnes s'uneixen a les seqüències dels pre-RNAm: ESEs que promouen el lloc d'*splicing*, i els *exonic splice supressor* (ESS) que inhibeixen el lloc d'*splicing* (Singh *et al.*, 2004). Hi ha dues teories sobre l'efecte de la transició C→T en l'*splicing* d'*SMN2* (**Fig. 3**):

- (1) Cartegni i Kranier (2002) van proposar que la transició d'una C per una T en el gen *SMN2* altera una seqüència que permet el correcte *splicing* del gen *SMN*. Aquest ESE és dependent del factor d'*splicing* 2 (SF2) conegut també com a factor d'*splicing* alternatiu (ASF). SF2/ASF interacciona amb la ribonucleoproteïna petita U2 (U2 snRNP) i amb els seu factor auxiliar (U2AF) dins de l'intró 6, per tal que aquest es pugui eliminar correctament en el processament del pre-mRNA del gen *SMN1*.
- (2) Kashima i Manley (2003), van proposar que la transició dels nucleòtids C→T crea un nou lloc d'unió, ESS dins d'*SMN2*, fet que permet l'exclusió de l'exó 7 unint la hnRNP A1, coneguda per la seva funció com a proteïna repressora de l'*splicing*. Kashima i Manley van demostrar que la transició C→T incrementava la unió d'hnRNP A1, evitant així la formació i/o estabilització del complex snRNP necessària per a un *splicing* correcte.

La combinació de les dues mostra que hnRNP A1 podria antagonitzar l'efecte de SF2/ASF i promoure així l'exclusió de l'exó 7, sobretot en *SMN2* on aquesta zona (ESE) està inactiva (Lunn i Wang 2008; **Fig. 3**). Singh *et al.* (2004) van demostrar, a través d'estudis mutagènics dins el gen *SMN*, que un canvi de nucleòtid (A12C) a la zona invalidada d'SF2/ASF incrementaria l'afinitat de factors proteics que desplaçarien la hnRNP A1 inhibint així la seva activitat inhibidora.

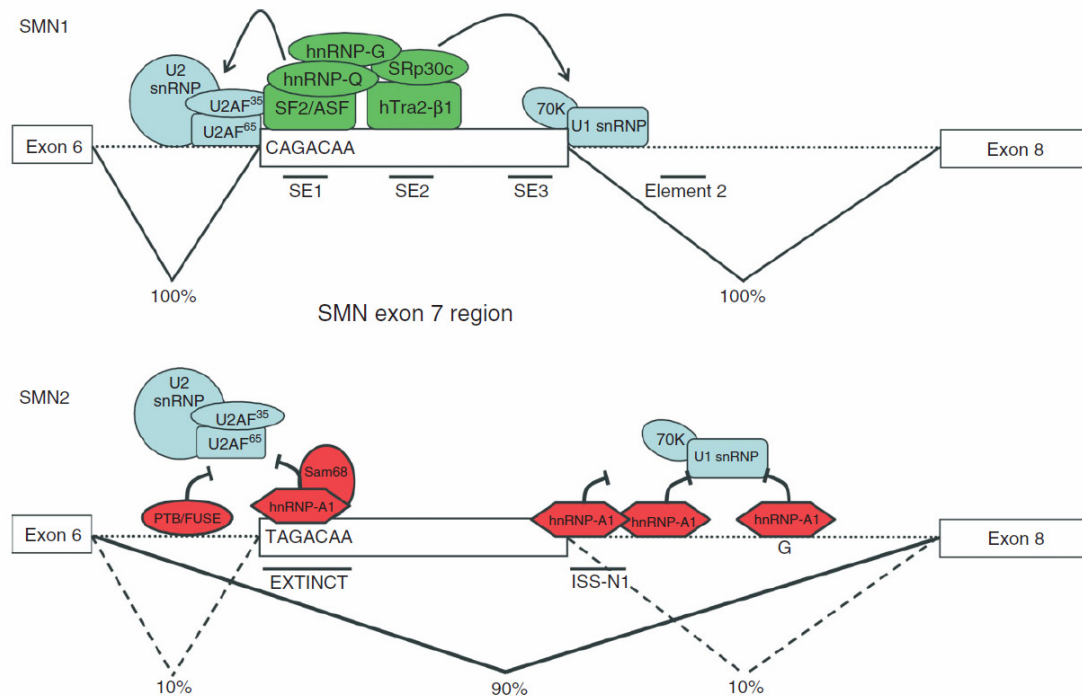


Figura 3. Regulació de l'*splicing* de l'mRNA del gen *SMN*. SMN1 produeix, exclusivament, la forma sencera (FL) de la proteïna. Una sèrie d'elements reguladors cis- i trans- faciliten la inclusió de l'exó 7 d'*SMN*. Factors que actuen positivament es mostren en el panell superior, incloent diverses SR, SR-like, i la ribonucleoproteïna nuclear heterogènia (hnRNP; verd), així com el potenciador putatiu d'acoblament (SE1-3) i l'Element 2. La seqüència 'CAGACAA' representa un motiu d'unió a SF2/ASF d'alta afinitat que està unit per SF2 només en *SMN1*. La "C" que està situada a la posició +6 està canviada pre una "T" en el gen *SMN2*. La maquinària d'acoblament s'indica en blau. El panell inferior representa els mecanismes de regulació que regeixen l'*splicing* del pre-mRNA d'*SMN2*. La introducció d'una "T" a la posició +6: 'TAGACAA', ha afectat greument el motiu d'unió SF2/ASF. A més a més, hnRNP-A1 s'uneix de manera molt eficient en aquesta zona, que pertany a l'element regulador EXTINCT. A les zones properes en aquesta zona de l'intró, s'hi ha identificat més llocs d'unió a hnRNP-A1, com les regions ISS-N1. En conjunt, aquests factors impedeixen la identificació dels llocs d'acoblament, ja febles, que flanquegen l'exó 7 i promouen l'omissió de exó en un ~ 90%. Només un 10% de les transcripcions d'*SMN2* transcripcions l'exó 7, que per tant, codifica per la proteïna SMN totalment funcional. Coady i Lorson 2011

3 La proteïna SMN

En general es considera que SMN és una proteïna de 38 kDa (formada per 294aa) altament conservada des dels llevats fins als humans. Generalment es troba autoassociada o formant el complex SMN, amb una durada de vida mitjana de dies, mentre que en estat lliure és bastant inestable amb una durada de vida mitjana d'hores. Els dominis que determinen la seva oligomerització vénen determinats pels exons 2, 6 i 7, aquests, però, no intervien en la seva unió a les proteïnes Sm. Proteïnes, com la

proteïna quinasa A (PKA), que estimulen la formació de complexos participen també en la seva estabilització. La ràpida degradació d'SMN Δ 7 ve determinada per la poca habilitat en formar complexos/oligomeritzar-se i no per una possible disfunció del proteasoma; de fet, l'autoassociació d'SMN està disminuïda en l'AME i la severitat de la malaltia és proporcional a la concentració intracel·lular de les proteïnes SMN oligomeritzades (Lorson *et al.*, 1998; Burnett *et al.*, 2008). El complex macromolecular es troba al nucli formant les gems, que alhora es troben dins o properes als cossos de Cajal (CB). La proteïna SMN està associada als pors nuclears, i al citoplasma de forma difusa però més aviat propera al nucli en zones riques en ribosomes i a les cisternes del reticle endoplasmàtic rugós (REr). SMN manté una interacció estreta amb les Gemines 2-8 i el factor addicional unrip, aquest darrer només al citoplasma. SMN es localitza també als axons i a les dendrites de les neurones motores, on interacciona amb els microtúbuls, i als filopodis de les cèl·lules glials (Burllet *et al.*, 1998; Béchade *et al.*, 1999; Fan i Simard, 2002; Paushkin *et al.*, 2002; Burghes i Beattie, 2009; Coady i Lorson 2011; Markowitz *et al.*, 2012). No obstant, en diversos estudis realitzats en cultius cel·lulars i en rata, s'han identificat diferents isoformes¹: una fracció de 32kDa al citoplasma i al nucli bàsicament soluble, i dues fraccions de 35kDa i 45kDa que es segreguen a la fracció microsomal-mitocondrial. Totes les isoformes provenen del mateix cDNA però tenen el patró de distribució subcel·lular diferent i el patró d'expressió és específic de la cèl·lula (La Bella *et al.*, 1998 i 2000; Francis *et al.*, 1998).

SMN és una proteïna ubiqua, que s'expressa a tots els teixits però no de manera uniforme ni (i) a nivell de teixit-cèl·lula, per exemple al sistema nerviós central (SNC) SMN no s'expressa per igual a totes les cèl·lules i s'ha trobat augmentada en les motoneurons de la banya ventral de la ME, a l'escorça cerebral, al tronc de l'encèfal, al gangli basal, al tàlem, a l'hipocamp i al cerebel (Briese *et al.*, 2005; Wishart *et al.*, 2010); ni (ii) al llarg del desenvolupament, a la ME de les rates, la proteïna SMN es regula a la baixa a partir d'E14 i al cervell de pollastre a partir d'E9-12 (Zhang *et al.*, 2003); curiosament, en el cas concret de les MNs de la ME el patró d'SMN no canvia en l'edat adulta, indicant la importància d'SMN en aquest tipus cel·lular (Pagliardini *et al.*, 2000); Burllet *et al.* (1998) ja havien observat la regulació a la baixa de l'SMN postnatal al múscul, cervell, cor i ronyó. La major activitat d'SMN en el sistema neuromuscular es produeix durant l'època embrionària i neonatal. Durant la

¹ Hi ha força contradiccions entre els diferents pesos moleculars de les fraccions d'SMN. Els que estan anotats es basen en l'article de La bella *et al.* (1998 i 2000).

diferenciació neuronal SMN s'acumula als cons de creixement amb un pic dels nivells d'aquesta proteïna al múscul a l'edat de P6, just abans de la maduració de les unions neuromusculars (NMJs); posteriorment disminueix abruptament al començament de la mielinització, on adquireix uns nivells basals que es mantenen al llarg de la vida i SMN romandrà concentrada a la NMJ (Fan i Simard, 2002). No tots els teixits tenen els mateixos nivells d'SMN; Gabanella *et al.* (2005) van mirar l'expressió d'SMN en extractes totals de proteïna al cervell, a la ME, al ronyó, al cor i al múscul d'embrions de ratolí E16 i no van detectar diferències entre els diferents teixits, mentre que quan van mirar la quantitat d'SMN que està unida a les snRNPs s'observa un increment 5 vegades superior en l'activitat d'SMN al cervell i a la medul·la espinal. Per tant, l'activitat d'SMN no es correlaciona amb el seu nivell d'expressió i al SNC és on està més incrementada. Alhora, es va detectar una regulació temporal específica del teixit de la funció d'SMN en l'assemblatge de les snRNPs al llarg del desenvolupament, essent elevada als testicles, i disminuïda fins a nivells basals al ronyó i al múscul esquelètic a partir de P1. Conclouen que la disminució de l'activitat d'SMN a les snRNPs coincideix amb el moment final de diferenciació cel·lular. Una de les parts més afectades del cervell és l'hipocamp on s'observa una baixa densitat cel·lular, disminució de la proliferació cel·lular i disminució de la neurogènesi postnatal. Estudis de proteòmica indiquen canvis en les vies de senyalització implicades en la proliferació cel·lular, migració i desenvolupament (Wishart *et al.*, 2010); defectes que podrien ser deguts a la disminució de les snRNPs.

La baixa quantitat de proteïna SMN sencera en pacients AME (10-50%) permet el desenvolupament embrionari però és insuficient per mantenir les motoneurons vives (Lunn *et al.*, 2008). El 90% de proteïna que es forma a partir d'*SMN2* li manca l'exó 7 fet que impedeix la formació dels complexos amb altres proteïnes associades i els RNAs disminuint així l'estabilitat de la proteïna SMN Δ 7 i essent degradada ràpidament (Coady i Lorson, 2011).

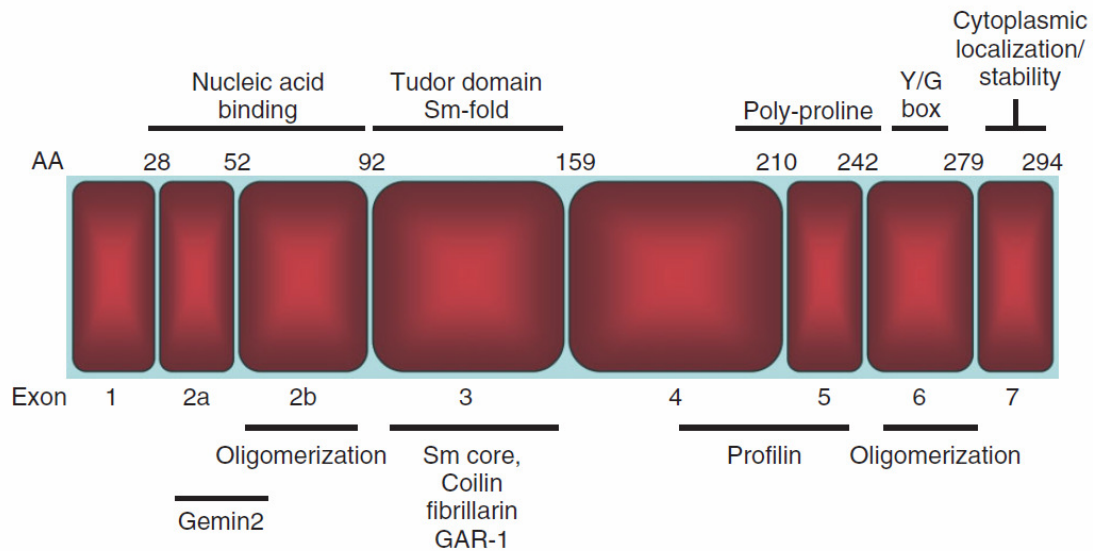


Figura 4. Subdominis de la proteïna SMN. Les caixes vermelles representen els exons, i el nombre d'aminoàcids corresponent als pèptids de cada exó i la mida de la proteïna SMN està indicat a la part superior de les caixes. La proteïna SMN està composta per 294 aminoàcids i en anàlisi per Western blot, la banda corre fins a 38 kD. Les mides relatives dels exons estan indicades a la part inferior de l'exó, també s'indiquen els subdominis i les funcions associades de la proteïna. A la part inferior s'hi mostra una llista abreujada de les proteïnes que interactuen amb la SMN, juntament amb la regió aproximada d'interacció (Coady i Lorson 2011).

3.1 Funcions de la proteïna SMN

La proteïna SMN juntament amb les gemines formen un complex amb funcions de xaperona que facilita l'assemblatge de les snRNPs, components essencials de l'*spliceosome*. Té per tant, un paper important en l'*splicing* dels pre-mRNAs. SMN és, també, essencial en la metilació d'algunes proteïnes relacionades amb l'*splicing*; en el transport axonal dels mRNAs a les MNs; s'associa a l'actina, proteïna relacionada en trobar el camí de l'axó i en el creixement d'aquest durant el desenvolupament; en les sinapsis neuromusculars i un paper estructural en el múscul, formant part de la banda Z (Fan i Simard 2002; Rajendra *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2008). Les evidències que SMN estigui tant relacionada amb la funcionalitat dels axons i que la mort de la neurona sigui posterior a la patologia de l'axó, ha fet que es postuli l'AME com a una axonopatia *dying-back* (Fan i Simard, 2002; Frugier *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Jablonka *et al.*, 2006; Kariya *et al.*, 2008; Fallini *et al.*, 2012). La implicació d'SMN en

la neurodegeneració de les MNs fa pensar que podria estar implicada en la protecció contra la mort neuronal i l'apoptosi (Zhang *et al.*, 2003).

3.1.1 SMN dins els cossos de Cajal

Els cossos de Cajal (CB) són dominis nuclears altament conservats al llarg de l'evolució. En el seu interior és on hi ha la modificació inicial i l'assemblatge de diverses U snRNPs que just acaben de ser importades des del citoplasma pel complex SMN o bé que han estat reciclades de dins el mateix nucli. Als CBs les U snRNPs reben proteïnes addicionals dels grànuls d'intercromatina (Dundr *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2008).

Els cossos de Cajal (**Fig. 5**) van ser descoberts per Santiago Ramón y Cajal a principis del segle XX. Malauradament, durant aquell període no es va fer massa cas d'aquest descobriment i no va ser fins al 1969 quan Monneron i Bernard, a través de la microscòpia electrònica, van observar unes estructures a l'interior dels nuclis que van identificar com a un orgànul nuclear que contenia altes concentracions d'mRNA al que van anomenar *coiled body* (CB). No va ser, però fins al 1999, que Joseph Gall va suggerir que de fet els cossos de Cajal i els *coiled bodies* eren el mateix. Al llarg del segle XX es van anar descobrint components dels CBs: (1) estan associats a llocs específics dels cromosomes, en concret als locus dels gens de les histones; (2) participen en l'*splicing* dels snRNAs i les proteïnes associades, per exemple la U7 snRNA²; (3) presència de centres fibril·lars que emmagatzemen els components de la maquinària de la transcripció dels gens ribosomals com l'RNA polimerasa I i el factor d'unió *upstream* i (4) presència de l'*small nucleolar RNA* (snoRNA) i dels *small Cajal bodies RNAs* (scaRNA) implicats en el processament dels pre-mRNAs dels ribosomes i la modificació dels snRNAs, respectivament (Gall, 2003; Berciano *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008).

Els CBs són estructures esfèriques i dinàmiques. Tenen una variabilitat en la relació CBs/cèl·lula, essent més abundants en la fase G1 del cicle cel·lular, fase en la qual la transcripció està augmentada. Les cèl·lules glials i *neuron-like* són les que contenen més CBs (Fan i Simard, 2002). A més a més, Berciano *et al.* (2007) van determinar que el número de CBs també està relacionat amb la mida de la cèl·lula bàsicament per tal que aquesta pugui mantenir la seva mida i sense que sigui necessari

² U7 snRNA està implicat en el procesament del pre-ARNm de les histones.

que la cèl·lula estigui en divisió; per tant, en les cèl·lules més grans on el requeriment de l'activitat de la transcripció és més elevada el número de CBs és també més elevat. Els CBs són difícilment visibles en cèl·lules d'individus adults; són més petits que el nuclèol i en cas que no hi estiguin associats, o bé estan lliures pel nucleoplasma (on hi ha un trànsit continu i ràpid), o bé estan enganxats a llocs específics dels cromosomes (**Fig. 6**). Els CBs són els llocs d'assemblatge i/o modificació de la maquinària que processa els mRNAs i de tot l'aparell de transcripció del nucli. El fet que al 1996 Liu i Dreyfuss descobrissin que SMN també forma part dels CBs sumat a la presència de les RNA polimerases i de factors de transcripció (als CBs o associats a ells) va reafirmar aquesta funcionalitat (Gall *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2008). No obstant, el fet que ratolins *coilina*^{-/-} sense CBs siguin relativament viables fa pensar que els CBs són un espai on s'incrementa l'eficiència del processament dels mRNAs, eficiència molt reduïda en el cas del nucleoplasma.

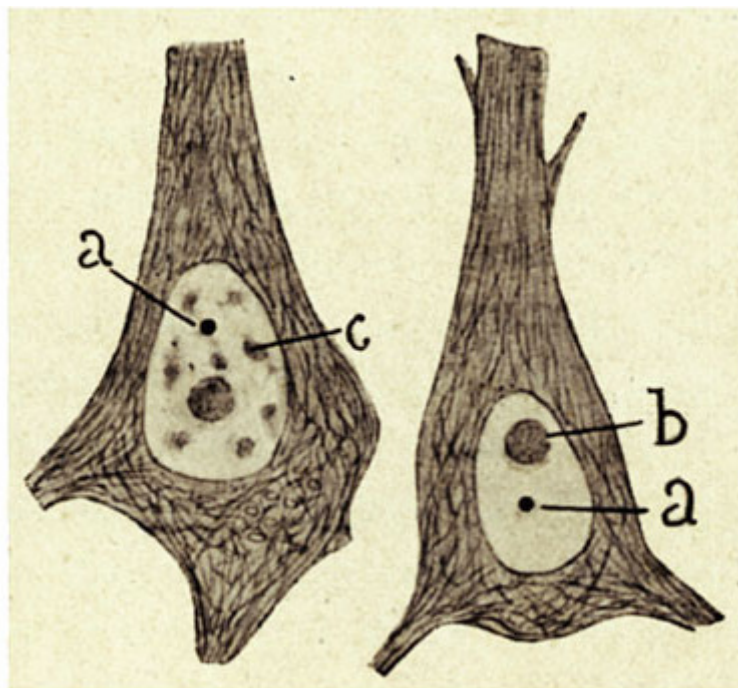


Figura 5. Representació de dues cèl·lules piramidals de l'escorça cerebral humana. A l'interior dels nuclis s'hi mostren, els cossos de Cajal (a), el nuclèol (b) i taques o grups de grànls d'intercromatina (c). Aquest dibuix va ser publicat per Cajal al 1910 (Ref. 58) i es reproduïx amb el permís de la ref. 58 © Els Hereus de Santiago Ramón y Cajal, amb un agraïment especial a Miguel Freire, de l'Institut Cajal, Madrid, Espanya (Gall, 2003).

Al 1991, Ivan Raska i Luis Andrade, van identificar la proteïna coilina p-80 dins els CBs fet que ha permès, en la majoria dels casos, tenir un marcador dels CBs. No obstant, la coilina no és una proteïna estructural essencial en els CBs per tant no és un marcador universal d'aquests. La coilina p80, però, sí que col·localitza amb SMN, i de fet, quan la coilina és absent, SMN i el processament dels snRNPs als CBs no es fa correctament (**Fig. 7**; Gall *et al.*, 2003; Dundr *et al.*, 2004).

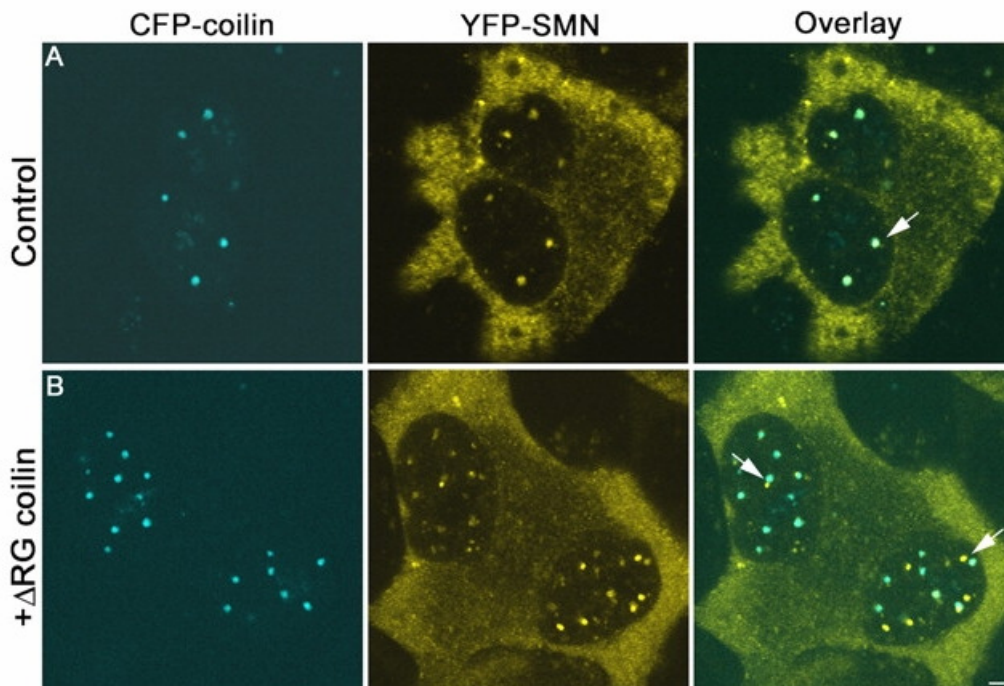


Figura 6. CB i les gemmes són dominis cinèticament independents. (A) Coilina-CFP i YFP-SMN colocalitza als CBs de les cèl·lules HeLa (fletxa). (B) Quan la Coilina-CFP i YFP-SMN es coexpressen amb un mutant dominant de la coilina Δ RG, els CBs estan físicament separats de les gemmes (fletxes) (Dundr, M 2004).

Un cop el complex SMN-Gemines-snRNPs ha entrat al nucli, els U snRNPs són alliberats als CBs (en concret als grànuls d'intercromatina) per: (i) un procés depenent de la coilina p80, en el qual la coilina s'uneix a SMN fent que així s'alliberin els U snRNPs i procedir el seu assemblatge dins de l'*spliceosome*; o bé (ii) l'alliberació dels U snRNPs és deguda al fet que la Gemina 5 (gemina que permet la unió SMN-snRNA) es perd un cop el complex SMN arriba als CBs. No està provat, però es pensa que un cop SMN s'allibera dels snRNPs és retornada al citoplasma.

3.1.1.1 Correlació entre l'AME i els defectes de la proteïna SMN en els cossos de Cajal

La implicació dels CBs en l'AME l'han fet evident Tapia *et al.* (2012) en l'anàlisi d'un pacient amb AME tipus I que patia una pèrdua del 65% de les MNs. La majoria de MNs vives mostraven un patró nuclear alterat amb cromatòlisi i desplaçament del nucli cap a la perifèria (indicador de neurodegeneració); van detectar una disminució considerable dels nivells de la proteïna SMN; una reorganització dels CBs (trobat en un 40% de les MNs); acumulació intra-nucleolar de coilina; una disminució del reclutament de les snRNPs i un increment en la proporció de cossos de la proteïna de la leucèmia promielocítica (PML), estructures implicades en la resposta davant l'estrès neuronal, i bons indicadors del dany al DNA i de l'estrès cel·lular.

3.1.2 SMN en l'assemblatge de les snRNP

La maduració dels mRNAs, en la qual hi participa la proteïna SMN es fa a l'*spliceosome*, és crítica i essencial per l'expressió dels gens i la inactivació de diversos factors de processament; per aquest motiu, la seva inhabilitació la fa incompatible amb la vida. L'activitat en l'assemblatge de les snRNPs succeeix bàsicament durant l'embriogènesi i el desenvolupament postnatal, però decreix després de la miogènesi i del desenvolupament neuronal (Lunn i Wang, 2008). Clàssicament es pensava que la proteïna SMN tenia un paper essencial en el procés de l'*splicing* dels pre-mRNAs, actualment se sap que la proteïna SMN està directament implicada en la formació i maduració de les snRNPs i que la funció sobre l'*splicing* del pre-mRNA és secundària (Coady i Lorson, 2011). Les snRNPs són proteïnes essencials en el reconeixement dels llocs d'*splicing* i de l'eliminació dels introns dels pre-mRNAs al nucli (Burghes i Beattie, 2009). Estan compostes per les U *small nuclear RNA*³ (snRNA) (U1, U2, U4, U5, U11 i U12) i, per les snRNPs que estan implicades en l'*splicing* hi ha també un

³ Les snRNAs formen el nucli de l'*spliceosoma*. Es poden classificar en 2 grups, els majors o U2-type on hi trobem U1, U2, U4/U6 i U5, i els menors on hi trobem U11, U12, U4atac i U6atac i U5, aquestes formen l'*spliceosoma* menor o U12-type (Gabanella *et al.*, 2007).

anell en forma d'heptàmer de proteïnes Smith core ⁴(Sm); *in vivo* aquest procés d'unió Sm-snRNAs està mediat pel complex SMN. En els vertebrats l'assemblatge és dependent de l'ATP i està format per la proteïna SMN, les gemines2-8 i l'URN *interacting protein* (UNRIP o coneguda també amb el nom de STRAP). Les snRNPs reconeixen i eliminen els introns dels pre-mRNAs al nucli. Cada snRNP està formada per snRNAs d'aproximadament 150 nucleòtids, diverses proteïnes Sm i un nombre específic de proteïnes úniques per cada snRNP. La funció d'SMN al citoplasma és l'assemblatge de les proteïnes Sm amb els snRNAs produint així una partícula snRNP activa. El procés d'assemblatge el podem dividir en diferents passos. En primer lloc, al citoplasma les 7 proteïnes Sm s'uneixen a la *chloride conductance regulatory protein* (pICln) per ser posteriorment di-metilades pel complex arginin-metiltransferase 5 (PRMT5) i per la PRMT7, incrementant així la seva afinitat pel complex SMN (**Fig. 7a**). Un cop les proteïnes Sm estan metilades s'alliberen i s'uneixen al complex SMN, que està format per la proteïna SMN, les Gemines2-8 i la proteïna UNRIP (**Fig. 7b**). En segon lloc, els snRNAs que s'han transcrit al nucli (pre-sRNA) s'exporten al citoplasma a través de les proteïnes *phosphorylated adaptor for RNA export* (PHAX), *Cap-binding complex* (CBC), l'exportina (Xpo1) i *ras-related nuclear protein GTP* (Ran). Un cop al citoplasma els snRNAs que portin un lloc d'unió Sm s'uniran a la gemina5 ⁵ alliberant-se de les proteïnes exportadores (**Fig. 7c**). En tercer lloc, el complex SMN-Gemines-Sm mitjancen la formació d'una estructura en forma d'anell al voltant del lloc Sm en els snRNAs. Seguidament, la *trimethylguanosine sythetase 1* (TGS) hipermetila el cap m7G de les snRNAs permetent així la unió del complex SMN-snRNA-Sm amb les proteïnes snurportin-1 i importin β i transportar les snRNP al nucli (**Fig. 7d**). Posteriorment, al nucli el complex SMN-Gemines-Sm s'unirà a la RanGTP alliberant així les U-snRNPs. Per acabar, les UsnRNPs es localitzaran als cossos de Cajal on les snRNPs seguiran la seva maduració per l'*splicing* del pre-RNA_m (**Fig. 7e**; Burghes i Beattie, 2009).

⁴ Les proteïnes Sm estan codificades per 7 gens (Sm B/B', D, D2, D3, E, F i G). Prèviament a la seva unió als snRNAs, les Sm s'identifiquen en 4 complexes: (1) hexàmer format per Sm E, F, i dímers G, (2) Sm D3 i B, (3) complex Sm B i (4) Sm D1, D2 i l'hexàmer (1).

⁵ La Gemina 5 és la responsable d'identificar específicament els ARNs que contenen el lloc d'unió per Sm.

El paper fisiològic d'SMN és assegurar la unió eficient i acurada de les proteïnes Sm amb els snRNAs, impedit l'associació no específica amb altres RNAs (Gabanella *et al.*, 2005; Burghes i Beattie, 2009).

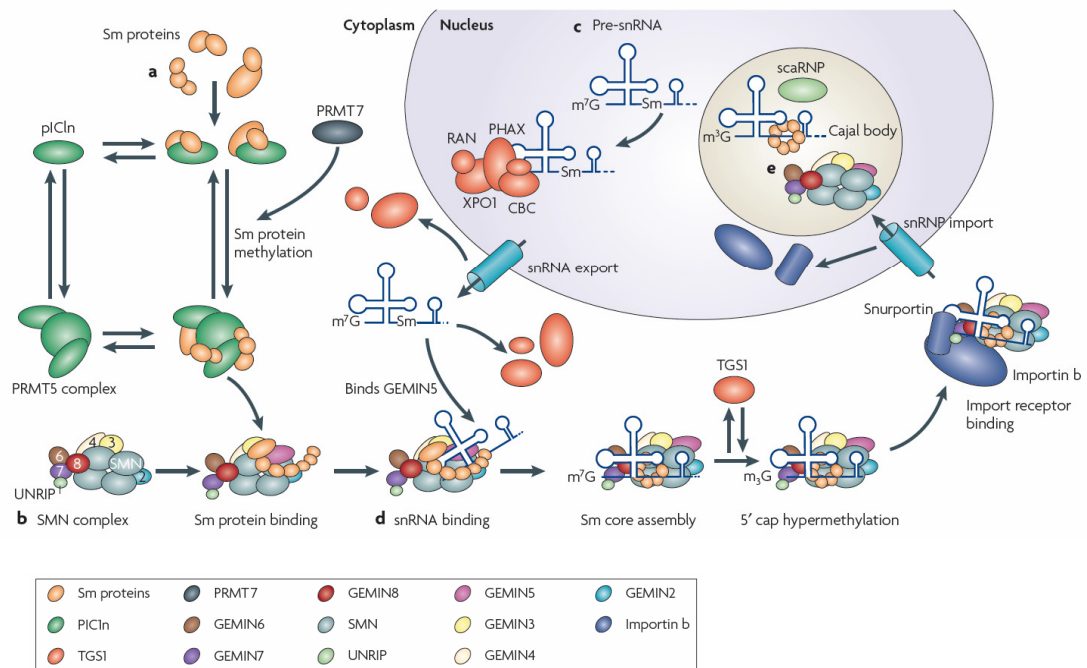


Figura 7. Funció del gen SMN en l'assemblatge de les snRNPs. (a) Metilació de les proteïnes Sm. (b) Unió del complex SMN-Gemines2-8 amb les proteïnes Sm metilades. (c) Exportació de les snRNAs del nucli cap al citoplasma. (d) Unió del complex SMN-Gemines-Sm amb els snRNAs formant els snRNPs, hipermetil·lació i importació al nucli. (e) Alliberació dels snRNPs i del complex SMN als cossos de Cajal per a la maduració dels snRNPs. (Esquema extret de Burghes i Beattie 2009).

3.1.2.1 Correlació entre l'AME i els defectes d'SMN en la unió a les proteïnes Sm

El complex SMN i SIP-1 (Gemina2), interacció que està preservada en l'AME, es troba tant al citoplasma com al nucli on es concentra a les gems. La proteïna SMN, però, a part d'unir-se a SIP-1 té la capacitat d'unir-se a ella mateixa, a snRNPs i a les proteïnes Sm. La interacció d'SMN amb les proteïnes Sm és important per a les funcions d'SMN en l'assemblatge dels snRNPs al citoplasma i en la regeneració d'aquests als *spliceosomes* nuclears. La zona que queda exclosa per l'*splicing* alternatiu del gen *SMN2* inclou el domini YG (Fig. 4), domini altament conservat durant

l'evolució i crucial per a la unió SMN – Sm. Pellizzoni *et al.* (1999) van estudiar l'afectació en l'assemblatge de les snRNPs davant la deleció d'*SMN1* i de la mutació coneguda en diversos pacients *SMNY272C* mapada dins l'exó 6 (Zou *et al.*, 2004). En ambdues mutacions van observar que la unió SMN – SIP-1 no estava impedita però la capacitat d'autoassociació d'SMN i la unió SMN-Sm estava severament afectada; de fet, les unions SMN-SMN estimulen la interacció amb Sm possiblement perquè aquesta unió crea un lloc d'unió específic per Sm. Pellizzoni *et al.* (1999) proposen que l'oligomerització d'SMN, a través de ponts disulfur (Wan *et al.*, 2008), és el cor funcional per a la unió de les snRNPs i la formació de l'*spliceosome*. La majoria de mutacions del gen *SMN* afecten l'oligomerització d'SMN i la unió a Sm, per tant la pèrdua de funció en l'*splicing* dels pre-mRNAs és el mecanisme molecular directe en la deficiència en la biogènesi de les snRNPs en els individus amb AME.

3.1.3 SMN en l'assemblatge d'altres proteïnes RNP- SMN i transport axonal

Malgrat sigui un aspecte poc conegut, les proteïnes SMN tenen la capacitat d'unir altres snRNPs a part de les Sm. Aquest és el cas d'una família de proteïnes *Sm-like* (SLm), proteïnes importants per a la localització dels RNAs i amb característiques molt semblants a les Sm. Per exemple, les SLm10 i 11 s'uneixen a les proteïnes Sm per formar l'heptàmer que s'uneix als U7 snRNAs; les SLm2-8 es troben formant un anell amb els U6 snRNAs al nucli; l'anell SLm1-7 té un paper en l'estabilització i degeneració dels mRNAs al citoplasma; i recentment, les SLm1 i 4 s'han trobat a les dendrites i a alguns axons; sembla ser que especialment SLm4 s'uneix a pICln i SMN. És d'esperar, doncs, que la disminució d'SMN en pacients amb AME afecti l'assemblatge dels complexos RNPs que són essencials per al transport dels mRNAs. Alternativament, SMN funciona en un únic complex axonal amb les hnRNPs Q i R i les proteïnes d'unió al DNA Z (ZBPs) que afectarien al transport de l'mRNA de la β -actina i possiblement altres mRNAs encara desconeguts (**Fig. 9**). L'expressió d'hnRNP Q i R és molt semblant a SMN; són proteïnes ubiqües que estan regulades al llarg del desenvolupament essent el seu pic al final de l'etapa embrionària i disminuint abruptament després del naixement, coincidint amb la proteïna SMN. La seva regulació és post-transcripcional o post-traducciona. La localització de les hnRNP R a les MNs és nuclear (en determinades estructures), citoplasmàtica i a les neurites (sobretot a

l'axó). Colocalitza amb la proteïna SMN a les neurites i al citoplasma però no al nucli on la SMN es troba als cossos de Cajal unit a la Gemina2; en condicions on els nivells d'SMN són baixos la hnRNP R s'acumula al nucli (Burghes i Beattie, 2009; Coady i Lorson, 2011; Lunn i Wang, 2008; Rossoll *et al.*, 2002 i 2003; Zhang *et al.*, 2003 i 2006). Estudis posteriors de Rossoll *et al.* (2003) van demostrar que Smn (SMN de ratolí) i hnRNP R modulen el creixement axonal. La deficiència d'Smn produeix alteracions a la proteïna β -actina i a la localització dels mRNAs en els axons i als cons de creixement. Canvis en el desenvolupament dels cons de creixement en el peix zebra on el gen Smn estava disminuït corroboren les troballes fetes en ratolí (McWother *et al.*, 2003; Carrel *et al.*, 2006).

La unió entre hnRNP R i Smn és necessària per tal que hnRNP R es pugui unir a l'mRNA de l'actina. De fet, a l'axó la SMN està unida a hnRNP R i no a la Gemina 2 com passa al nucli. Contràriament, Zhang *et al.* (2006) van demostrar que part de la proteïna SMN es trobava unida tant a la Gemina2 com a la Gemina3 i que aquests complexos es trobaven a les dendrites i als axons on executaven el transport bidireccional; en canvi, les proteïnes Sm no.

La majoria d'estudis presentats indiquen una dualitat en la funcionalitat d'SMN a nivell de la biogènesi de les U snRNPs i la seva distribució. Com ja s'ha explicat anteriorment, les funcions d'SMN pel que fa a la biogènesi de les snRNPs i el transport axonal van per separat. Winkler *et al.* (2005), en experiments amb el peix zebra i amb la *X laevis*, van descobrir que administracions d'U snRNPs purificats rescataven el desenvolupament d'embrions de *X. laevis* deficients d'SMN o de Gemina2; aquesta compensació indica que defectes en la biogènesi de les RNPs influeixen en el transport axonal, és més, especulen que hi ha un curt període en el qual els U snRNPs són crucials pel correcte desenvolupament període després del qual ja no es pot rescatar l'embrió.

3.1.3.1 Correlació entre l'AME i els defectes d'SMN en les snRNPs en *spliceosome* menor

El complex SMN/Gemines està implicat en el funcionament general de la cèl·lula necessari per a la supervivència de qualsevol cèl·lula o teixit. El fet que les MNs estiguin més afectades que altres tipus cel·lulars es podria explicar a partir d'un mecanisme molecular recentment descobert: l'*spliceosome* menor. La majoria d'introns

són eliminats a través del sistema U snRNPs. Malgrat tot, un 1% dels introns que formen part del transcriptoma (500-700 gens) tenen un lloc d'*splicing* diferent a ambdós extrems, enlloc de GT/AG tenen un AT a l'extrem 5' i un AC a l'extrem 3', són els snRNPs menors, entre els quals s'hi troben molts gens que codifiquen per proteïnes de canals iònics. Aquest 1% d'introns està repartit al llarg del genoma però és probable que alguns gens (canals iònics) en tinguin més d'un, fet que implicaria, encara més una disminució d'aquests en l'AME (Burghes i Beattie, 2009; Fischer *et al.*, 2011).

La deficiència d'SMN no causa una reducció uniforme de les snRNPs sinó que té efectes específics en funció del tipus cel·lular i de la snRNP en qüestió. Estudis comparatius entre diferents teixits i la ME de ratolins que desenvolupen diferents formes d'AME mostren una davallada més forta en algunes Gemines i determinats snRNPs, especialment de l'U11 snRNP (Gabanella *et al.*, 2007). Zhang (Z) *et al.* (2008) van trobar en ratolins SMA Δ 7 que així com les U snRNPs estan alterades per igual a cervell i ronyó, si miraven l'anomenat *spliceosome* menor l'afectació més important es trobava al cervell, al cor i a la ME, mentre que el ronyó i el múscul esquelètic pràcticament no estaven afectats (**Fig. 8**). El resultat és que el repertori de les snRNPs és diferent quan hi ha nivells normals d'SMN de quan aquests nivells estan alterats. Aquestes alteracions influeixen negativament en l'*splicing* dels pre-mRNAs i quan més introns tinguin més possibilitats d'*splicing* erroni. Per altra banda, Boulisfane *et al.* (2011) en limfòcits de pacients amb AME van trobar que els nivells estacionaris dels snRNAs, en general, no estaven alterats però la formació dels U4atac/U6atac/U5 (tri-snRNP) si (U4atac i U6atac són components del U12snRNA, *spliceosome* menor). De fet la formació d'aquest complex menor és 25 vegades inferior en els limfòcits d'AME mentre que el seu homòleg en el complex major és només 2 vegades inferior. Sembla ser que quan els snRNPs majors (U2) estan disminuïts els snRNPs menors (U11 i U12 4atac/U6atac/U5) pateixen una davallada encara més forta (100 vegades més). Van detectar una afectació depenent del teixit en la qual l'assemblatge dels tri-snRNPs menors en els limfòcits estava molt més afectat que en els fibroblasts. Una altra explicació a aquesta afectació és que alguns snRNAs mal acoblats s'acumularien en les cèl·lules amb dèficit d'SMN i que aquests segregarien proteïnes snRNPs o altres proteïnes necessàries per l'*splicing* (Zhang *et al.*, 2008). El fet que snRNPs madurs puguin rescatar el fenotip neuronal al peix zebra va a favor que els defectes en el metabolisme dels mRNAs siguin la causa de l'AME (Chari *et al.*, 2009).

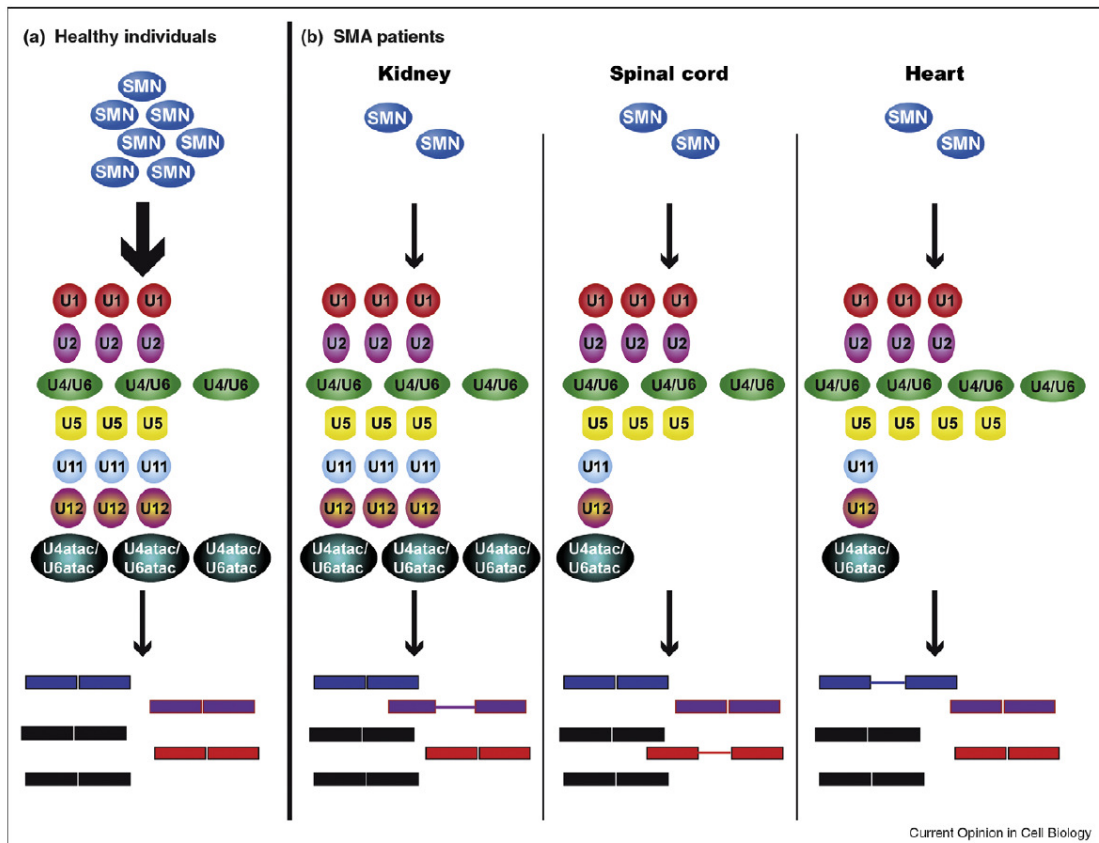


Figura 8. Escenari hipotètic dels esdeveniments que causen l'AME. (A) La situació a les cèl·lules de persones sanes: els nivells normals d'SMN asseguren la generació de les quantitats suficients d'snRNPs per satisfer la demanda d'*splicing* en totes les cèl·lules del cos. (B) Situació en pacients amb AME: la deficiència d'SMN provoca un desequilibri en l'abundància dels snRNPs, que és específic del teixit; donant lloc a diferents defectes en l'*splicing* als diferents teixits. Les motoneurones són particularment susceptibles a aquest defecte, donant lloc al fenotip de AME (Chari, A 2009).

3.1.4 L'SMN i la regulació del citoesquelet

La integritat del citoesquelet és essencial per al correcte funcionament del terminal sinàptic i per assegurar el correcte transport de proteïnes, mRNAs i òrgans a través de l'axó (Holzbaur i Scherer, 2011). El citoesquelet està format per diferents tipus de filaments, els microtúbuls (que intervenen en el moviment dirigit dels grànuls a llarga distància), i l'actina (que intervé en els moviments dirigits i bidireccionals no dirigits a curta distància). La proteïna SMN està unida a ambdós, tot i que majoritàriament a l'actina (70%), indicant, per tant, que la SMN pot ser activament transportada per les neurites (Béchade *et al.*, 1999; Pagliardini *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

3.1.4.1 Afectació dels microtúbuls

La dinàmica del citoesquelet en l'AME està alterada (Torres-Benito *et al.*, 2011). Hi ha evidències que la proteïna *stathmin*, que intervé en la regulació del cicle cel·lular regulant la dinàmica dels microtúbuls promovent-ne la seva despolarització i/o prevenint la polimerització dels hetero-dímers de tubulina (Rubin i Atweh, 2004), està incrementada en l'AME. Que *stathmin* estigui incrementada en l'AME provoca una disminució de la tubulina polimeritzada causant una reducció de la densitat dels microtúbuls i de la tubulina β (III) als axons distals de ratolins AME i una xarxa de microtúbuls afectada en cèl·lules amb deficiència d'SMN. A més a més, en cèl·lules amb l'*stathmin knocked-down* (KD) s'observa una reducció dels defectes en els microtúbuls de cèl·lules deficientes en SMN, hi ha una activació del creixement axonal i millora el transport de mitocondris a les MNs aïllades de ratolins AME (Wen *et al.*, 2010).

3.1.4.2 Afectació de l'actina

La β -actina, que està enriquida a les parts terminals de l'axó i als cons de creixement, té un paper molt important en: (i) la iniciació de l'axó, creixement de les neurites, guia, ramificació i retracció; i (ii) en la formació de la sinapsi i la seva estabilitat, així com en el reciclatge de les vesícules sinàptiques en els terminals presinàptics i el manteniment de la seva pròpia integritat (**Fig. 9**; Luo *et al.*, 2002; Rossoll *et al.*, 2003; Bowerman *et al.*, 2009; Fallini *et al.*, 2012). Com pot actuar sobre el metabolisme de l'actina aquesta davallada d'SMN? Van Bergeijk *et al.* (2007) en experiments amb cèl·lules PC12, on SMN havia estat KD, van observar un canvi significatiu en les proporcions d'actina lliure globular (G) *versus* (vs) l'actina en filament (F). Alhora, amb estudis de mutagènesi a diferents parts del gen *SMN* van detectar que l'extrem C-terminal, en concret la zona que engloba els exons 6 i 7 podia promoure el creixement axonal independentment d'altres dominis d'SMN. Van Bergeijk *et al.* (2007) postulen 3 accions d'SMN en el metabolisme de l'actina: (1) SMN pot influenciar la

polimerització de l'actina i la seva estabilització unint-se a la profilina IIa⁶ (Di Nardo *et al.*, 2000; Nölle *et al.*, 2011). Cèl·lules PC12 deficientes en Smn pateixen un increment en la profilina IIa específica de neurona provocant un increment en la formació dels complexos Rho quinasa (ROCK)/profilina IIA i per tant una activació inapropiada de la via de senyalització RhoA/ROCK; incrementant, per tant Rho A i alterant les dianes *downstream* de la via com són la cofilina, la fosfatasa de la cadena lleugera de la miosina i la profilina IIa, obtenint com a resultat final un citoesquelet anòmal degut a l'alteració de la dinàmica de l'actina i per tant un defecte en la neuritogènesi (Bowerman *et al.*, 2007; Nölle *et al.*, 2011). Bowerman *et al.* (2010) van descobrir que subministrant un pèptid sintètic que inhibeix ROCK corregeix els defectes de les NMJs i allarga la supervivència dels animals amb AME. (2) SMN és important per a la translocació de l'mRNA de la β -actina a les neurites via hnRNP R; i (3) SMN podria facilitar l'assemblatge de l'actina interaccionant amb factors encara desconeguts. Recentment, estudis de depleció del gen *SMN* en la línia cel·lular d'astroglioma (U87MG, cèl·lules molt utilitzades per a estudis de migració cel·lular), han posat de manifest la importància d'SMN en la motilitat cel·lular, procés crític en el desenvolupament del sistema nerviós. La depleció d'*SMN* en les cèl·lules U87MG provoca un retard en la migració cel·lular a través de la via de senyalització de la RhoA/ROCK, incrementant l'expressió de la profilina I⁷, que provoca una reducció de la mobilitat de les cèl·lules U87MG, i una afectació del citoesquelet d'actina, alterant la proporció de l'actina F-/G-(Carballo-Miralles *et al.*, 2012). Les alteracions en la proporció de l'actina F-/G- són contradictoris en funció dels grups, van Bergeijk *et al.* (2007) demostren un increment de l'actina F degut a la disminució d'*SMN*, mentre que Carballo-Miralles *et al.* (2012), obtenen resultats contraris; sembla ser que l'increment de l'actina F- es produeix només en cèl·lules neuronals (Nölle *et al.*, 2011).

Estudis en paral·lel per Setola *et al.* (2007) van identificar una part d'SMN que actuava principalment durant l'estadi de maduració neuronal, que s'expressava diferencialment en les MNs en desenvolupament i que disminuïa després del naixement, el van anomenar SMN-axonal (a-SMN). Els resultats obtinguts corroboraven l'acció de l'extrem C-terminal de l'*SMN* en l'axogènesi i afegien la necessitat dels exons 1/2a per a la localització d'a-SMN en els axons i la retenció de l'intró 3, important per aportar el

⁶ La profilina IIa és un microfilament associat específicament a les MNs, que s'uneix a l'actina i està implicat en la seva polimerització. Quan l'SMN i la profilina estan unides, l'actina es polimeritza.

⁷ La profilina I és una proteïna que evita la polimerització de l'actina, la profilina I a diferència de la profilina II és d'expressió ubíqua.

codó d'*stop* necessari per produir un polipèptid truncat amb funcions axogèniques en la unió dels exons 3 i 4. Van identificar també que a-SMN provenia de FL-SMN, per tant no es d'estranyar que els pacients amb AME, els quals tenen l'*SMN* deletat o mutat, tinguin dificultats en els desenvolupament neuromuscular. Estudis previs de Carrel *et al.* (2006) sobre la implicació de l'exó 7 en el creixement axonal demostren que la funció d'*SMN* en els axons motors és independent de la funció d'*SMN* en la biogènesi de les snRNPs. La deficiència d'*SMN* als cons de creixement podria causar retracció axonal amb la conseqüent denervació muscular i posterior mort de la MN. Els tres grups demostren que hi ha una implicació directa d'*SMN* en el creixement axonal com a base de l'AME. A més a més, estudis per determinar l'afectació del transport retrògrad i anterògrad en el nervi ciàtic van posar de manifest que el transport anterògrad axonal ràpid de vesícules s'alterava en etapes avançades de la malaltia (P11 SMA Δ 7) (Dale, JM 2011) i segons Oprea *et al.* (2008) la regulació del citoesquelet de l'actina és clau en l'AME tipus III. No obstant, el fet que a-SMN tingui un paper específic en l'AME es posa en qüestió donat que s'ha identificat transgens que corregeixen el fenotip AME i no són capaços de produir a-SMN (Gavrilina *et al.*, 2008).

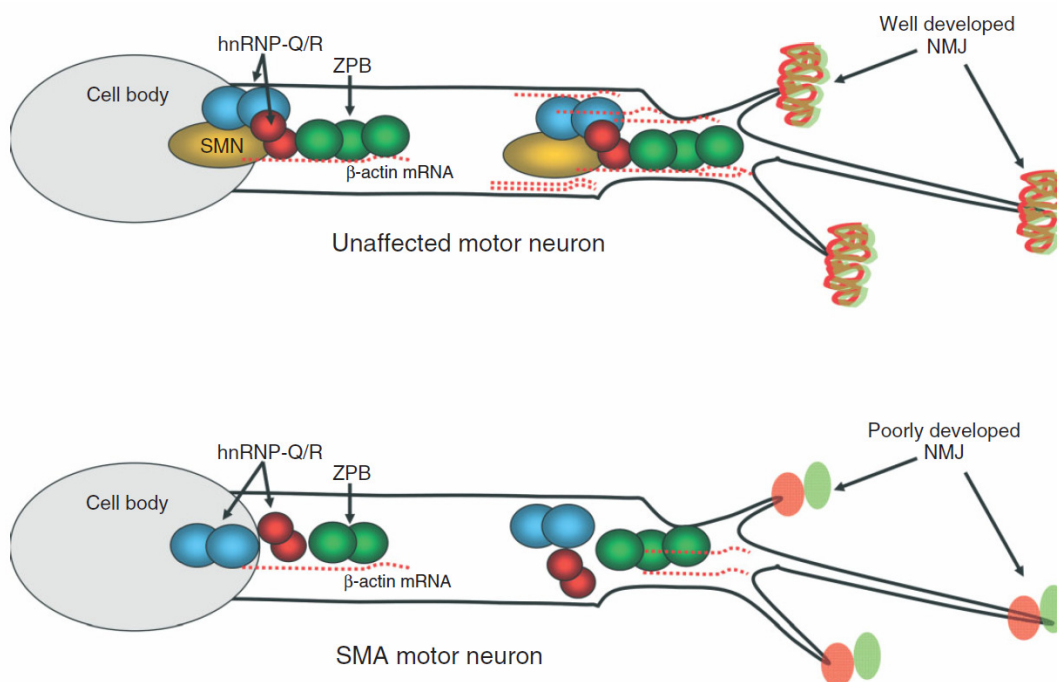


Figura 9. Paper proposat per a l'*SMN* a les neurones implica un nou complex de ribonucleoproteïnes (RNP). Dins dels axons, hi ha una acumulació d'*SMN* que no està formant un complex amb les proteïnes Sm i les Gemines. Formes addicionals d'RNP – *SMN*, que contenen hnRNP-Q i R- (blau) són ZPB (verd) i mRNA de la β -actina. El transport actiu d'aquest complex té com a resultat l'acumulació d'mRNA de la β -actina i proteïnes a l'extrem distal de l'axó i a la unió neuromuscular (NMJ). En l'atròfia muscular espinal (AME, dibuix inferior), els baixos nivells d'*SMN* causen una reducció en l'acumulació dels nivells de la β -actina i tenen unes NMJs poc desenvolupades (Coady i Lorson, 2011).

3.1.5 L'SMN en la transcripció

Pellizzoni *et al.* (2001) van identificar una possible nova funció de la SMN en el procés de transcripció. La proteïna SMN forma un complex macromolecular amb l'RNA de l'helicasa A (RHA), les snRNPs i l'RNA de la polimerasa II. La RHA s'uneix a l'RNA de la polimerasa II (pol II). La interacció de la SMN amb RHA *in vitro* es veu afectada en l'AME; experiments de co-immunoprecipitació indiquen que el complex SMN està associat a pol II, snRNP i RHA *in vivo*. Al nucli, el domini carboxi terminal (CTD) de la pol II aparella, físicament i funcionalment, la transcripció, l'*splicing* i la poliadenilació. El complex SMN interacciona amb la pol II CTD i aquesta associació és mitjançada, almenys en part, per RHA. L'acumulació de formes hiperfosforilades de RHA i pol II induïda per l'expressió d'un mutant negatiu dominant inhibeix la transcripció *in vivo*. Aquestes troballes suggereixen que SMN pot actuar en la transcripció, possiblement pel seu assemblatge a components clau en la maquinària de transcripció/processament dels mRNAs abans que aquests s'associïn als gens.

SMN també interacciona: a) amb la proteïna FUSE-*binding* (FBP), un regulador de la transcripció i de l'estabilitat dels RNAm; b) amb dues proteïnes que formen part de les *small nucleolar* RNPs (snoRNPs) implicades en la transcripció i processament de l'RNA ribosomal; i c) amb el co-repressor de la transcripció mSinA, que s'associa amb les histones decetilases (HDAC) metiltransferases i altres factors per regular l'accessibilitat de la cromatina. La interacció entre SMN i mSinA és dependent d'una regió altament conservada de l'exó 6 (Zou *et al.*, 2004).

3.1.6 SMN i l'estrès

La proteïna SMN també podria funcionar en altres aspectes de la regulació de les snRNPs al citoplasma fins ara no massa coneguts. S'ha trobat que la SMN colocalitza amb marcadors de grànuls d'estrès⁸ (SGs; p.e TIA-1/r i G3BP) al citoplasma, i que podria iniciar i facilitar la seva formació durant la sobre-expressió d'SMN (Hua i Zhou, 2004a). Els mRNAs, RNA ribosòmic (r) i RNA de transferència (t) estan retinguts dins dels SGs en períodes d'estrès. Un cop s'ha recuperat de la situació d'estrès aquests

⁸ Els grànuls d'estrès serveixen de dipòsits d'ARNm de la poly(A), de la proteïna d'unió a la poly(A), ribosomes i components de la traducció, reclutats en resposta a l'estrès ambiental com pot ser "heat Shock" i estrès oxidatiu (Kedersha *et al.*, 1999).

RNAs són alliberats dels SGs i es tradueixen. El paper de la SMN en la formació dels SGs podria tenir implicacions moleculars en la degeneració axonal i mort de les MNs en l'AME (Zhang *et al.*, 2006; Hua i Zhou, 2004a i c). Els exons 2a i 2b, que codifiquen per un domini d'unió en els mRNAs (**Fig. 4**) estan associats a la formació dels SGs possiblement iniciant la seva formació mentre que l'extrem C-terminal (exons 6 i 7) en modulen la formació. Un component nuclear que també s'afecta davant períodes d'estrès són els CBs (Berciano *et al.*, 2007).

3.1.6.1 Estrès oxidatiu

Les cèl·lules estan exposades contínuament a molècules reactives d'oxigen (ROS) de forma natural per la producció d'energia a través de l'oxigen i altres processos metabòlics i per l'exposició a molècules oxidatives ambientals. En condicions normals els antioxidants naturals com l'àcid ascòrbic, el glutatió i determinats enzims neutralitzen ROS. Quan ROS supera la capacitat antioxidant reacciona amb les proteïnes i amb l'àcid desoxiribonucleic (DNA) impedit nombroses funcions fisiològiques formant ponts disulfur intermoleculars que poden ser o no reversibles. Les molècules ROS estan associades a malalties neurodegeneratives i a l'envelliment. Wan *et al.* (2008) van identificar que el complex SMN estava inhibit per ROS conferint ponts disulfur intramoleculars en les unions SMN-SMN, ponts que per altra banda s'estableixen entre les mateixes SMNs de forma natural (Burnett *et al.*, 2008). L'auto-oligomerització a través dels ponts diS pot donar estabilitat i protecció a SMN davant processos irreversibles de ROS. La seqüència que determina els ponts diS forma part de l'exó 7 de les proteïnes SMN; per tant, en proteïnes SMN Δ 7 l'oligomerització d'SMN està impedita, i SMN serà més susceptible a la hiperoxidació permanent. És d'esperar que les cèl·lules metabòlicament més actives, com les neurones, pateixin més estrès oxidatiu. Aquest fet, juntament amb la manca de FL-SMN en les MNs dels pacients amb AME podria ser una de les causes de la mort de les MNs en la malaltia.

3.1.7 L'SMN i l'apoptosi

La proteïna SMN interacciona amb Bcl-2, i la coexpressió de les dues proteïnes té efectes sinèrgics en la prevenció dels efectes de la inducció de l'apoptosi a través de

Bax o Fas. En el cas de l'AME, la interacció entre la SMN portadora de la mutació Y272C o la deleció de l'exó 7 i Bcl-2 no té efectes sinèrgics sobre la inducció de l'apoptosi a través de Bax; la SMN per ella mateixa tampoc té aquesta propietat. Bax pertany a la família de proteïnes Bcl-2, té funcions pro-apoptòtiques i és possible que estigui implicada en la mort neuronal en les malalties de la motoneurona, ja que en situacions de privació de factors tròfics és necessària en la mort de les neurones simpàtiques i les MNs. Ratolins amb deficiència de Bcl-2 pateixen una degeneració de les MNs sensorials, neurones simpàtiques i MNs. Per contra, en l'AME la mort neuronal és bàsicament de les MNs, on els nivells de Bcl-2 són relativament baixos comparats amb els nivells de Bcl-2 de les neurones simpàtiques i sensorials on es mantenen al llarg de la vida. L'SMN, per tant, pot ser imprescindible per a les cèl·lules amb baixes concentracions de Bcl-2 (Iwahashi *et al.*, 1997). Estudis de Garcerá *et al.* (2011), demostren la implicació que tenen proteïnes anti-apoptòtiques, com la Bcl-x₁ (proteïna que pertany a la família de Bcl-2), en la prevenció de la degeneració de les neurites i la mort neuronal en cultius cel·lulars que tenen el gen *SMN* KD. Per altra banda, Young *et al.* (2002) van descobrir la interacció d'SMN (exó2) amb la proteïna pro-apoptòtica p53⁹ (proteïna reguladora, entre d'altres funcions, de la mort neuronal). En condicions fisiològiques normals p53 es troba formant part dels CBs; en canvi, en els pacients amb AME la distribució de p53 és al nuclèol i no forma part dels CBs. P53, per tant, es troba lliure sense cap impediment per a fer la seva funció pro-apoptòtica (Young *et al.*, 2002).

El fet que les MNs tinguin menys quantitat de Bcl-2 i la disminució d'SMN en els pacients amb AME juntament amb "l'alliberació" de p53, suggereix que la causa de la mort de les MNs pot ser deguda a una activació errònia de l'apoptosi. Si sumem el fet que SMN i Bcl-2 no colocalitzen (La Bella *et al.*, 2000), excepte en determinades situacions, però que p53 i SMN si que colocalitzen als CBs (Young *et al.*, 2002) la hipòtesi formulada anteriorment, pren sentit. Una altra proteïna anti-apoptòtica que interacciona amb SMN és la proteïna inhibidora de l'apoptosi neuronal (NAIP) (veure apartat 4.4) (Iwahashi *et al.*, 1997).

⁹ p53 intervé en múltiples processos cel·lulars com el control del cicle cel·lular, la reparació del DNA, l'activació de la transcripció i l'apoptosi.

3.1.8 L'SMN i la banda Z del múscul

Tradicionalment l'AME sempre s'ha atribuït a la deficiència d'SMN a la MN. Actualment, hi ha diverses evidències que el múscul està també especialment afectat, p.e: *in vitro*, MNs WT en co-cultiu amb músculs afectats d'AME eren incapaces de re-innervar els músculs, indicant així un requeriment específic d'SMN dins del múscul (Braun *et al.*, 1995; Guettier-Sigrist *et al.*, 2002) i *in vivo* la integritat de les miofibril·les del múscul esquelètic en ratolins AME tipus 1 és defectuosa, hi ha un increment de vacúols que representen la dissolució de les miofibril·les, lobulacions i alteracions en la distància entre les bandes Z. Fins fa poc no s'havia trobat una relació directa entre SMN i el múscul, fins que es va trobar una nova localització del complex SMN (Smn-Gemines-unrip) unit a l' α -actinina, proteïna que entrellaça els filaments d'actina a la banda Z del múscul esquelètic i cardíac. L'Smn a la *Drosophila melanogaster (Dm)* i al ratolí mostra dos tipus de patró, un granular que correspondria a la Smn del sarcoplasma i un estriat que correspondria a la Smn sarcomèrica. Mutacions al gen SMN a aquests dos models animals provoquen una davallada dels nivells d'Smn acompanyats d'una reducció de l'expressió de l'actina causant una desorganització neuromuscular. Els mio blasts amb la SMN disminuïda tenen defectes en la fusió i proliferació tant en músculs humans com de ratolí; per tant, SMN també és una proteïna sarcomèrica (Rajendra *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2008). El complex SMN forma part del sarcoplasma i no s'ha trobat colocalització amb les U snRNPs indicant que la funció d'Smn al múscul no està relacionada amb la biogènesi de les snRNPs. L'SMN és una diana de la calpaïna una proteasa depenent del calci que s'encarrega del manteniment i remodelació muscular. Walker *et al.* (2008) postulen tres possibles funcions d'SMN dins el múscul: (1) manteniment de la integritat de la banda Z amb el complex SMN com a regulador de l'homeòstasi de la banda Z, (2) senyalització nuclear i (3) transport dels mRNP.

4 Gens modificadors

Els gens modificador juguen un paper molt important en la severitat de les malalties, ajuden a entendre la variabilitat de la malaltia i els mecanismes moleculars i cel·lulars implicats, i permeten el disseny de tractaments personalitzats dirigits a

determinades mutacions; un exemple el trobem en pacients amb fibrosi quística amb mutacions específiques al gen CFTR que reben tractaments específics (Dorfman *et al.*, 2012). En l'AME, estudis en germans discordants i en pacients on el número de còpies d'SMN2 no és correlaciona amb el fenotip de la malaltia han permès identificar proteïnes o mutacions dins el mateix SMN2 que disminueixen la severitat de la malaltia.

4.1 Plastina 3

La identificació de la proteïna Plastin 3 (PLS3) a partir de germans que compartien el mateix genotip però no el fenotip AME va posar de manifest l'existència de gens modificadors en aquesta malaltia. La PLS pertany a una família de proteïnes d'unió a l'actina altament conservades al llarg de l'evolució, que s'expressen en la majoria de teixits dels eucariotes superiors. Els humans tenim dues isoformes, ambdues ubiqües, la PLS-L que es troba al cromosoma 13 i s'expressa només en la línia hematopoètica, i la PLS-T (=PLS3 o fimbrina-T) que es troba al cromosoma X i que s'expressa en cèl·lules de teixits sòlids amb capacitat de replicar-se, com els fibroblasts i cèl·lules endotelials, entre d'altres. Entre els pacients amb AME les dones tenen més increment de PLS3 que els homes possiblement degut a que la PLS3 es troba al cromosoma X (Lin *et al.*, 1993; Oprea *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 2009).

Les dues isoformes provenen del mateix gen i malgrat estar en cromosomes distints tenen una estructura i homologia en el codi genètic molt similar (Lin *et al.*, 1993). La PLS3 no s'expressa per igual entre la població, en pacients no afectats per l'AME és pràcticament inexistent i només un 5% dels individus analitzats van donar positiu per la PLS3, en canvi un 16% de pacients amb AME tipus I i III tenien la PLS3 incrementada; és més, els pacients amb AME positius per la PLS3, la tenien significativament incrementada comparat amb els controls positius per PLS3. Diversos grups han demostrat que l'expressió de la PLS3 és inversament proporcional a l'AME; això, denota la gran importància que té l'actina en el desenvolupament de la malaltia (Oprea *et al.*, 2008; Bernal *et al.*, 2011). La PLS3 modifica la patologia de l'AME estabilitzant els cons de creixement, i ho fa elevat els nivells d'actina F. La PLS3 està incrementada a la ME fetal i adulta així com durant la diferenciació neuronal en rates, suggerint, per tant, un paper de la PLS3 en la neurogènesi; de fet, es pensa que PLS3 és necessària durant les primeres fases del desenvolupament (Borman *et al.*, 2009). Estudis

in vivo amb el peix zebra i *in vitro* amb les cèl·lules PCL12 van permetre descobrir el complex en el qual la Pls3, la Smn i l'actina formen part; van confirmar la implicació de la Pls3 en el desenvolupament dels axons, i que la sobre-expressió de la PLS3 rescata el creixement axonal en MNs en cultiu provinents de ratolins amb AME i en embrions del peix zebra que tenen SMN disminuït (Oprea *et al.*, 2008). La PLS3 s'uneix als filaments d'actina i els empaqueta, l'actina G forma els polímers d'actina F que s'acumulen als cons de creixement i als filopodis. La relació G/F juga un paper molt important en el creixement i en l'acció de trobar el camí dels axons; de fet, els nivells d'actina F incrementen en pacients que expressen la PLS3 (Oprea *et al.*, 2008). L'mRNA de la proteïna β -actina està disminuït en els cons de creixement en cultius de MNs provinents de ratolins amb AME (Rossoll *et al.*, 2003). El fet que la profilina IIa, que intervé en la polimerització de l'actina, es trobi incrementada en l'AME i que la PLS3 es trobi disminuïda (Bowerman *et al.*, 2009) indica una possible implicació d'aquestes dues proteïnes en el desenvolupament de l'AME.

Estudis molt recents en el peix zebra indiquen que Smn influeix en els nivells de la proteïna Pls3 (quan la Smn està disminuïda la Pls3 també ho està), això però, no succeeix a l'inversa; de fet, Smn influeix en la traducció de la Pls3, però no en la transcripció, l'*splicing*, i l'estabilització ni de l'RNA ni de la proteïna. Aquests estudis impliquen, directament, la Pls3 en la severitat de l'AME. Hao *et al.* (2012) demostren que l'expressió de la Pls3 en MNs de peixos zebra, als que se'ls hi ha disminuït Smn, provoca la restauració dels defectes de les NMJs però no de la supervivència¹⁰. Amb aquests experiments evidencien també la importància de la MN en l'AME (veure apartat 6.3.1).

4.2 SMN2 com a gen modificador

L'*SMN2*, com s'ha explicat anteriorment, és una còpia gairebé idèntica del gen *SMN1*. Un simple canvi en la seqüència fa que hi hagi un error en l'*splicing* i l'exó 7 sigui exclòs del seu producte final en un 90% dels casos. Donat que l'*SMN2* disminueix la severitat de la malaltia, s'ha postulat com a gen modificador. Un exemple el trobem en individus que presenten una deleció de les dues còpies d'*SMN1*, però que porten 5

¹⁰ Quan Smn és administrat exclusivament a les MNs s'observa el mateix efecte que quan s'administra Pls3, hi ha una millora de les NMJs però no de la supervivència; Hao *et al.* (2012) indiquen que es necessita un llindar mínim d'Smn a totes les cèl·lules i no només a les MNs per millorar la supervivència dels animals.

còpies d'*SMN2* i són asimptomàtics per l'AME; es postula que 5 còpies d'*SMN2* són suficients per compensar l'absència d'*SMN1* (Prior *et al.*, 2004). Aquesta millora en el fenotip dels pacients amb AME també succeeix en ratolins *Smn*^{-/-} en els quals se'ls hi ha afegit *hSMN2* i *SMNΔ7*, a partir de 4 còpies del transgèn el ratolí manté una vida normal (Monani *et al.*, 2000 a; Hsieh-Li *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2005). Malgrat *SMN2* actua en la majoria dels pacients amb AME, de forma depenent de la dosi, hi ha casos aïllats en que no és així. Al 2009, Prior *et al.* (2009) van identificar la substitució d'una base, c.859G>C, dins el gen *SMN2* en pacients (no relacionats) amb un fenotip menys sever al que s'esperava. Aquest canvi de base crea un nou lloc d'*splicing* que fa incrementar els nivells d'FL-SMN2. Paral·lelament, Hauke *et al.* (2009) van identificar diferències en el patró de metilació del gen *SMN2* implicant una funcionalitat no equivalent entre els gens *SMN2*; van observar que la metilació de determinades illes CpG (*SMN2* en té 4) modulava negativament l'activitat del lloc de començament de la transcripció, disminuint, per tant, el número de còpies d'FL-SMN2. Aquest es un altre motiu en la divergència de fenotips en pacients que comparteixen el mateix número de còpies d'*SMN2* i/o genotip. L'ús de les histones deacetilases (HDAC) és per tant un potencial sistema de tractament.

4.3 *ZPR1* com a gen modificador

El gen *ZPR1* es localitza al cromosoma 11q23.2 i és d'expressió ubiqua. *ZPR1* és un gen essencial, interacciona amb SMN i és imprescindible per la localització d'SMN als cossos de Cajal. La seva funció exacta encara no està resolta però és possible que estigui implicat en el trànsit nucli-citoplasma dels snRNPs que porten SMN. Ratolins KO per *ZPR1* no són viables i els ratolins deficients en *ZPR1* tenen defectes en les poblacions de les snRNPs de l'*spliceosome* tant al citoplasma com al nucli. L'estructura dels CBs està interrompuda impeding, per tant, la finalització de la maduració de les snRNPs, pateixen retracció dels cons de creixement, defectes als axons, apoptosi i mort progressiva de les MNs que resulta en un fenotip similar a l'AME. Hi ha indicis que *ZPR1* i SMN col·laboren en l'assemblatge i maduració de les snRNPs i en la supervivència cel·lular (Gangwani *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2012). La depleció del gen *ZPR1* en ratolins que pateixen la forma d'AME més severa agreuja la malaltia, incrementa la mort de les MNs i provoca la hipermielinització dels nervis

frènics que causa dificultats respiratòries que sovint condueixen a la mort de l'animal. S'ha trobat disminucions en l'expressió del gen *ZPR1* en famílies amb pacients amb AME discordants. Cultius cel·lulars d'aquests pacients demostren que una sobreexpressió de *ZPR1* redueix la severitat de la malaltia, possiblement estabilitzant SMN però no incrementant-ne la seva expressió. Alhora, la sobreexpressió de *ZPR1* en cèl·lules NSC34 i MNs provinents de ratolins amb AME estimula la diferenciació, la formació dels cons de creixement i el creixement axonal, efectes molt semblants als de la *PLS3*, suggerint, per tant, que *ZPR1* pot ser un nou gen protector modificador (Ahmad *et al.*, 2012).

4.4 NAIP com a possible gen modificador

Les delecions de la regió 5q13 varien en funció del pacient amb AME, essent més grans en les formes d'AME més severes. Llavors, és possible que gens propers a *SMN*, com és el cas de la *proteïna inhibidora de l'apoptosi neuronal (NAIP; Fig. 2)* puguin tenir efectes en el desenvolupament de l'AME (Roy *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1995). Estudis en diversos països han detectat que la delecio/interrupció del gen *NAIP* és més freqüent en pacients amb AME tipus I (45-74%) que en pacients amb AME tipus II (25%) o III (8-18%) (Brahe *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996; Akutsu *et al.*, 2002; Omrani *et al.*, 2009). A més a més, la funció respiratòria en pacients amb AME tipus I amb absència del gen *NAIP* es deteriora més ràpidament que en pacients amb AME tipus I on *NAIP* és present (Akutsu *et al.*, 2002). Els responsables de la mort neuronal en l'AME podrien estar relacionats amb la pèrdua de la funcionalitat de les proteïnes SMN i NAIP suggerint, per tant que les proteïnes anti-apoptòtiques podrien regular la supervivència neuronal (Iwahashi *et al.*, 1997).

4.5 Altres gens modificadors

Avui dia només hi ha quatre gens modificadors identificats en humans, *SMN2*, *PLS3*, *ZPR1* i *NAIP*; Dimitriadi *et al.* (2011) en estudis translacionals entre *Caenorhabditis elegans* (Ce) i *Drosophila melanogaster* (Dm) van trobar 4 nous gens modificadors d'*SMN* relacionats amb l'endocitosi i el processament dels RNAs, podria ser que ambdues funcions ajudin a coordinar l'activitat sinàptica i la recepció del senyal

en la traducció de les proteïnes durant el desenvolupament sinàptic i el manteniment neuronal. Fins ara, PLS3 no s'ha relacionat amb l'endocitosi però el seu gen ortòleg en llevats (Sac6p) és crucial en aquest procés.

5 Models animals en l'AME

El fet que *SMN* sigui un gen que està altament conservat al llarg de l'evolució ha facilitat l'estudi de la malaltia amb la creació i l'ús de models animals que a través de canvis genètics induïts desenvolupen la malaltia. S'ha utilitzat els invertebrats *Caenorhabditis elegans* (Ce; Briese *et al.*, 2009; Sleight *et al.*, 2011) i *Drosophila melanogaster* (Dm; Chan *et al.*, 2003, Chang *et al.*, 2008), molt útils per estudis a gran escala de drogues o llibreries de gens KD, i per estudis previs a la validació en mamífers (Dimitriadi *et al.*, 2010; Sleight *et al.*, 2011); i els vertebrats *Xenopus laevis/tropicalis* (Xl, Xt respectivament; Ymlahi-Ouazzani *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2005), *Danio rerio* (Dr; MacWorther *et al.*, 2003; Boon *et al.*, 2009) i *Mus musculus* (Mm; Hiesh-Li, *et al.* 2000; Monani *et al.*, 2000a i b). Com que els ratolins tenen les característiques neuromusculars més semblants als humans són els més adients per entendre la biologia del sistema nerviós i la patogènesi de l'AME.

5.1 Invertebrats

Els models invertebrats ofereixen molts avantatges per entendre la biologia de la malaltia. A primer cop d'ull són molt diferents als humans però moltes vies moleculars implicades en la funció de la cèl·lula estan conservades. S'ha identificat una gran quantitat de paral·lelismes entre els models d'AME i els mamífers, com és la neurotransmissió alterada, i defectes en els receptors pre- i postsinàptics, la plasticitat sinàptica i la fisiologia muscular, entre d'altres. L'ús de models animals invertebrats accelera la identificació dels mecanismes moleculars rellevants per a la malaltia que poden ajudar a trobar noves dianes terapèutiques, identificació de gens modificadors i l'assaig de possibles tractaments (Dimitriadi *et al.*, 2010; Lloyd *et al.*, 2010; Grice *et al.*, 2011b).

5.1.1 *Drosophila melanogaster*

L'estudi de la *Drosophila melanogaster* (Dm) ha estat essencial per entendre el desenvolupament i la funció del sistema nerviós. Moltes malalties neurodegeneratives i neuromusculars com l'AME, l'atròfia muscular espino-bulbar i la distròfia miotònica s'han beneficiat del seu ús (Lloyd *et al.*, 2010).

El complex dSmn (Smn de *Drosophila*) en Dm consisteix en un cor proteic format per la proteïna dSmn i la Gemina2; en Dm, han estat també identificats homòlegs a la Gemina 3, la Gemina5 i la proteïna unrip (Cauchi *et al.*, 2010). Tal i com passa en humans, el complex dSmn s'uneix a proteïnes Sm i és necessari per a l'assemblatge de les snRNPs. Modificacions a l'extrem C-terminal (caixa YG) redueixen l'auto-oligomerització d'SMN. Les larves mutants tenen dificultats tant en la maduració dels receptors postsinàptics com en la neurotransmissió. Les afectacions neuromusculars és tradueixen en una desorganització dels filaments d'actina; va ser precisament en la Dm que Rajendra *et al.* (2007) van identificar una nova localització d'SMN a la banda Z del sarcòmer i defectes en les NMJs (Chang *et al.*, 2008). Combinacions de l'expressió de dSmn al múscul i a les neurones rescata el desenvolupament de la larva, suggerint una dualitat MN-múscul en l'AME; de fet, la deleció de dSmn en ambdós sistemes és letal, però quan es deleciona dSmn només al múscul, l'afectació de la larva és més primària i el fenotip més sever (Chan *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2008; Grice *et al.*, 2011b). Els nivells d'expressió de dSmn a les cèl·lules mare de Dm estan molt incrementats, nivells que disminueixen a mesura que les cèl·lules es van diferenciant. Davant una reducció de dSmn, les cèl·lules mare redueixen les divisions donant lloc a menys cèl·lules i amb els nivells de snRNAs més baixos, alhora que es retarda el desenvolupament general de la larva (Grice i Liu 2011b). El nivell d'homologia d'*SMN* amb *dSmn* és d'un 31%.

5.1.2 *Caenorhabditis elegans*

El *Caenorhabditis elegans* (Ce) és un cuc hermafrodita amb un cicle reproductor i vital molt curt; és fàcil de fer créixer i de mantenir, i les línies transgèniques s'obtenen amb facilitat i rapidesa. El seu genoma, diverses vies bioquímiques i el sistema de

neurotransmissió s'han conservat al llarg de l'evolució. La seva gran capacitat reproductora el fa ideal per a estudis a gran escala de modificacions genètiques (gran facilitat d'obtenir mutants amb diversos graus d'afectació) i testat de drogues (Sleigh *et al.*, 2010; Grice *et al.*, 2011a). El seu sistema nerviós és molt simple, un individu adult té 302 neurones i cada neurona té una determinada posició i identitat que és reproduïble d'animal a animal (Grice *et al.*, 2011b). L'ortòleg d'*SMN1* a Ce (*smn-1*) s'expressa a totes les cèl·lules al llarg del desenvolupament i, com passa en humans, es localitza al nucli i al citoplasma on està específicament incrementat al sistema neuronal. La regulació a la baixa o la deleció d'*smn-1* causa seriosos problemes en el seu desenvolupament amb una aturada massiva d'embrions dins de l'ou en etapes avançades del desenvolupament. L'aportació materna d'*smn-1* permet el desenvolupament primerenc tot i que amb seriosos problemes que sobretot impliquen el sistema neuromuscular i reproductor als que en surten. Per altra banda, la sobreexpressió d'*smn-1* també provoca problemes motors fet que ens indica que *smn-1* és un gen extremadament regulat (Miguel-Aliaga *et al.*, 1999; Briese *et al.*, 2009). En situacions de depleció d'*SMN*, l'única diferència notable de Ce respecte els humans i els ratolins és l'absència de la pèrdua de MNs colinèrgiques i els defectes en la morfologia del sistema nerviós. L'expressió d'*smn-1* a nivell neuronal rescata parcialment el fenotip en animals on *smn-1* està disminuït, indicant una implicació del múscul en la malaltia (Briese *et al.*, 2009).

El complex *smn-1* està format per les Gemines2, 3, 6, 7 i 8 (Cauchi *et al.*, 2010), les proteïnes Sm i la proteïna de processament de l'RNA fibril·larina (FIB-1). Burt *et al.* (2006) van identificar una sèrie de proteïnes que interaccionaven amb *smn-1*: *hyaluronan mRNA binding domain* implicada en l'estabilització dels mRNAs; membres de la família de les DEAD box helicases (p.e. la Gemina3), implicades en el metabolisme de l'RNA que inclou la transcripció, l'*splicing* dels pre-mRNAs, la biogènesi dels ribosomes, el transport nucleo-citoplasmàtic, la traducció i la degeneració dels RNAs; i l'homòleg de l'RNA polimerasa II, implicat en la finalització de la transcripció entre d'altres.

5.2 Vertebrats

5.2.1 *Xenopus laevis* / *tropicalis*

El ous de *Xenopus laevis* (Xl) han estat molt utilitzats per a estudiar l'assemblatge de les U snRNPs perquè en el seu citoplasma emmagatzemen grans quantitats de proteïnes Sm que s'utilitzaran en les primeres etapes del desenvolupament (Mattaj *et al.*, 1988). Les proteïnes Sm, SMN i SIP1 tenen diferent localització als oòcits i a les cèl·lules somàtiques, als oòcits estan bàsicament al citoplasma (Fischer *et al.*, 1997). Si es silencien *Smn* a Xl el desenvolupament s'atura a la gastrulació i les cèl·lules blanques que envolten el bastopor manifesten seriosos defectes; un fenotip semblant s'observa quan es regula a la baixa la *Gemina2* (Winkler *et al.*, 2007).

Estudis detallats en *Xenopus tropicalis* (Xt) demostren que l'expressió d'*Smn* és més elevada a la gastrulació i a la neurulació. La inhibició del gen *SMN* a Xt provoca una atròfia muscular caudal als capgrossos de l'amfibi. A les primeres etapes del desenvolupament ni els músculs ni les MNs ni l'agregació dels receptors d'acetilcolina estan afectats. L'atròfia muscular sembla que és deguda a alguna via de senyalització aberrant que dona axons motors curts i aturada del creixement. A Xt la disminució dels nivells d'*Smn* en embrions en desenvolupament causa atròfia muscular i truncaments dels axons motors, amb un canvi en la topologia de les MNs però sense evidències d'apoptosi. L'atròfia muscular s'evidencia al començament del desenvolupament malgrat els receptors d'acetilcolina i les NMJs estiguin formades (Ymlahi-Ouazzani *et al.*, 2009).

L'estructura del gen *Smn* de *Xenopus* és semblant a l'*SMN* humana, curiosament Xt té dues transcripcions que difereixen en l'absència de l'exó 2b, la transcripció del gen més expressat és llarga, més abundant i estable i el menys expressat és curta i inestable, indicant que *SMN1* i *SMN2* humans són co-ortòlegs de l'*Smn* trobat a Xt. La proteïna *Smn* s'hereta via materna i s'expressa arreu des de les primeres etapes del zigot; aquesta *Smn* heretada no s'afecta davant experiments de disminució de la seva expressió i no és fins el desenvolupament del capgròs que els efectes de la regulació a la baixa d'*Smn* es fan evidents. A baixes dosis de morfollinos s'observa una eskena corbada, problemes de moviment i paràlisi; si s'augmenta la dosi hi ha una mortalitat

elevada i si es dóna el cas que sobreviuen tenen un fenotip corbat que és degut a una disminució de la massa muscular i a la degeneració de les fibres musculars; aquestes anomalies musculars no apareixen en les primeres etapes del desenvolupament. Aquests fenotips es poden rescatar amb Smn de Xl. Les unions neuromusculars són menys ramificades i els axons més curts, en l'anàlisi de marcadors d'acetilcolina per veure si aquests axons són capaços de formar sinapsis van observar diferents nivells d'afectació. Curiosament, el patró de les MNs no s'alterava davant la disminució d'Smn i el fet que hi hagi anomalies axonals, però no mort neuronal, ens indica que aquests amfibis presenten una axonopatia que no està causada per la mort neuronal (Ymlahi-Ouazzani *et al.*, 2009).

5.2.2 *Danio rerio*

El peix zebra és un organisme excel·lent per a estudiar les malalties humanes ja que el seu desenvolupament embriològic està molt ben caracteritzat i tenen una gran capacitat “d'acollir” canvis genètics. El va introduir Streisinger als anys 70, i tal i com passa amb els models animals prèviament mencionats, és un animal amb una gran capacitat reproductora, fàcil de mantenir i manipular genèticament. Al tenir els gàmetes externs i transparents ens permet veure l'evolució de l'embrió a través del microscopi òptic des del dia 1 de la fecundació, característica que no confereixen ni Ce ni Dm, els dos models animals més utilitzats fins llavors en estudis mutagènics. Els genetistes utilitzaven Dm i Ce des de feia temps i quan es va voler introduir el peix zebra van sorgir detractors, bàsicament pels dubtes evolutius de l'animal. Es va veure però, que la majoria de vies bioquímiques i moleculars estan conservades; de fet l'homologia a nivell del complex SMN respecte els humans és molt alta, el peix zebra conté les mateixes proteïnes que els humans per formar el complex (Gemines 2-8 i UNRIP) (Cauchi *et al.*, 2010). Streisinger creia en la necessitat de l'anàlisi mutagènic en vertebrats; des del començament va estudiar les característiques de l'organització i desenvolupament embriològic del sistema nerviós del peix utilitzant soques mutants, i estava particularment interessat en els mecanismes implicats en la formació de determinades connexions sinàptiques i en els senyals que guien els axons a determinades dianes. El peix zebra té grans avantatges en el camp de la neurociència, com són la fàcil identificació de totes les neurones de l'animal i la possibilitat d'observar els axons en creixement *in vivo* (Dodd *et al.*, 2000; Grunwald i Eisen 2002).

Tal i com passa en altres organismes, els nivells d'Smn estan regulats al llarg del desenvolupament. En estudis de mutagènesi en el peix zebra s'ha vist que el fenotip de l'animal depèn dels nivells i del moment de l'expressió d'Smn (Boon *et al.*, 2009). L'ús d'Smn matern durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari pot emmascarar els possibles defectes primerencs del propi Smn. La disminució dels nivells d'Smn al peix zebra, en embrions en desenvolupament, produeix defectes en el sistema neuromuscular: truncaments amb posteriors ramificacions dels axons motors independentment de la mort de les MNs, que en cas de produir-se és tardana. La possibilitat de disminuir els nivells d'Smn a determinades MNs ha permès identificar per primera vegada que canvis en el desenvolupament de les MNs posen en perill el creixement de l'axó, indicant per tant el paper essencial d'Smn a la MN (McWorther *et al.*, 2003). No es pot obviar però, la importància que tenen els U snRNPs i les proteïnes que formen part del complex SMN, com la Gemina2, en el manteniment dels axons motors; el subministrament d'U snRNPs a peixos deficients en Smn i Gemina2 permeten la formació correcta dels axons, implicant directament la importància de l'assemblatge de les RNPs (Winkler *et al.*, 2005). L'absència de paràlisi o defectes en el moviment denota que el sistema muscular en el peix zebra amb deficiències d'Smn no té afectacions notables; no obstant, no es descarta la possibilitat d'afectacions més subtils al múscul (McWorther *et al.*, 2003). De fet, Boon *et al.* (2009) van detectar defectes en les proteïnes dels terminals presinàptics, SV2 estava notablement disminuïda en animals on Smn estava disminuït; aquests defectes eren rescatats amb l'administració d'*hSMN*, indicant per tant la importància d'Smn en les MNs per al desenvolupament correcte de les NMJs. Aquesta disminució d'SV2 pot reflectir una disminució de les vesícules presinàptiques, l'ancoratge d'aquestes al terminal o la capacitat de mantenir la integritat dels components presinàptics essencials. En el cas que la disminució d'*Smn* fos posterior al creixement axonal i a la formació de les NMJs, perillava el manteniment del terminal presinàptic. Les MNs estan afectades tant en el creixement axonal com en el manteniment de les sinapsis neuromusculars. La disminució d'U snRNPs també causa la degeneració dels axons.

5.2.3 *Mus musculus*

El model animal de ratolí permet l'estudi dels processos biològics i la valoració de la funció dels gens i les proteïnes en un context de mamífers, així com estudis pre-clínic en l'assaig de possibles tractaments (Sleigh *et al.*, 2011). L'SMN i altres proteïnes del complex (gemines 2-8 i UNRIP) tenen el seu homòleg en ratolí (Cauchi *et al.*, 2010). El fet que els ratolins només tinguin un gen *Smn* implica que la deleció homozigota del gen sigui letal (Schrank *et al.*, 1997). La introducció del gen *SMN2* humà ha permès rescatar els embrions de la mort i plasmar els diferents tipus d'AME humana amb defectes semblants a la ME i al múscul esquelètic. I tal i com passa en humans, la gravetat de la malaltia varia en funció del número de còpies d'*SMN2* que porti el ratolí (Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000b). Els ratolins que porten una o dues còpies d'*SMN2* desenvolupen la malaltia els primers dies de vida i es refereixen com a model sever o tipus I; ratolins amb 4 o més còpies mostren un fenotip totalment normal. Per altra banda, Jablonka *et al.* (2000) estudiant els heterozigots pel gen *Smn* troben una mort neuronal en edats adultes fenotip que correspondria al d'un pacient amb AME tipus III.

La regió crítica del gen *SMN* és una zona molt dinàmica i variable propensa a reorganitzacions; està duplicada tant en ratolins com en humans, però a diferència dels humans, el gen *Smn* a ratolins es manté únic mentre que hi ha múltiples còpies del gen *NAIP* (Growney *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000b). Diferents grups s'han aproximat a la malaltia per diversos camins, o bé amb KOs condicionals a determinats teixits (Frugier *et al.*, 2000) o bé transgènics absoluts, on totes les cries afectades de la ventrada manifesten la malaltia per igual i les seves cèl·lules expressen els mateixos nivells d'*Smn* representant un tipus determinat d'AME, p.e: *Smn*^{-/-};*hSMN2*^{+/+} que representa l'AME tipus I, o *Smn*^{-/-};*hSMN2*^{+/+};*hSMNΔ7*^{+/+} que representa l'AME tipus II o tipus I lleu (Monani *et al.*, 2000 a; Le *et al.*, 2005); o bé transgènics on dins la mateixa ventrada s'hi trobin els diferents tipus d'AME (Hsieh-Li *et al.*, 2000); les diferències que s'observen, entre els diferents grups, en referència al mateix tipus d'AME poden ser degudes a les construccions dels transgènics, deleció de l'al·lel per *SMN2* o KO de l'exó 7. En el cas del model animal de l'AME tipus I la mort neuronal és moderada i es manifesta al final de la malaltia, els ratolins presenten debilitat muscular i l'esquena en curvatura (Dachs *et al.*, 2011).

6 SMN i el sistema neuromuscular

6.1 La motoneurona

Les MNs en l'adult es poden classificar en 3 tipus: α - són les MNs més grans que innerven fibres extra-fusals del múscul estriat i dirigeixen la contracció; les γ - són MNs petites, amb una velocitat de conducció inferior a les α ; tenen l'arbre dendrític simple, innerven les fibres intra-fusals dels fusos musculars, tenen un paper complex en el control motor i modulen la sensibilitat; i les β - menys conegudes, innerven les fibres intra- i extra-fusals. Les MNs α són les més abundants i es poden dividir en 3 subtipus en funció de les propietats contràctils del múscul diana, les *fast-twitch fatigable* (FF), les *fast-twitch fatigue resistant* (FR) i les *slow-twitch fatigue resistant* (S). Els marcadors coneguts que s'utilitzen per diferenciar les MNs α de les γ són postnatsals (per exemple el NeuN per les MNs α i la subunitat $\alpha 1$ del receptor del *glial cell-line derived factor* (GFR $\alpha 1$)), i no està clar si són marcadors tardans de poblacions genèticament determinades a estadis primerencs, o bé si és a nivell postnatal que les diferents interaccions amb la perifèria finalment estableixen una distinció molecular entre les MNs α i les γ . Totes les MNs, incloses les que moren per la mort cel·lular programada, contacten el múscul. Hi ha dues teories sobre el grup de MNs que moren: (1) totes les MNs poden morir i que la competència pels factors de supervivència, que són limitats, és el que determina la mort; (2) hi ha MNs predisposades a morir, per tant que tenen determinades característiques que les diferencia de les que sobreviuran (Kanning *et al.*, 2010).

6.2 Desenvolupament del sistema neuromuscular

Les motoneurons de la ME són el primer tipus neuronal que apareix al sistema nerviós. Es generen a la placa basal de la línia endodermal i d'allà migren cap al que serà la banya ventral de la ME. Durant el desenvolupament embrionari, gairebé totes les poblacions neuronals tenen una fase de proliferació mitòtica que ve seguida de la mort per apoptosi de les neurones, que varia d'entre un 20 i un 90% de neurones inicials en funció de la classe; aquest procés s'anomena mort cel·lular programada (PCD). Es

desconeixen els factors que activen la PCD però probablement hi participen factors intrínsecs de les neurones i extrínsecs que poden ser diferents en funció de la situació (Li *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*; 1999). La mort de les MNs (entre E13 i E18 en ratolí mb un pic a E14 (Lance-Jones 1982)) està estretament lligada al desenvolupament del múscul. En fetus humans la PCD succeeix entre la setmana 8 i la 13, coincidint amb el contacte funcional neuromuscular; en el cas de fetus afectats per l'AME es prolonga fins a la setmana 20.

6.2.2 La PCD en l'AME

Les MNs de fetus amb AME mostren nuclis elongats amb la membrana nuclear deformada, contenen grànuls d'intercromatina i pericromatina que indiquen la presència de degeneració cel·lular, i un increment de la mort neuronal (15-35%); per altra banda, les cèl·lules glials no estan alterades. La mort de les MNs fetals és per apoptosi mentre que la mort postnatal succeeix per altres mecanismes. És conegut, però, que les MNs embrionàries són més vulnerables a l'apoptosi que les adultes, per tant el retard en la maduració, com passa en l'AME, agreuja la situació (Fridzianska i Rafalowska, 2002; Soler-Botija *et al.*, 2002; Biondi *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2012). Experiments en ratolí mostren que la mort de les MNs en estadis terminals de la malaltia és moderada i no hi ha evidències de mort neuronal en estadis embrionaris, indicant que la PCD, que en ratolins passa entre E13 i E18, no està alterada (Yamamoto *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 2000; Dachs *et al.*, 2011).

Als amfibis, mamífers i ocells els axons entren a la massa pre-muscular abans que comenci la formació dels miotubs; el contacte nervi-múscul apareix just quan hi comença a haver els primers miotubs, i és llavors, quan es troben els primers indicis d'estimulació i contracció muscular; en aquest període, fins i tot es poden trobar alguns cons de creixement amb algunes vesícules. El desenvolupament del múscul succeeix en dues fases, la primera correspon a la formació dels miotubs primaris (E15-E17 a la rata); és una fase autònoma en la qual hi ha la fusió de mioblasts mononucleats¹¹ que s'estenen de tendó a tendó del múscul embrionari i formen una bastida per al posterior desenvolupament dels miotubs secundaris; els miotubs primaris estan predestinats a ser

¹¹ Les cèl·lules miogèniques poden derivar a miotubs primaris, miotubs secundaris o a les cèl·lules satèl·lit del múscul. Els tres tipus cel·lulars tenen origen mesodèrmic, ara bé, no se sap si formen part del mateix llinatge o reflecteixen la presència de dues o més línies mare cel·lulars (Ross *et al.* 1987a).

les fibres musculars lentes o tipus I. La segona fase (a partir d'E19 a la rata), que requereix del contacte amb el nervi motor, és la formació dels miotubs secundaris que donaran lloc a les fibres ràpides o tipus II; en alguns músculs les fibres tipus II revertiran a les tipus I en resposta a determinats senyals. Al començament comparteixen làmina basal, però a mesura que els miotubs secundaris creixen van adquirint la seva pròpia làmina basal i, ultraestructuralment, és impossible de distingir els uns dels altres. La innervació regula el nombre de miotubs generats al múscul. L'assincronia entre l'eliminació dels terminals nerviosos dels músculs i el temps en què hi ha la mort de les MNs a la zona lumbar evidencia que la mort en un determinat *pool* està regulada pel múscul diana. En rates els miotubs secundaris es formen posteriorment a la mort de les MNs (Ross *et al.* 1987; Jansen i Fladby, 1990; Bischoff *et al.*, 2004). Ross *et al.* (1987a) suggereixen que la mort de les MNs serveix per a regular el nombre de MNs per tal de determinar la proporció entre els miotubs secundaris *versus* els primaris, alhora, el sistema nerviós regula el nombre de miotubs secundaris controlant la formació dels mio blasts. En el cas de denervació parcial la probabilitat de formar miotubs secundaris queda reduïda. Ross *et al.* (1987b) conclouen que la innervació regula quantitativament la generació de les fibres musculars i és més que un simple suport del desenvolupament muscular.

6.2.2 Cèl·lules satèl·lit

Els animals en creixement incrementen el nombre de fibres i la seva longitud a través de la formació de nous sarcòmers i l'increment del diàmetre per l'addició de noves fibres. Després del naixement les cèl·lules satèl·lit són l'única font de precursors miogènics dins el múscul esquelètic. Excepte algunes cèl·lules satèl·lit que estan actives per tal de mantenir la proporció nucli/citoplasma en el múscul en creixement, la majoria estan en estat de quiescència. S'activen durant el procés normal de creixement, en l'exercici, en estiraments i davant de músculs danyats; seguidament proliferen, es diferencien i o bé es fusionen amb les fibres danyades o formen noves miofibres dins la làmina basal (Seale *et al.*, 2001; Tamaki *et al.*, 2002; Jejurikar i Kuzon, 2003).

Les cèl·lules satèl·lit són un tipus de cèl·lula mare que vénen de les cèl·lules miogèniques, es troben al múscul on comparteixen la làmina basal amb les cèl·lules

musculars (en un 70% dels casos) i expressen M-Cadherina i Pax7¹²; el 30% restant estan dins l'espai intersticial, aquestes expressen CD34¹³, Sca1 i a l'inici també Pax7, es poden diferenciar en cèl·lules miogèniques, endotelials, osteòcits i adipòcits. Està demostrat que les cèl·lules satèl·lit tenen capacitat migratòria (Tamaki *et al.*, 2002; Bischoff *et al.*, 2004; Dreyfus *et al.*, 2004; Shefer *et al.*, 2004). Tenen el nucli oval sovint en línia amb el mionucli adjacent. Es troben al llarg de tots els músculs de vertebrats i la seva freqüència varia en funció: (i) del tipus muscular, les fibres *slow-twitch* en tenen una quantitat més elevada; (ii) de l'edat, en animals són més abundants en individus joves i en individus grans incrementa la seva susceptibilitat a entrar en apoptosi, en humans en canvi no varia ni la seva proporció ni la capacitat de proliferació; i (iii) de l'espècie. Es troben amb més quantitat properes a les NMJs, tot i que no se n'ha trobat una funció que les relacioni. Contribueixen en el creixement muscular, tenen dos pics de davallada en el nombre de cèl·lules, el primer és postnatal (2 mesos en ratolins i 9 anys en humans) on s'arriben als nivells adults i el segon és durant la senilitat (Jejurikar i Kuzon, 2003; Bischoff *et al.*, 2004). Estudis recents han descobert que l'origen de les cèl·lules mare miogèniques pot venir de la medul·la espinal o bé que el mateix teixit connectiu conté les anomenades cèl·lules *side-population*. Aquestes cèl·lules, són diferents de les cèl·lules satèl·lit amb un alt grau de plasticitat i que es troben amb més freqüència a l'espai intersticial de músculs embrionaris i joves; al múscul adult la majoria de cèl·lules miogèniques són cèl·lules satèl·lit (Seal *et al.*, 2001; Bischoff *et al.*, 2004; Tamaki *et al.*, 2002). Les cèl·lules satèl·lit després de la denervació tenen una fase de proliferació ràpida. No obstant, si el període de denervació s'allarga les cèl·lules satèl·lit disminueixen sobtadament, probablement, com a conseqüència de la pèrdua d'estimulació neuro-elèctrica, degut als factors de creixement o per l'aparició de zones sense vascularitzar (Borisov *et al.*, 2005).

¹² Les cèl·lules mare que formaran part del llinatge miogènic a l'embrió expressen Pax3, mentre que en individus adults expressen Pax7. Pax 7 s'expressa només a cèl·lules mononucleades que o bé es diferenciarien en miotubs o bé formaran cèl·lules satèl·lit (Horst *et al.*, 2006).

¹³ CD34 juntament amb Myf5 són marcadors d'una població específica de cèl·lules satèl·lit en estat quiescent, CD34 prové de la línia hematopoètica i s'ha trobat a capil·lars, als fusos musculars, als axons i recentment descobert a les cèl·lules satèl·lit; les cèl·lules miogèniques precursors són CD34. Curiosament les cèl·lules satèl·lit quiescents expressen una isoforma de CD34 truncada que esdevé sencera davant l'activació de la cèl·lula satèl·lit; és probable que aquestes dues isoformes tinguin diferents funcions en el manteniment i l'activació de les cèl·lules quiescents durant la renovació i regeneració tissular (Beauchamp *et al.*, 2000).

Les cèl·lules satèl·lit atreuen els monòcits i utilitzen els macròfags per escapar-se de l'apoptosi i promoure el creixement del múscul. Les cèl·lules satèl·lit produeixen 5 tipus diferents de substàncies quimio-atraients dels monòcits: 1) un factor de creixement (VEGF), que indueix la quimiotaxis vascular, pot prevenir la mort muscular i dóna suport a la regeneració; 2) un sistema proteolític amb activitat quimotàctica (uPA/uPAR), amb funcions proteolítiques i no-proteolítiques, que té lloc durant els processos de migració cel·lular, pot controlar l'activació i migració de les cèl·lules satèl·lit i la quimioatracció; i 3) quimioquines: 3) la *MP-derived chemokine* (MDC), que no es troba al múscul esquelètic d'adults i el seu receptor s'expressa només en un 6% dels monòcits, activa els macròfags i millora la seva capacitat fagocítica amb molta rapidesa; 4) la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), que es produeix davant processos pro-inflamatoris, la seva regulació a l'alça és essencial per a l'amplificació de la quimiotaxi; i 5) la *fractalkine* (FKN), que té una gran capacitat d'atracció dels monòcits; (Chazaud *et al.*, 2003).

6.2.2.1 Les cèl·lules satèl·lit i el gen *SMN*

Durant la miogènesi de les cèl·lules satèl·lit, en experiments *in vitro*, l'expressió dels mRNAs d'*SMN* té dos pics d'actuació, el primer pic apareix al dia 2, just abans que les cèl·lules satèl·lit es comencin a fusionar i el segon apareix al dia 5, abans d'acabar-se la fusió i possiblement està implicat en la maduració dels miotubs. Els mioblasts de pacients amb AME tipus I o II, tenen l'expressió dels mRNAs reduïda, el segon pic no es pot observar i el primer és molt reduït respecte els controls (Guettier-Sigrist *et al.* 2001). Estudis més recents, on la deleció de l'exó 7 del gen *Smn* en ratolins s'ha provocat exclusivament a les cèl·lules satèl·lit, demostren que el ratolí desenvolupa una miopatia severa causant la mort de l'animal al mes de vida. Per contra, si el gen mutat es manté a les cèl·lules satèl·lit, la miopatia és més lleugera i la supervivència s'allarga fins als 8 mesos. Les diferències entre el mutant sever del lleu són: 1) la capacitat que té el mutant lleu de regeneració muscular, que va acompanyada d'un increment de l'expressió d'*Smn*; i 2) el mutant sever té el nombre de cèl·lules satèl·lit que expressen CD34 reduït (Nicole *et al.*, 2003).

6.2.3 Macròfags

Els macròfags són cèl·lules molt versàtils, poden incrementar la lisi de les membranes musculars i per tant augmentar el dany muscular a través de la síntesi i alliberació de citoquines, d'espècies oxigen reactives, d'enzims proteolítics i d'òxid nítric entre d'altres. Però, per altra banda, poden promoure el creixement muscular i la seva reparació després d'una lesió. Aquests rols aparentment contradictoris poden indicar l'existència de dues subpoblacions macrofàgiques diferents a nivell muscular: una de fagocítica o M1, on els macròfags es concentren a les zones danyades i sovint es poden infiltrar a les fibres, són d'actuació ràpida (pic de concentració al segon dia després de la lesió) i una no-fagocítica o M2 amb una distribució homogènia i que no envaeix les fibres musculars (amb un pic de concentració al dia 4) (St Pierre i Tidball, 1994; Kigerl *et al.*, 2009). Tidball i Wehling-Henricks (2007), en experiments d'eliminació de macròfags entre els dies 2 i 4 (eliminant per tant els macròfags reparadors) van observar que la reparació no es produïa, confirmant, per tant, l'existència d'una segona població. Estudis en paral·lel d'Arnold *et al.* (2007), indiquen que davant una lesió, els primers monòcits en arribar són pro-inflamatoris i tenen funcions fagocitàries i d'estimulació del creixement de les cèl·lules satèl·lit. Posteriorment, un cop s'han fagocitat les cèl·lules miogèniques necròtiques o apoptòtiques i altres elements ambientals (Chazaud *et al.*, 2009), els monòcits canvien el seu fenotip a anti-inflamatori, es diferenciaran en macròfags i proliferaran. Seguidament, els macròfags estimularan la diferenciació de les cèl·lules satèl·lit, la miogènesi i el creixement de les fibres (**Fig. 10**).

Els macròfags, en concret els que deriven de la micròglia, tenen una altra funció de gran interès a nivell neuromuscular, la de promoure la regeneració dels axons del SNC; per altra banda, els macròfags també alliberen factors que maten les neurones i la glia, la determinació d'una o altra via va en funció de les influències que el microambient que envolta la lesió afecta la seva regulació. Alhora el creixement axonal es produeix en zones on la micròglia activada crea gradients de GDNF i BDNF que donen suport a l'*sprouting* regeneratiu, però no es produeix en focus inflamatoris enriquits amb macròfags derivats dels monòcits (Gensel *et al.*, 2009).

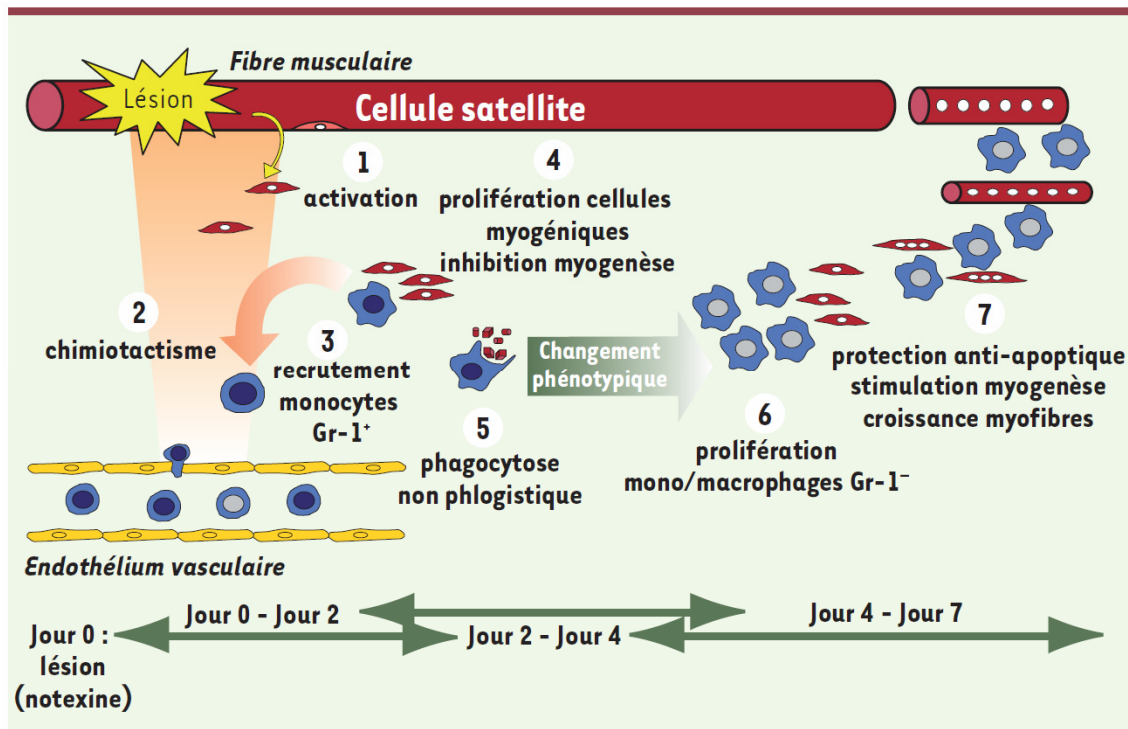


Figura 10. Model del paper dels macròfags durant la regeneració muscular després d'una lesió per toxicitat. La lesió induïx l'activació de les cèl·lules satèl·lit (1), les quals secreten factors quimiotàctics que atrauran els monòcits circulants (2). Els monòcits reclutats (3) presenten un perfil inflamatori. Aquests estimulen la proliferació de les cèl·lules miogèniques i n'eviten la seva diferenciació (4). Juntament amb les cèl·lules miogèniques s'interestimulen per tal d'amplificar el reclutament de monòcits (2). Al mateix temps, els monòcits/macròfags fagociten les restes necròtiques que ha provocat la lesió (5). Aquesta fagocitose participa en el canvi de fenotip dels monòcits/macròfags observats al múscul, que a partir d'aquest moment presentaran un perfil antiinflamatori. Aquests proliferaran (6) i donaran suport a la miogènesi (7) protegint les cèl·lules miogèniques de l'apoptosi estimulant la diferenciació miogènica i el creixement de les fibres en regeneració. (Extret de Chazaud, Chrétien i Gherardi 2007)

Entre les seves funcions, els macròfags poden estimular el creixement de les cèl·lules satèl·lit, atreure-les per afavorir la seva migració al llarg de les fibres musculars o a través de la làmina basal cap al lloc de regeneració muscular i rescatar-les de l'apoptosi (Chazaud *et al.*, 2003).

6.3 La Motoneurona *versus* el múscul com a causa principal de l'AME

Actualment hi ha dos corrents científics sobre qui és el responsable del fenotip de l'AME, si (a) els baixos nivells d'SMN afecten a les MNs causant deficiències en la seva funcionalitat o (b) si aquests baixos nivells d'SMN causen defectes al múscul. Per determinar quin dels dos tipus cel·lulars és la causa de tots els defectes en l'AME

diversos grups han estudiat els efectes de la disminució d'SMN a la MN o al múscul exclusivament.

6.3.1 L'SMN en la Motoneurona

Per determinar si la mort de les MNs és la causa directa del fenotip AME, s'ha vist que la deleció d'*SMN*, o mutants *SMN* induïbles dirigida només a les MNs, o bé a MNs i oligodendròcits provoca un fenotip AME en ratolins. En tots els casos els ratolins amb AME (amb un fenotip més o menys sever) tenen una supervivència més curta que els controls, presenten absència de gems, agregacions de coilina als nuclis de la ME i deformacions dels nuclis de les MNs (tal i com es troba en fetus humans). Pel que fa al múscul, presenten fibres musculars atrofiques¹⁴ (que recorden la morfologia de les biòpsies musculars de pacients AME) i denervació d'origen neurogènic amb greus defectes a les NMJs, on s'observa una agregació dels receptors d'acetilcolina en els músculs distals i proximals, essent més acusada en aquests últims. L'ús de ratolins amb *Smn* induïble, demostren que incrementant *Smn* només a MNs és suficient per corregir la hiperexcitabilitat en les MNs d'animals amb AME i eliminar *inputs* sinàptics aberrants. No obstant, no hi ha mort neuronal indicant, per tant, que tot i que la MN és la primera diana afectada per la manca d'SMN la mort neuronal és una manifestació tardana de la malaltia (Frugier *et al.*, 2000; Gogliotti *et al.* 2010; Park *et al.* 2010). S'observa per tant una implicació directa de les MNs en la malaltia de l'AME sense excloure la resta de cèl·lules, com les cèl·lules de Schwann que s'activen quan es perd el contacte amb l'axó (Li and Thompson, 2011) i el múscul en la modulació del fenotip en general. Aquests resultats concorden amb la recuperació del fenotip en què subministrant FL-SMN exclusivament en les MNs a ratolins que pateixen l'AME tipus I recuperen el fenotip i incrementa el temps de supervivència, mentre que si el subministrament de FL-SMN és a múscul no hi ha cap millora en el fenotip; no obstant, quan l'aportació de baixes dosis d'SMN es produeix al múscul i a la MN alhora, l'impacte és superior (Gavrilina *et al.*, 2008). Per determinar l'afectació de les MNs *in vitro*, cultius primaris de MNs aïllades de la zona lumbar d'embrions de ratolí amb AME a l'edat d'E14 mostren una viabilitat normal respecte els WT, però, tenen els

¹⁴ Respecte els defectes en les fibres musculars quan es tracta de ratolins amb la deleció d'*SMN* total i als que se'ls hi ha afegit el transgèn humà *SMN2*, no s'observen diferències en el tipus de fibres en els ratolins AME, en canvi s'observa una disminució del seu diàmetre respecte els WT (Dachs *et al.*, 2011)

axons més curts i en els cons de creixement, la dinàmica de la β -actina i l'excitabilitat espontània estan significativament afectats (Rossoll *et al.*, 2003; Jablonka *et al.*, 2007).

El sistema nerviós sensorial es pensava que no estava afectat en l'AME. Jablonka *et al.* (2006) analitzant neurones sensorials aïllades de ratolins *Smn*^{-/-}; *hSMN2*^{+/+} van observar una disminució en el creixement de les neurites i els cons de creixement, així com una disminució de l'mRNA de la β -actina, indicant, per tant, un desenvolupament incorrecte de les neurones sensorials; no obstant, no van trobar diferències amb els controls respecte a la mort. Recentment, s'han identificat canvis primerencs previs a la paràlisi muscular i als defectes en la unitat motora en les projeccions de les neurones sensorials que van cap a la banya ventral, i que la pèrdua de les sinapsis centrals, en concret dels inputs propioceptius als somes de les MNs i de les dendrites proximals, ambdós precedeixen la mort de les MNs en els ratolins amb AME. De fet, dèficits en el sistema nerviós autònom en concret en la innervació cardíaca provoquen la mort per atac de cor. Aquestes troballes indiquen defectes primaris que juntament amb altres defectes no neuromusculars, contribueixen en el fenotip AME, ambdós en presència o absència de la disfunció motora; no obstant, es pensa que la pèrdua de les sinapsis sensorials-motors és una conseqüència de la disfunció de la MN (Ling *et al.*, 2010; Gogliotti *et al.* 2010; Park *et al.*, 2010; Mentis *et al.*, 2011).

L'expressió de la Pls3 (gen modificador, veure apartat 4.1) directament a MNs millora els defectes de les NMJs en peixos zebra que tenen l'*Smn* disminuït, una altra demostració que les MNs estan directament implicades en l'AME (Hao *et al.*, 2012).

6.3.2 L'SMN en el Múscul

Els primers estudis *in vitro* realitzats per determinar si el múscul està implicat directament en l'AME apareixen al 1987 per Henderson *et al.*, en què en cultius de neurones dissociades de pollastre cultivades en presència d'extractes de múscul de pacients AME es produïa una inhibició del creixement de les neurites, indicant, per tant, que el múscul de pacients AME conté substàncies que poden inhibir la formació de neurites en cultius de múscul de pollastre postnatales. Uns anys més tard, Braun *et al.* (1995) van experimentar amb co-cultius de cèl·lules satèl·lit musculars de pacients AME tipus I, II i III i MNs de rata, van demostrar que tot i produir-se contacte entre les MNs i els miotubs, un patró correcte de creixement de les neurites i resposta a la

contracció muscular induïda, aquest comportament i fenotip no es mantenia més enllà de les 3 setmanes de cultiu. En músculs provinents de pacients AME tipus I o II, a diferència dels controls, hi havia degeneració de les fibres amb vacuolització, desorganització del citoesquelet i la formació de *myoballs*. Braun *et al.* (1995) van concloure que la causa d'aquestes deficiències o bé era deguda a que les fibres d'AME produïen factors tòxics que es difonien, o bé que eren incapaces de produir factors tròfics. Anys més tard, el mateix grup (Guettier-Sigrist *et al.* 2001) van concloure que cap d'aquestes dues suposicions era correcta. Les úniques cèl·lules necessàries per a una correcta innervació són els fibroblasts (implicats en la formació de la lamina basal que envolta les miofibres) i les cèl·lules miogèniques (mioblasts al fetus i les cèl·lules satèl·lit a individus postnats); no obstant, les que intervenen en la degeneració dels cultius innervats són només els mioblasts i són aquests que proporcionen els factors necessaris per a la supervivència de la unitat motora. La fusió de les cèl·lules satèl·lit musculars, l'expressió de l'mRNA d'*SMN* i de la proteïna, i el factor de transcripció miogènica estan afectats, impedint, per tant, que el múscul esquelètic es desenvolupi correctament (Guettier-Sigrist *et al.* 2001). Aquests dos estudis indiquen que: (i) hi ha deficiències en la comunicació múscul malalt-MN sana, implicant, per tant, el múscul en els defectes primaris de l'AME; (ii) hi ha un patró d'expressió d'*SMN* específic al múscul, que probablement té un paper important en el manteniment funcional de la unitat motora; (iii) l'expressió del factor miogènica depèn d'*SMN*, per tant, davant nivells baixos d'*SMN* hi ha menys expressió del factor miogènica, fet que implica defectes en la fusió de les cèl·lules musculars i una afectació en la maduració muscular; i (iv) probablement les miofibres de les cèl·lules musculars no poden enviar els senyals apropiats per a la supervivència de les MNs (Braun *et al.* 1995; Guettier-Sigrist *et al.* 2001). Estudis de la cinètica de les cèl·lules musculars i de l'apoptosi de les MNs en co-cultius de múscul-MN mostren que la mort per apoptosi de les MNs succeeix més ràpidament en els co-cultius d'AME que en els dels controls. En els co-cultius múscul AME-MN de rata van observar alteracions als miotubs quan aquests es posaven en contacte amb les MNs, fet que no s'observava en miotubs sols ni dels controls ni dels AME; alhora van observar un increment de l'apoptosi de les MNs donat que dues setmanes després que el contacte múscul-MN fos establert començaven a morir, possiblement degut a que la innervació no s'acabava de completar; en el cas de miotubs provinents de pacients AME tipus I aquesta mort apareixia a les 24h. Per tal de determinar la mort neuronal van quantificar les micro-partícules alliberades, per veure

com els miotubs d'AME tipus I induïen la mort apoptòtica de les MNs; la quantitat de micropartícules alliberades pels miotubs AME tipus I era 4 vegades superior a l'alliberat pels miotubs control al dia 1, i l'origen de les micropartícules era tant dels miotubs com de les MNs. Curiosament, quan els co-cultius es feien amb neurones sensorials no es produïa aquesta degeneració (Guettier-Sigrist *et al.* 2002).

Estudis *in vivo* en ratolins amb deleció del gen *Smn* específicament a múscul, donen un fenotip de distròfia muscular severa amb l'aparició de fibres necròtiques envoltades per cèl·lules mononuclears infiltrades, desorganització del sarcolemma, disminució de la distrofina, poca proporció de nuclis centrals indicant que la regeneració muscular està disminuïda i amb la mort prematura de l'animal (mitjana de 33 dies). No obstant, els aparells pre- i postsinàptics estan intactes i no hi ha evidències de mort neuronal. Aquest estudi revela que el múscul esquelètic també està afectat per les disminucions d'*Smn* (Cifuentes-Díaz *et al.* 2001). L'observació del múscul en fetus amb AME indiquen un retard en el desenvolupament i el creixement independent de l'afectació de les MNs (Martínez-Hernández *et al.*, 2009).

Determinats músculs com el LAL, que es poden dividir en la part caudal, on les MNs que innerven aquesta zona són susceptibles a l'AME, i la rostral, on les MNs que l'innerven són resistent a l'AME, aporten noves informacions sobre la patologia de l'AME al múscul no atribuïble a la degeneració de les MNs. Mutsaers *et al.* (2011) van utilitzar la part rostral del LAL de ratolins nous, AME tipus I, per determinar molècules que estaven regulades a l'alça o a la baixa. Van identificar que la majoria de molècules alterades són reguladores de la funció i patologia muscular, com proteïnes que contribueixen en trastorns musculars i proteïnes que participen en vies de mort cel·lular. Aquestes molècules regulen la resposta del múscul davant el dèficit d'*Smn*. Aquests resultats han estat confirmat en pacients amb AME tipus II i III.

6.3.3 Conclusió

Malgrat la depleció d'*SMN* al múscul i a la neurona, per separat, provoquin paràlisi muscular severa i mort, hi ha característiques que els diferencien: en el fenotip neuronal, el múscul presenta denervació amb zones amb fibres atrofiques; per contra, en el fenotip muscular, el múscul adquireix un fenotip distròfic, amb la presència de fibres necròtiques i miòcits en regeneració i no presenten ni denervació ni mort de les MNs. Hi ha evidències que ambdós tipus cel·lulars, juntament amb les cèl·lules glials, estan

directament afectats per la disminució d'SMN, ja sigui perquè els defectes en la maduració de les MNs impliquin una manca de maduració del múscul, o *viceversa*; sembla ser, però, que en cas que l'afectació primària fos a la MN aquesta començaria per les parts distals i no pel cos neuronal (Frugier et al., 2000; Cifuentes-Díaz *et al.* 2001; Fan i Simard, 2002).

7 Unions neuromusculars

Les unions neuromusculars dels vertebrats estan formades per tres tipus cel·lulars, les MNs, les fibres musculars i les cèl·lules de Schwann terminals (SCt). Les SCts cobreixen el terminal sinàptic i són crítiques per a la integritat estructural i el creixement del contacte sinàptic (Lee *et al.*, 2011).

7.1 Diferenciació pre- i postsinàptica

La formació de les NMJs comença poques hores després de tancar-se el tub neural. És un procés complex, espacial i temporalment sincronitzat, on hi intervenen el nervi, el múscul i la glia. Les fibres musculars i les MNs expressen, independentment, la majoria dels components de la NMJ madura. Primer l'axó terminal d'una neurona colinèrgica reconeix la fibra diana del múscul esquelètic, possiblement pel reconeixement de determinats epítops de membrana (glicoproteïnes com la N-CAM). Aquests axons contenen diversos tipus de “paquets” de transport que s'usaran per l'assemblatge de les estructures de la presinapsi: com paquets de vesícules sinàptiques, estructures i precursors de les zones actives com les vesícules de transport del Bassoon/Piccolo (PTVs) (**Fig. 11a**). Les PTVs són vesícules *dense core* de 80nm, amb molta mobilitat, que contenen diversos components de les zones actives (ZAs): (1) components que formen la matriu del citoesquelet (CAZ), com el Rab3a/c, el RIM, els Munc-13 i Munc-18, el Piccolo i el Bassoon i subunitats del canal de calci tipus N i P/Q; i (2) altres proteïnes de les zones actives implicades en l'exocitosi com la syntaxina i SNAP25; però no transporten molècules característiques de les vesícules sinàptiques com la SyPhys o VAMP. Les PTVs constitueixen les vesícules precursors de la ZA i de dues a tres PTVs podrien conduir a la formació de noves ZAs unint-se a la membrana presinàptica. En axons immadurs apareixen espontàniament en zones

primitives d'alliberació de vesícules sinàptiques al llarg dels segments axonals (**Fig. 11b**). Els contactes entre els axons i les seves dianes fa que hi hagi una acumulació dels paquets de transport formant el que s'anomenen botons presinàptics primaris (**Fig. 11c**). En el cas dels contactes axó-dendrítics la formació de la ZA per la fusió de les vesícules precursoras de la zona activa (PTVs) i el subseqüent reclutament de les vesícules sinàptiques es produeix ràpidament (**Fig. 11d**). Al llarg dels propers dies hi haurà la formació de les sinapsis madures (**Fig. 11e**). Un cop s'han format els botons presinàptics, unitats de materials de les zones actives poden escindir-se de la presinapsi i recórrer l'axó, sovint per donar lloc a altres llocs de presinapsis (**Fig. 11d**; Zhai *et al.*, 2001; Shapira *et al.*, 2003; Ziv i Garner, 2004).

Els cons de creixement de l'axó terminal tenen la maquinària per l'alliberació espontània o induïda d'acetilcolina, alliberació que millora un cop s'ha establert el contacte amb la fibra muscular. Els principis de la làmina basal del múscul la formen els receptors d'acetilcolina (AChR) i la membrana dels mio blasts; al començament estan uniformement repartits i quan el múscul entra en contacte amb l'axó incrementen la seva densitat i s'agreguen; per altra banda, l'axó forma petites ramificacions i varicositats al seu terminal. Un cop s'ha establert el receptor subsinàptic primerenc el desenvolupament de la NMJ s'alenteix i comença un procés d'acoblament entre el constant creixement de l'arbre presinàptic i la membrana postsinàptica, en aquest moment els AChR ja s'han estabilitzat. L'estabilització dels AChR es produeix per dos fenòmens: l'increment de la vida metabòlica mitjana i per la seva immobilització a la membrana postsinàptica. Alhora el terminal presinàptic incrementa la densitat de les vesícules, perd els microtúbuls del terminal de l'axó i s'eixamplen per cobrir més superfície del terminal postsinàptic. El darrer pas és l'acumulació de mitocondris i la polarització del terminal (Jansen i Fladby, 1990; Ziv i Garner, 2004; Patton i Burgess, 2005).

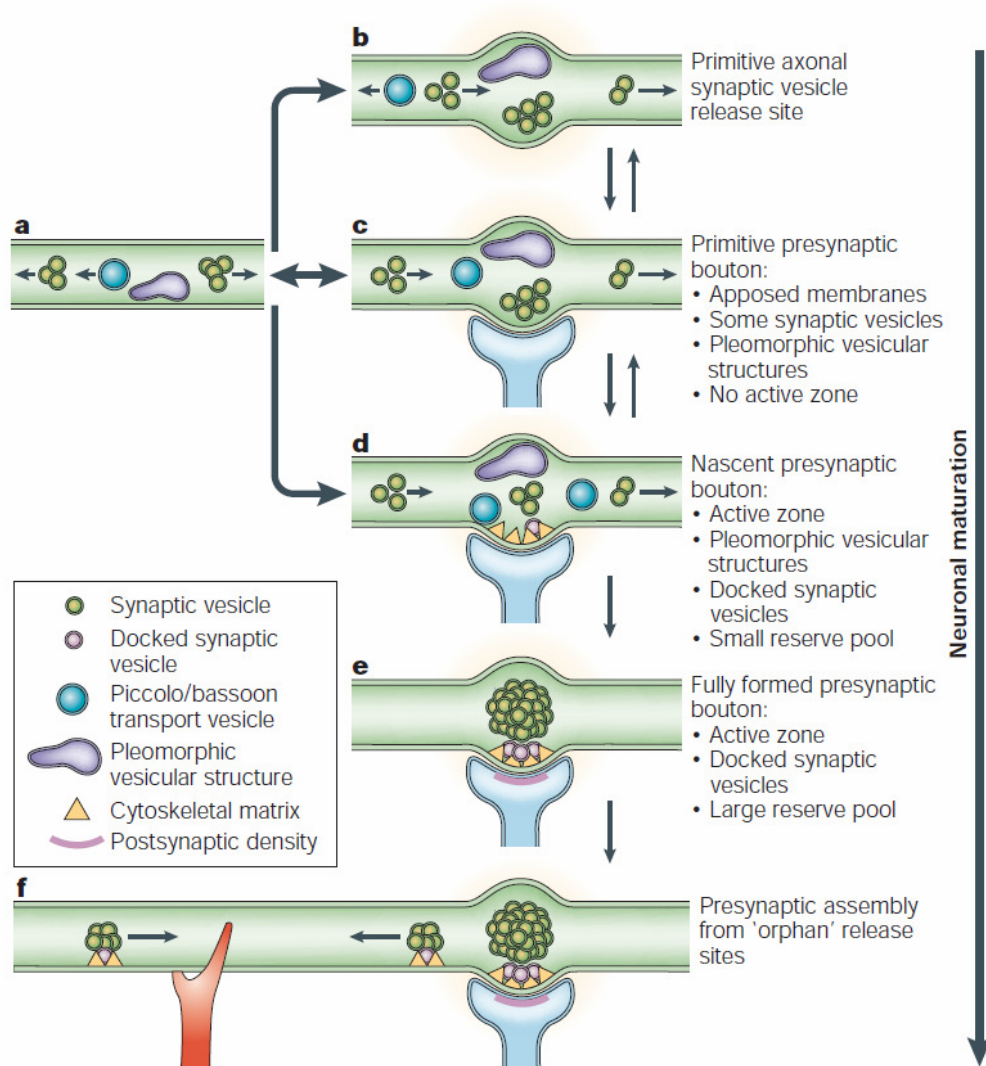


Figura 11. Model d'assemblatge del terminal presinàptic. L'assemblatge presinàptic es produeix per múltiples processos que tenen lloc en diferents temps. Cal assenyalar que hi ha una gran incertesa pel que fa a molts detalls d'aquest esquema. Per exemple, no se sap si la formació dels llocs presinàptics segueixen un ordre, precís, temporal dels esdeveniments. En primer lloc es podrien formar els llocs presinàptics primitius (c), seguit per la formació de la zona activa (fletxa de c a d), o bé, els llocs primitius es poden col·lapsar (fletxa de c a a) i reformar-se posteriorment d'acord amb l'esquema d (fletxa de a a d). Podria ser que els llocs d'alliberament a l'axó (b) es formessin primer i després es convertissin en una zona sinàptica (fletxa de b a c), o, eventualment, desaparèixer (fletxa de b a a) (explicació completa en el text, Ziv i Garner, 2004).

7.2 Diferenciació dels terminals presinàptics

En la diferenciació dels terminals presinàptics (**Fig. 12**) hi intervenen diferents factors: els contactes entre les fibres musculars i els axons són mediat per la làmina basal de les miofibres entre els quals hi participen 3 laminines. La laminina 4

s'encarrega de la formació correcta dels plegaments postsinàptics; la laminina 9, amb l'ajuda dels canals de calci presinàptics, alinea les zones actives presinàptiques amb els plegaments postsinàptics; i la laminina 11 organitza la formació de la NMJ i interrelaciona el nervi, el múscul i la cèl·lula de Schwann. A part de les laminines hi ha altres factors com l'agrina, factors de creixement, neurotropines i molècules d'adhesió cel·lular que hi intervenen; p.e. l'agrina inhibeix el creixement de les neurites i promou l'agrupació de les vesícules (Jansen i Fladby, 1990; Patton i Burgess, 2005).

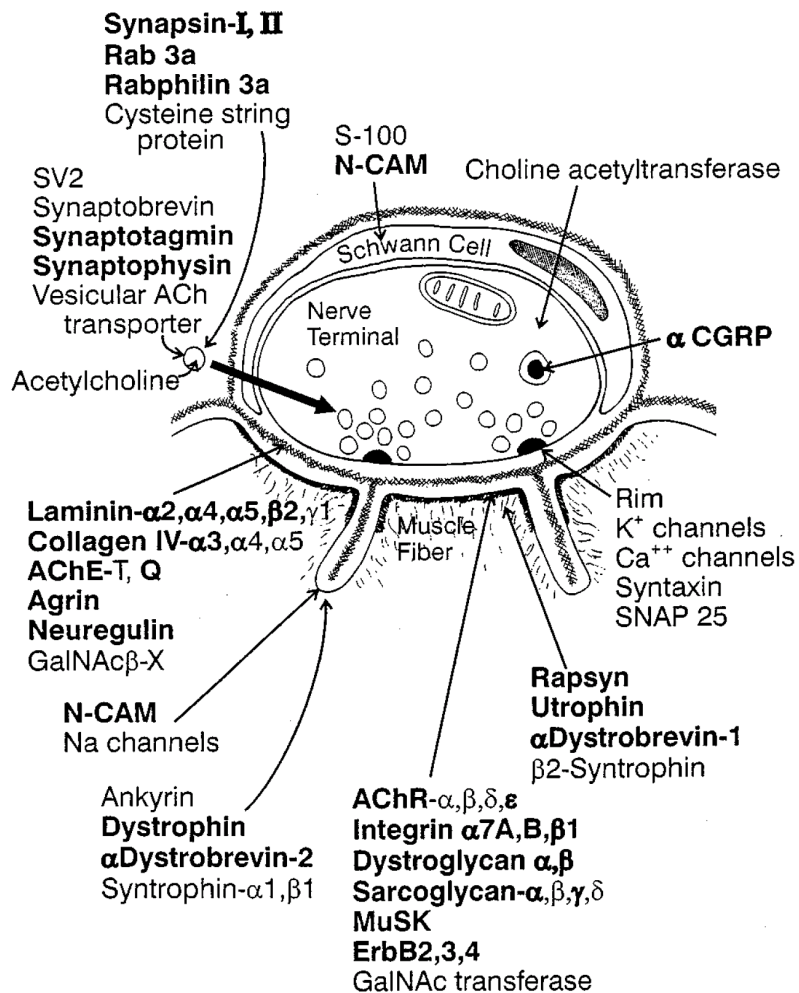


Figura 12. Estructura molecular i arquitectura de la unió neuromuscular. El nervi terminal ocupa un canal poc profund en la fibra muscular i està cobert pels processos de les cèl·lules de Schwann. Les zones actives al terminal nerviós s'oposen als plecs d'unió de la membrana postsinàptica. Es mostren algunes de les proteïnes concentrades a la sinapsi, amb les seves localitzacions subcel·lulars indicades per les fletxes. Les proteïnes marcades en negreta indiquen que s'han generat els ratolins knock-out (Sanes & Lichtman, 1999).

7.3 Diferenciació dels terminals postsinàptics

La diferenciació dels terminals postsinàptics (**Fig. 12**) inclou la creació de dominis sub-cel·lulars i característiques morfològiques que ajudin al múscul a respondre davant un estímul dels neurotransmissors, els primers marcadors postsinàptics són els AChR. Quan els mioblasts es fusionen per formar els miotubs aquests comencen a sintetitzar les subunitats $\alpha 2\beta\gamma\delta$, que formen un pentàmer funcional i s'insereixen a la membrana a una densitat de $1000\mu\text{m}^{-2}$. El desenvolupament del terminal postsinàptic depèn de senyals extrínsecs (agrina, neuregulina i acetilcolina) secretats pel nervi, i d'intrínsecs de la mateixa làmina basal del múscul. L'agrina, que es sintetitza en diferents isoformes tant al múscul com als nervis, es secretaria durant la formació de la sinapsi promovent així la diferenciació postsinàptica i l'estabilització de zones postsinàptiques a l'adult. L'agrina, activa una quinasa específica del múscul (MuSK) a la superfície del miotub promovent l'agrupament dels AChR i altres components postsinàptics a través de l'associació amb la Rapsina. En les NMJs madures, l'agrina s'acumula a la làmina basal de la fenedura primària de la sinapsi. La neuregulina manté les especialitzacions postsinàptiques en les NMJs madures i és essencial per a la supervivència de les cèl·lules de Schwann, que tenen un paper crític en la formació de les NMJs, en el suport del metabolisme i en el manteniment del nervi terminal, també influeixen en els nivells generals de la innervació muscular millorant l'eficàcia de la transmissió de la senyal i en la reparació després del trauma. La funció principal de l'acetilcolina (ACh) és l'obertura dels canals iònics en els AChRs i despolaritzar la membrana de la fibra muscular; actua en els canvis en el calci intracel·lular permetent l'entrada del calci a través dels AChRs (Jansen i Fladby, 1990; Sanes, Lichtman, 2001; Pun *et al.*, 2002; Patton i Burgess, 2005; Cao i Co, 2007). Pun *et al.* (2002) van trobar que la sinaptogènesi neuromuscular, considerada aquí com a la forma i velocitat de desenvolupament, és diferent en funció del múscul. Van classificar els músculs en tres grups: Fast Synapsing (FaSyn), Delayed Synapsing (DeSyn) i un grup que mostra un patró intermedi en que la maduració s'assoleix abans dels DeSyn però després dels FaSyn. Aquests músculs difereixen en l'agregació dels AChRs, en l'alineació dels terminals presinàptics amb els AChRs agregats i amb l'alineació de les cèl·lules de Schwann amb el terminal presinàptic. Mentre que els FaSyn assoleixen aquests passos

en menys d'un dia i independentment del nervi¹⁵, els DeSyn poden tardar 5 dies, a més a més la tardança en assolir la maduració completa dels DeSyn (3-9 mesos) fa que siguin músculs més vulnerables durant els primers mesos de vida; pel manteniment dels agregats d'AChRs requereixen la presència del nervi.

7.4 Modelatge i maduració de les NMJs

Un dels processos de maduració comporta canvis en la cinètica dels canals incrementant així l'eficiència en la transmissió del senyal. Altres canvis moleculars impliquen incrementar l'estabilitat dels receptors del terminal sinàptic, possiblement incrementant les interaccions amb el citoesquelet i la làmina basal, que alhora també pateix canvis en la seva composició.

Les NMJs embrionàries reben de 3 a 5 axons provinents de diferents MNs i no és fins a estadis postnatsals que s'eliminen tots menys un. En funció del múscul i durant diversos dies postnatsals la mateixa MN té una dinàmica contínua de pèrdua i formació de terminals sinàptics. L'eliminació dels axons es produeix: (1) per interaccions competitives, com les diferències en els nivells d'activitat sinàptica entre els diferents terminals que innerven la mateixa fibra, essent també, la cèl·lula diana qui intervé en la competició; o (2) per la capacitat limitada que tenen les MNs per mantenir el terminal, com la competència per algun factor tròfic o les diferències en la vulnerabilitat a substàncies tòxiques alliberades pel múscul; o (3) pel fet que les NMJs que han de ser eliminades adquireixen diferents propietats moleculars. Quan els axons terminals comencen a ramificar-se, durant aquest primer període d'estabilització, el terminal postsinàptic inicia el procés de plegament (per arribar a adquirir la forma de *pretzel-like*), l'acetilcolina esterasa (AChE) s'acumula als plects mentre que els AChR s'acumulen a les crestes (densitat de $10000\mu\text{m}^{-2}$). Aquest procés té una durada de setmanes i pel que fa a les fibres ràpides un cop s'ha format el terminal s'estabilitza, mentre que en les lentes poden patir petites modificacions. El procés de transició dels AChRs embrionaris als adults es fa a través de 4 mecanismes: (i) redistribució dels AChRs cap a la zona sinàptica; (ii) increment de l'estabilitat dels AChRs a través de la seva agregació (passant de tan sols 1 dia de residència en estat embrionari fins a 14 dies

¹⁵ Indica, per tant, que FaSyn no necessita de l'agrina provinent del nervi en el moment de la formació de la sinapsi. L'agrina, però sí que és necessària per augmentar l'agregació dels AChRs; per millorar l'alineació del nervi i les cèl·lules de Schwann amb els agregats d'AChRs i per mantenir la NMJ.

en l'adult) i pel canvi de la subunitat γ o embrionària per la ϵ o adulta; (iii) especialització en la transcripció de les diferents subunitats dels AChRs causant una acumulació de l'mRNA de l'AChR, i d'altres components postsinàptics en els mionuclis més propers a la membrana postsinàptica; i (iv) l'eliminació d'aquesta especialització als mionuclis no postsinàptics. A més a més el canvi d'una subunitat dels AChRs provoca un canvi en la permeabilitat del calci (Jansen i Fladby, 1990; Ziv i Garner, 2004).

En processos de reinnervació de músculs adults els axons tenen preferència pels terminals postsinàptics existents i l'agrina, una proteïna produïda per les MNs, participa en l'assemblatge de les dues membranes. En cas de dany muscular, a diferència de la formació de les sinapsis a nivell embrionari, les cèl·lules encarregades de guiar els axons cap al múscul són les cèl·lules de Schwann (Jansen i Fladby, 1990; Patton i Burgess, 2005). Recentment, Murray *et al.* (2011), en experiments de denervació i hipòxia en ratolins recent nascuts i adults van descobrir que durant un període de poques setmanes després del naixement, les NMJs postnatales són menys vulnerables que les adultes; aquest període coincideix amb el període de màxima modulació de les NMJs. Un dels factors que podria influenciar en la vulnerabilitat són les cèl·lules de Schwann que davant la denervació embrionària pateixen un procés apoptòtic mentre que en adults s'indueix la seva proliferació i *sprouting*. Aquests resultats són sorprenents donat que sempre s'havia considerat que les NMJs adultes eren més resistents.

Una NMJ madura està formada pel terminal presinàptic, el terminal postsinàptic i les cèl·lules de Schwann. Les NMJs madures tenen un període curt de resposta als neurotransmissors (NT) que és imprescindible per a un funcionament adequat de les sinapsis. Els processos que ho possibiliten són: (i) AChE treu els NTs de les sinapsis, i (ii) hi ha un canvi en la cinètica dels AChR.

7.5 Assemblatge de les zones actives en els terminals presinàptics

Les ZAs són regions especialitzades de la membrana plasmàtica presinàptica on les vesícules sinàptiques s'ancoren, es fusionen i alliberen els seus NTs. La ZA és una estructura dinàmica, extremadament i organitzada (**Fig. 15**). La seva morfologia i composició molecular varia en funció de les espècies, teixits i cèl·lules; l'arquitectura, però, està conservada (Shapira *et al.* 2003; Zhai i Bellen, 2004).

La ràpida formació de les ZAs és deguda, en part, a la fusió d'una vesícula precursora (~80nm) de la ZA amb la membrana plasmàtica presinàptica. El seu assemblatge succeeix després del contacte inicial de l'axó i la seva diana i finalitza amb l'establiment del llocs d'alliberació dels NTs. Les ZAs estan estrictament regulades i per permetre que totes les ZAs tinguin equitat en l'accés de les vesícules i/o la maquinària de reciclatge, cal un mínim d'espai entre dues ZAs. Ultraestructuralment es diferencien per la característica que són zones electrodenses, formades per filaments del citoesquelet íntimament associats a la membrana plasmàtica amb agrupacions de vesícules enganxades i oposat a la zona electro-densa de la membrana postsinàptica. (Zhai *et al.*, 2001; Zhai i Bellen, 2004).

Les ZAs són regions de la membrana presinàptica especialitzades en la l'ancoratge i fusió de les vesícules des del punt de vista morfològic i zones d'alliberació dels NTs des del punt de vista fisiològic. Segons aquestes definicions podem dividir les ZAs en 3 components: (1) la membrana plasmàtica està composta per canals de calci depenents del voltatge per on entra el calci, i per punts de fusió vesicular que és per on s'alliberen els NTs; ambdós llocs molt propers entre si. Les zones de fusió de les vesícules estan especialitzades de manera que la fusió d'ambdues membranes forma un por de fusió hidrofílic, procés facilitat pel complex proteic SNARE (syntaxina i SNAP-25). Un altre component important de la membrana plasmàtica són les molècules d'adhesió (cadherines, protocadherines, nectines, neurexina, etc.) que uneixen, amb alta precisió, les ZAs i les zones denses de la membrana postsinàptica. Aquestes proteïnes, excepte la neurexina (d'expressió presinàptica) s'expressen en ambdós terminals, i tenen 3 motius en comú, un domini extracel·lular encarregat de la unió amb la matriu extracel·lular o amb la membrana postsinàptica, un domini transmembrana d'ancoratge, i un domini intracel·lular que s'uneix al citoesquelet o a les proteïnes de bastida. Aquestes molècules no només participen en la unió de les dues membranes, sinó que també tenen un paper molt important en la modulació de la neurotransmissió. (2) La matriu cel·lular, situada a la zona interna de la membrana plasmàtica, on hi ha l'ancoratge de les vesícules; la seva estructura, que en el SNC de mamífers és una xarxa de partícules piramidals (**Fig. 13A-C**) unides per fibril·les deixant unes ranures que és on s'uniran les vesícules, permet alinear perfectament un canal de calci amb una vesícula, permetent així una correcta i fidel alliberació. (3) La zona electro-densa (ZED) s'estén des de la matriu cel·lular fins al citoplasma i és on hi ha les vesícules sinàptiques lligades. La morfologia de les ZEDs varia en funció del tipus de sinapsi, quan més grans

siguin, més vesícules sinàptiques s'uniran i conseqüentment s'incrementarà la mida del *readily releasable pool*. Recentment, s'ha descobert que algunes d'aquestes zones tenen proteïnes sinàptiques d'unió com la RIM, la sinapsina, el Piccolo i el Bassoon (Zhai i Bellen, 2004).

Les proteïnes de les ZAs de la matriu cel·lular es poden dividir en tres grups, en funció de la seva funció: (i) proteïnes del citoesquelet com l'actina i la miosina entre d'altres, que formen els elements fonamentals del marc de les ZAs de la matriu cel·lular; (ii) proteïnes de bastida (munc-18, CASK, etc.) que en les ZAs enllacen els canals iònics i la maquinària de fusió per assegurar la correcta funció de les ZAs; i (iii) les proteïnes de la zona activa, RIM, Munc-13, Bassoon, Piccolo, etc. que participen en l'ancoratge, l'encebat, la fusió de les vesícules i en l'assemblatge de l'estructura de les ZAs.

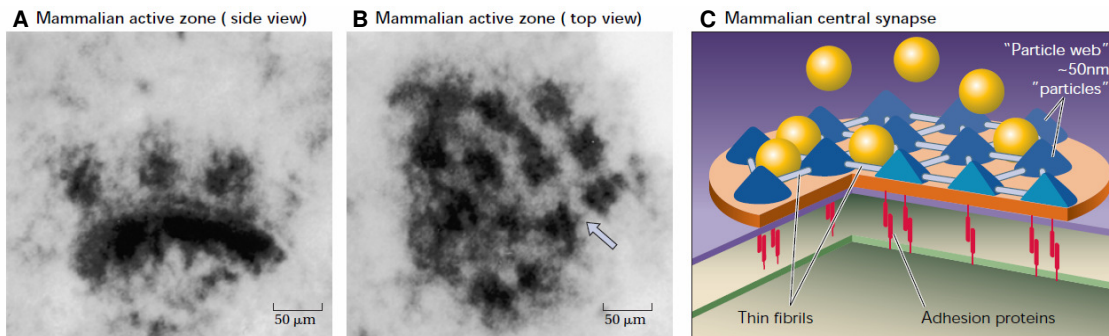


Figura 13. Model de l'estructura de la zona activa en sinapsis del sistema nerviós central dels mamífers. A-B micrografies obtingudes en un microscopi electrònic de transmissió, de zones actives purificades del SNC de mamífers (A) en vista lateral i (B) vista superior. La fletxa a (B) assenyalava fibril·les. C, Esquema de l'estructura de la zona activa del SNC de mamífers sistema (Zhai i Bellen, 2004).

Les zones actives de les NMJs de ratolí i granota estan formades per dues fileres gairebé paral·leles de molècules de membrana, situades directament oposades als plegaments d'unió de la membrana plasmàtica postsinàptica de la fibra muscular. Entre les dues fileres de macromolècules, que inclouen canals de calci, és on es produeix l'ancoratge i posterior fusió de les vesícules. Les estructures de "beams" (bigues) i "ribs" (costelles), connecten les vesícules amb els canals de calci. En les granotes les bigues van per la línia mitjana de la cresta presinàptica i les costelles s'estenen des de les bigues i connecten les vesícules sinàptiques a prop de la interfase de la membrana plasmàtica de les vesícules. Alhora, les costelles estan connectades amb les macromolècules de la intermembrana assemblant-se als canals de calci. Amb aquesta

organització cada vesícula ancorada està perfectament alineada amb almenys un canal de calci, que permetrà una alta fidelitat d'alliberament (**Fig. 14**; Zhai i Bellen, 2004; Nagwaney *et al.*, 2009).

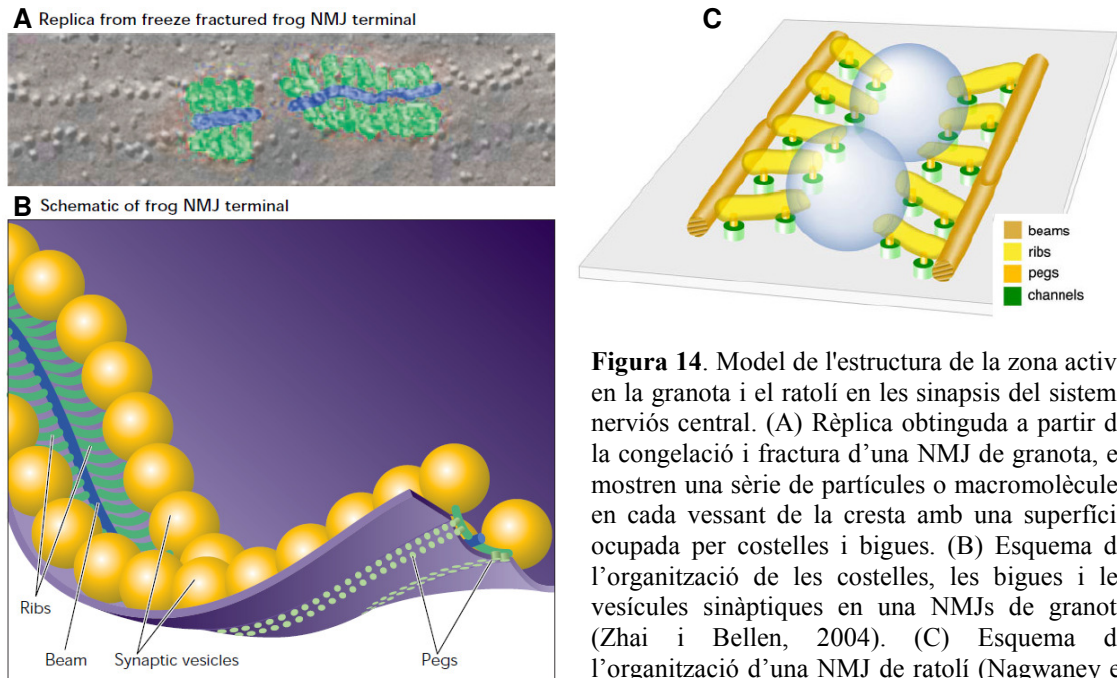


Figura 14. Model de l'estructura de la zona activa en la granota i el ratolí en les sinapsis del sistema nerviós central. (A) Rèplica obtinguda a partir de la congelació i fractura d'una NMJ de granota, es mostren una sèrie de partícules o macromolècules en cada vessant de la cresta amb una superfície ocupada per costelles i bigues. (B) Esquema de l'organització de les costelles, les bigues i les vesícules sinàptiques en una NMJs de granota (Zhai i Bellen, 2004). (C) Esquema de l'organització d'una NMJ de ratolí (Nagwaney *et al.*, 2009).

7.6 Vesícules sinàptiques

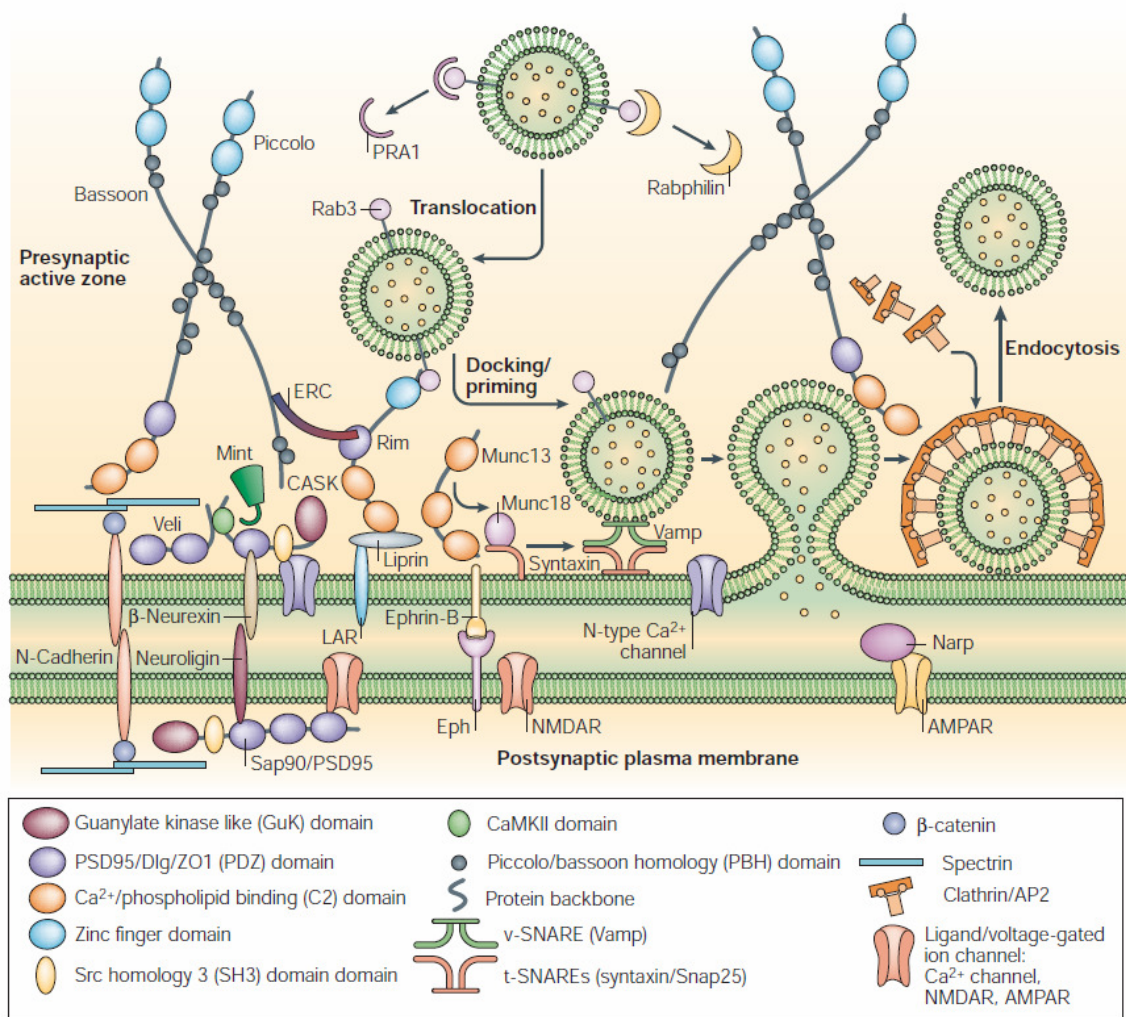
Les vesícules sinàptiques (40-80nm de diàmetre) es concentren en els terminals nerviosos presinàptics de totes les neurones. Emmagatzemen NTs que són alliberats per un procés d'exocitosi depenent del calci en resposta a l'arribada d'un potencial d'acció. Després de l'exocitosi, les vesícules es recuperen per un procés d'endocitosi depenent de la clatrina, i es reciclen localment, per regenerar vesícules exocítics-competents. Les vesícules contenen la maquinària necessària pel consum i emmagatzematge dels NTs incloent transportadors vesiculars, canals iònics, i la H^+ ATPasa vacuolar que alimenta els transportadors (Takamori *et al.*, 2006).

7.6.1 Composició de les vesícules

Les vesícules sinàptiques estan formades per molècules de fosfolípid, de colesterol i una alta varietat de proteïnes. Proteïnes que participen en l'exocitosi com les proteïnes de la família SNARE (amb més de 20 proteïnes diferents i que també participen en la fusió dels endosomes), la sinaptobrevina/VAMP2, syntaxina 1 i SNAP-25. Proteïnes estructurals com la sinaptofisina (SyPhys) i la sinaptotagmina (STg) descobertes al 1994 per Jahn i Südorf. Proteïnes de la família Rab (més de 33 tipus diferents) considerades els marcadors més específics dels orgànuls. Proteïnes implicades en l'endocitosi mediada per la clatrina, com el complex AP-2. Proteïnes perifèriques implicades en vies de senyalització, enzims metabòlics, xaperones i proteïnes del citoesquelet. Transportadors de glutamat (VGLUT1 i VGLUT2), i per últim proteïnes ribosomals. De tot aquest ventall de proteïnes les més abundants són la SyPhys, la STg, la VAMP2, la sinapsina I, transportadors de NTs i proteïnes Rab. Totes són essencials, ja sigui perquè participen en l'exocitosi com en el carregament dels NTs.

Figura 15. Representació esquemàtica de la zona activa presinàptica. Estudis actuals indiquen que les zones actives estan definides per tres complexos. (1) Complex estructural, encarregat de mantenir la membrana presinàptica i els canals de calci, en contacte amb la densitat postsinàptica. (2) Implicat en l'ancoratge i fusió de les vesícules sinàptiques, conté el complex SNARE, RIM, Rab3A, Munc13, Munc18 i els canals de calci tipus N i P/Q. I (3) la densitat postsinàptica, que conté proteïnes que formen complexos especialitzats al voltant de determinats receptors de glutamat (Ziv & Garner, 2004).

Molecular structure of CNS glutamatergic synapses



7.6.2 SMN i les vesícules sinàptiques, zones actives i organització dels microtúbuls a les NMJs

La implicació d'SMN en la correcta formació i funció de les zones actives ha estat recentment descrita en ratolins delta7 per Torres-Benito *et al.* (2011). En l'inici de la maduració de les NMJs (primera setmana de vida), en els WT, les vesícules sinàptiques estan agrupades en petits grups; durant la segona setmana de vida, en la qual les NMJs estan madurant, les vesícules sinàptiques es separen per tal de cobrir més superfície del terminal. En canvi, els animals SMAΔ7 mantenen les vesícules agrupades. S'evidencia que hi ha dificultats en la maduració de les NMJs en els ratolins AME: (i) les ZAs, tot i que la seva distribució en l'espai és correcta, hi ha zones on pràcticament no hi són presents en els animals malalts, aquesta disminució podria ser

deguda a la deficiència presinàptica dels canals de calci dependents del voltatge tipus N al nervi terminal; (ii) l'NF s'acumula als terminals presinàptics i a diferència dels animals control, aquest no disminueix amb l'edat; alhora, l'acumulació va seguida d'una davallada de vesícules sinàptiques; (iii) hi ha una reducció del 50% dels mitocondris funcionals malgrat la distribució en l'espai sigui la correcta; (iv) s'observen alteracions en l'arquitectura i quantitat relativa dels microtúbuls de les zones terminals però no al llarg de l'axó; i (v) hi ha defectes en la neurotransmissió amb la incapacitat de les sinapsis dels ratolins amb AME d'ajustar l'alliberació dels NTs a una velocitat constant. Smn, per tant, està implicada en la maduració postnatal de les NMJs.

7.6.3 Trànsit de vesícules a la membrana

La fusió de les membranes en el procés d'exocitosi succeeix en dues etapes: (1) L'ancoratge de les vesícules a la membrana procés mediat per les proteïnes Rab i els seus efectors. Seguidament hi ha un alineació amb les proteïnes SNARE que faran d'intermediaris en la fusió; les proteïnes SNARE estan ancorades a la membrana de la vesícula i a la membrana del terminal presinàptic, aquest procés està arbitrat per la proteïna Munc18 que es dissocia de la syntaxina un cop la vesícula està ancorada. I (2) abans d'esdevenir vesícules competents per la fusió, han de passar pel procés d'encebat de les vesícules que el regulen Munc13 i RIM (proteïna que interacciona amb Rab). La fusió de les vesícules es produeix davant l'entrada del calci (Gundelfinger *et al.*, 2003) (**Fig. 16**).

7.6.4 Molècules determinants en les ZAs presinàptiques

7.6.4.1 Transportador vesicular d'acetilcolina (VACHT)

La neurotransmissió colinèrgica regula diverses sortides tant del sistema nerviós central com del perifèric. L'ACh es sintetitza al citoplasma a través de l'ACh transferasa (AChT), funciona com a senyal i indueix la ramificació axonal, la mida del terminal nerviós i el nombre i maduració de les sinapsis; la seva absència és incompatible amb la vida. Durant el desenvolupament embrionari genera activitat muscular provocant la secreció de factors neurotròfics i regula la PCD. La síntesi embrionària de l'ACh és fonamental en el desenvolupament correcte de la unió neuro-muscular dels mamífers. El VACHT té diferents funcions: (1) intervé en

l'emmagatzematge de l'ACh i intercanvia ACh citoplasmàtica per dos protons vesiculars (funció important per a la funció motora); (2) manté l'alliberació d'ACh dependent de l'activitat; i (3) regula el desenvolupament de les sinapsis colinèrgiques. La seva disminució té seriosos efectes en els axons, el nombre de terminals i canvis en la morfologia de les sinapsis i del múscul (de Castro et al., 2009).

7.6.4.2 Molècules que participen en l'ancoratge i la fusió vesicular

7.6.4.2.a Sinaptobrevina/VAMP

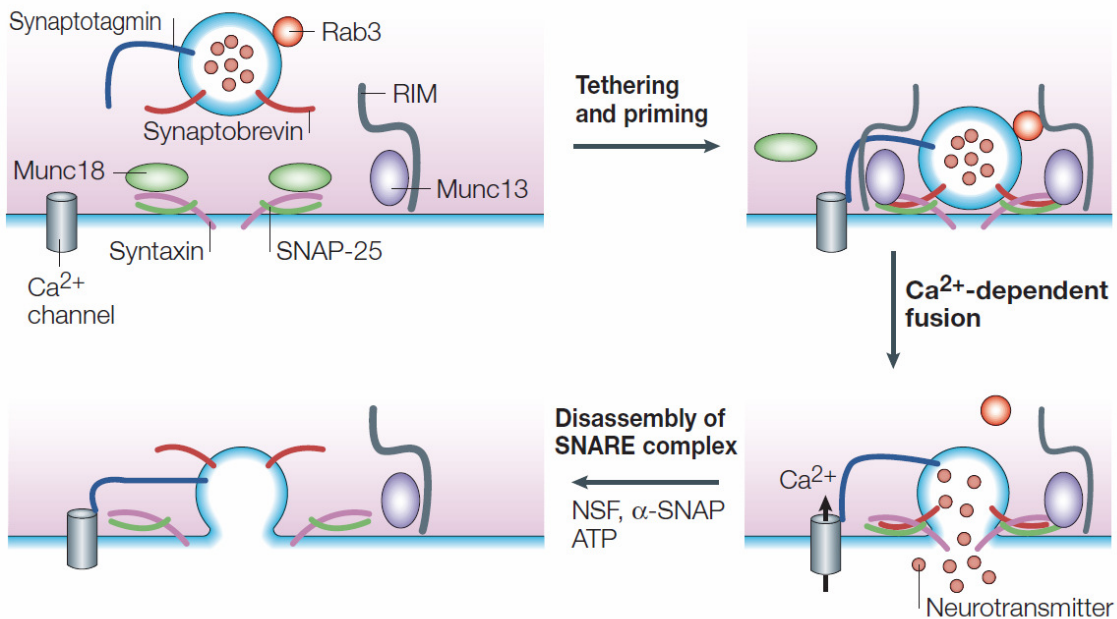
VAMP és la proteïna majoritària del complex proteic SNARE i és necessària per a l'exocitosi de les vesícules desencadenada pel calci i per l'endocitosi local de les vesícules, endocitosi ràpida o *kiss and run* que mai deixen les ZAs. VAMP té l'extrem C-terminal que l'enganxa a la vesícula i la resta de la proteïna es troba a la superfície citoplasmàtica de les vesícules. VAMP-1 té diferents isoformes que determinen la seva ubicació en la cèl·lula o en el teixit final (p.e: VAMP-1A és una proteïna de membrana plasmàtica i dels endosomes mentre que VAMP-1B és mitocondrial); aquestes isoformes vénen determinades per l'*splicing* alternatiu de l'exó 5 situat a l'extrem C-terminal. VAMP-1 forma un complex amb dues proteïnes SNARE, la syntaxina i SNAP-25, amb les quals desencadenarà la fusió, mentre que VAMP-2 és la responsable de l'endocitosi ràpida (Berglund *et al.*, 1999; Deák *et al.*, 2004).

Figura 16. El procés de fusió de les membranes durant l'exocitosi es produeix en dues etapes, l'ancoratge d'una vesícula exocítica a la membrana acceptora i la fusió de les bicapes lipídiques. L'ancoratge està dirigit pels membres de la família Rab, que actuen conjuntament amb les proteïnes efectores de Rab. Seguidament, s'alineen amb les proteïnes SNARE (soluble N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors), que estan ancorades en les dues membranes i que estan implicades en la seva fusió. L'assemblatge del complex trans SNARE està regut per les proteïnes Munc18, i el desmuntatge està regulat per la NSF (N-etil-maleimida sensible a la proteïna de fusió) i α -SNAP (proteïna soluble d'unió NSF).

En la regulació de l'exocitosi hi intervenen les proteïnes SNARE, synaptobrevina/VAMP, SNAP-25 i la syntaxina, i proteïnes de la família Rab3. Abans de la fusió de les vesícules i just després del seu ancoratge a la membrana presinàptica, es produeix el procés d'encebament, procés complex i altament regulat imprescindible per a l'adquisició de les competències necessàries per la fusió; en aquest procés hi ha implicades les proteïnes Munc13 i RIM. La fusió de les vesícules es produeix davant l'entrada de Ca^{2+} a través dels canals dependents del Ca^{2+} , la sinaptotagmina actua de sensora del Ca^{2+} .

La figura mostra el mecanisme molecular que implica la regulació de l'exocitosi (els components no estan dibuixats a escala i no tots els components es mostren en cada pantalla) Guldenfinger *et al.*, 2003.

The molecular mechanisms of exocytosis



7.6.4.3 Molècules reguladores de l'exocitosi

7.6.4.3.a Munc13

Proteïna restringida en els terminals nerviosos de les ZAs. Estudis mutagènics de Munc13 a *C. elegans* provoquen descoordinació en els moviments dels cucs. La proteïna Munc13 en mamífers està formada per diversos dominis: (1) dos dominis C2¹⁶ implicats en la unió del Ca²⁺ i de fosfolípids (2) unió al diacilglicerol i als ésters de forbol, aquest últim possiblement implicat en la regulació de l'alliberació dels NTs. Munc13 regula l'alliberació dels NTs a través de la interacció amb la proteïna associada a les vesícules (Doc2 α), a RIM, a una proteïna d'unió al Ca²⁺/fosfolípid i a la syntaxina, un component de les proteïnes SNARE. Dos possibles mecanismes d'acció serien: (1) que Munc13 desplaçaria Munc18 de la syntaxina, permeten així, la unió de la syntaxina al nucli del complex d'exocitosi de la sinapsi i (2) Munc13 s'uniria a RIM. Ambdós mecanismes suggereixen que Munc13 ajuda a les vesícules ancorades a adquirir les competències necessàries per ser fusionades (Garner *et al.*, 2000; Pernía-Andrade i Jonas, 2011). (**Fig. 16**)

¹⁶ Domini 2 de la proteïna quinasa C que està altament conservat

7.6.4.3.b Munc18

Munc18 és una proteïna imprescindible en l'exocitosi¹⁷ de les vesícules sinàptiques. Munc18 té almenys dues funcions: 1) translocació i ancoratge de les vesícules a través de la seva unió a la syntaxina, funció que comparteix amb la unió SyPhys-sinaptobrevina. 2) Munc18 determina la força i la durada de la fusió, i podria estar implicada en la finalització de la fusió prematura de les membranes (Barclay, 2008). Munc18 té la capacitat d'unir la syntaxina per dos motius diferents, (i) s'uneix a la syntaxina de forma "tancada" on la syntaxina està estructuralment limitada, Munc18 evitant que la syntaxina formi complexos "ectòpics" amb les proteïnes SNARE i pugui ser traslladada fins a la seva alliberació a la membrana plasmàtica; i (ii) interacció a través d'un motiu evolutivament conservat situat a l'extrem N-terminal de la syntaxina: a la membrana plasmàtica la syntaxina canvia la seva conformació (per un factor encara per determinar) i passa de la conformació "tancada" a la conformació "oberta", llavors Munc18 s'uneix a ella per l'extrem N-terminal permetent així que la syntaxina pugui unir-se a SNAP-25 i formar el complex SNARE; aquest complex podria formar una bastida per l'ancoratge de les vesícules (Rickman *et al.*, 2007). Posteriorment a l'ancoratge de les vesícules sinàptiques a les ZAs, Munc18 i la syntaxina es dissocien (Südhof, 1995).

7.6.4.3.c Sinaptotagmina

La sinaptotagmina (SyTg) és una proteïna transmembrana associada a les vesícules sinàptiques i secretores. Tot i que se'n coneixen diverses isoformes la més estudiada és la SyTg-1. La majoria de SyTg s'uneixen, amb baixa afinitat, al calci a través de dos dominis C2. És una proteïna sensora del calci que quan s'uneix a la syntaxina i a SNAP-25 promou canvis en la conformació de les vesícules incrementant així la velocitat de l'alliberació dels NTs i participant, per tant, en la fusió de les membranes. Les SyTgs tenen també un paper important en l'endocitosi depenent del calci mitjançada per les clatrinae, a través de la seva unió a AP2 (proteïna adaptadora de

¹⁷ El procés d'exocitosi pot produir-se de dues maneres: kiss and run en què hi ha una alliberació parcial del contingut vesicular, o bé una fusió completa on l'alliberació del contingut vesicular és total.

la clatrina) (Südhof, 1995; Garner *et al.*, 2000; Shapira *et al.*, 2003; Deák *et al.*, 2004; McCue *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2012).

7.6.4.4 Molècules d'estructura/bastida de les ZAs

7.6.4.4a Piccolo i Bassoon

El Piccolo i el Bassoon són proteïnes *multidomain zinc finger* situades, exclusivament, a les zones actives tant de sinapsis excitadores com inhibidores, on en són els membres majoritaris. Formen part dels components estructurals/citoesquelet de les zones actives. Com ja s'ha explicat prèviament són transportats per les PTVs en estadis embrionaris (Garner *et al.*, 2000; Zhai *et al.*, 2001; Hallermann *et al.*, 2010). El Piccolo i el Bassoon tenen 10 regions d'homologia (PBH) que contenen dos *zinc fingers* (ZF) amb certa homologia amb els ZF de la rabphilina i del RIM, aquests però no interaccionen directament amb el Rab3A sinó que utilitzen una molècula (PRA1) que a part d'interaccionar amb el Rab3 i Rab5 (proteïnes relacionades amb la endo- i exocitosi) interacciona amb VAMP i SNARE. Aquestes interaccions poden tenir un paper en la maduració de les vesícules sinàptiques. A part de PHB, tenen un domini PDZ, 2 dominis C2 i zones riques en prolina. Fins fa poc es pensava que la seva funció era bàsicament estructural però donada la seva capacitat d'unió a diverses molècules implicades en l'endo- exocitosi fa pensar que aquestes proteïnes estiguin implicades en la localització d'aquests components a les ZAs (Garner *et al.*, 2000). Les seves funcions no estan del tot clares recentment, però, han aparegut diversos estudis dirigits a aclarir la funció d'aquestes dues proteïnes: Mukherjee *et al.* (2010) en un doble KO per Piccolo i Bassoon van determinar que tenen un paper redundant en l'agregació de vesícules sinàptiques en les terminacions nervioses sense participar directament en l'alliberament dels NTs. Hallerman *et al.* (2010) estudiant la transmissió de senyals entre les fibres molsoses del cervell i les cèl·lules granulars indiquen que Bassoon està implicat en la recàrrega ràpida de les vesícules a les sinapsis excitadores. I Frank *et al.* (2010) en sinapsis *hair cell ribbon* van determinar que el Bassoon i *ribbon* organitzaven els canals de calci i les vesícules creant un elevat nombre de regions d'alliberament i promouien la reposició vesicular.

7.6.4.4b RIM (Rab3A *interacting protein*)

RIM és una proteïna que es troba en altes quantitats a la fracció plasmàtica però no a la vesicular. És una proteïna multidomini amb un extrem N-terminal que s'uneix a Rab3A (Garner *et al.*, 2000); un Zn²⁺ *finger*; un domini de fosforilació per la PKA; un domini PDZ d'unió als canals de Ca²⁺ (Kaeser, 2011); 3 dominis C2 d'unió entre d'altres a la SyTg (dos dels quals a l'extrem C-terminal); i un domini ric en prolines (Südhof, 2001; Pernía-Andrade i Jonas, 2011). RIM és un efector de Rab3A i té un paper important en la plasticitat presinàptica (Pernía-Andrade i Jonas, 2011). Alhora, interacciona directa i específicament amb els canals de calci tipus N i P/Q determinant-ne la densitat dels canals de Ca²⁺ i l'ancoratge de les vesícules a les ZAs presinàptiques. RIM per tant fa dues funcions molt importants: 1) lliga els canals de Ca²⁺ a les ZAs i 2) activa el *priming* de les vesícules sinàptiques monodimeritzant Munc13 que generalment es troba en la seva forma inactiva formant un homodímer (Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011; Kaeser, 2011).

El mecanisme d'acció de RIM és bastant desconegut i hi ha diverses teories. La més recent és que RIM s'uneix a les RIM-*binding proteins* (BP) i al canal de Ca²⁺ formant un complex tripartit que és crític per la rapidesa i extensió de l'alliberació dels NTs (Kaeser, 2011). A més a més, Munc13 que s'encarrega del procés de *priming* interacciona amb el Zn²⁺ *finger* de RIM evitant la seva homodimerització i essent per tant actiu (Deng *et al.*, 2011; Pernía-Andrade i Jonas, 2011); alhora, la unió de Rab3A (es postula que no és necessària) a RIM: 1) inactiva Munc13 desplaçant-lo de RIM acció que provoca l'alliberament dels NTs, probablement perquè d'aquesta manera Munc13 reclutarà més molècules de RIM que faran créixer la ZA, i 2) acostava els canals de calci a la proteïna sensora del calci vesicular SyTg (**Fig. 17**; Südhof, 2004; Kaeser, 2011).

negatiu, modula l'exocitosi limitant la fusió de les membranes desencadenada pel calci actuant juntament amb la rabphilina3A, ambdues es dissocien de les vesícules durant/després de l'ancoratge/exocitosi a les ZAs (Südhof, 1995; Gonzalez i Scheller, 1999; Garner *et al.*, 2000; Leenders *et al.*, 2001; Coleman *et al.*, 2007 afegit a posteriori).

7.6.4.5.b Rabphilina

És una proteïna hidrofílica vesicular que s'uneix al Rab3A-GTP. Està formada per un domini N-terminal d'interacció al Rab3A, un domini central de fosforilació i dos dominis C2 a l'extrem C-terminal a través del qual s'uneix al Ca^{2+} (Gonzalez i Scheller, 1999; Schlüter *et al.*, 1999; Leenders *et al.*, 2001; Südhof, 2004). Malgrat determinades evidències la relacionen amb l'exocitosi: (1) Rab3A té una funció en el procés d'exocitosi (en ratolins KO per Rab3A la Rabphilina està deslocalitzada i es degrada amb facilitat); per tant, Rab3A possiblement utilitza la Rabphilina com a molècula efectora en la regulació de l'exocitosi; (2) la Rabphilina colocalitza amb Rab3A i C a les vesícules sinàptiques, ambdós es dissocien durant o després de l'exocitosi; (3) estudis *in vitro* demostren que la rabphilina s'uneix a altres proteïnes, també relacionades amb l'endo- o exocitosi i amb el citoesquelet (rabaptin, α -actinina). La seva funció no està del tot clara, i podria ser que els diferents dominis tinguin funcions diferents i independents de Rab3A, o bé que Rabphilina no tingui una funció fonamental en l'execució/regulació de l'alliberament dels NTs en condicions normals, però podria tenir un paper més especialitzat sota condicions fisiològiques extremes (no indentificades); aquesta hipòtesi estaria recolzada pel fet que la Rabphilina, a diferència d'altres proteïnes vesiculars està altament conservada a *C. elegans* (Schlüter *et al.*, 1999).

7.6.4.5.c Cystein string proteins (CSP)

La CSP és una proteïna evolutivament conservada i abundant en les vesícules sinàptiques. Donada la divergència de possibles funcions s'han formulat tres hipòtesis (Fernández-Chacón *et al.*, 2004): 1) CSP està implicada en la funció dels canals de calci, mitjançant l'assemblatge o regulant els canals de calci a les ZAs; 2) CSP regula directament l'exocitosi interaccionant amb la syntaxina i la SyTg; 3) CSP actua

cooperant amb la *Heat-shock protein 70* (Hsp70) com a xaperona. Aquesta unió amb Hsp70 promou l'*uncoating* de les vesícules de Clatrina (Südhof, 1995) i actua renaturalitzant les proteïnes dels terminals nerviosos que perden el plegament correcte degut al procés continu d'exo- endocitosi. Fernández-Chacón *et al.* (2004), van testar aquestes hipòtesis en un estudi complet amb ratolins KO per la CSP. Van concloure que la CSP no és necessària ni per la funció dels canals de calci (hipòtesi 1), ni per l'exocitosi depenent del calci (hipòtesi 2), per contra, la CSP és imprescindible per la llarga supervivència de les sinapsis i funciona prevenint la degeneració dels terminals nerviosos, actuant per tant com a xaperona (hipòtesi 3).

7.6.4.5.d Synaptophysin (SyPhys)

La SyPhys és de les proteïnes més abundants i conservades de les vesícules sinàptiques i juntament amb la Sinaptogirina (SyGy) sumen un 10% de les proteïnes sinàptiques. Ambdues tenen un origen comú i estan formades per 4 regions transmembrana i una cua citoplasmàtica *tyrosine-phosphorylated*. La funció exacta es desconeix però Janz *et al.* (1999) en estudis amb ratolins KO per ambdues proteïnes van determinar que SyPhys i SyGy tenien funcions essencials i redundants en la plasticitat sinàptica sense ser necessàries per la transmissió sinàptica *per se*.

7.6.4.5.e SV2

És un component de les vesícules sinàptiques i dels grànuls secretors neuroendocrins. Existeixen 3 gens que codifiquen per SV2 i donen lloc a 3 proteïnes homòlogues (SV2A, B i C) que tenen expressió diferencial al cervell. És una proteïna amb 12 regions transmembranals amb els dos extrems N- i C-terminals citoplasmàtics. El fet que tinguin una alta homologia amb proteïnes de la superfamília dels *major facilitator of transporters* (MSF) i que en la primera regió transmembrana hi hagi dos residus amb càrrega negativa altament conservats; juntament amb evidències experimentals amb sinapsis en absència d'SV2, indica que la funció d'SV2 pot estar relacionada amb el transport de cations en les vesícules sinàptiques, entre ells del calci, i s'ha suggerit que SV2 és un transportador que regula els nivells de calci transportant el calci dins les vesícules sinàptiques. S'ha postulat que SV2 podria interaccionar amb els

sensor del calci SyTg, participant per tant en la regulació de l'exocitosi (Südhof, 2004; Janz, 2009).

7.6.4.5.f Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)

El CGRP és un neuropèptid de 39 aa que es localitza en les neurones del sistema nerviós central, als cossos neuronals d'un elevat nombre de MNs cranials i espinals i als ganglis de l'arrel dorsal (Calderó *et al.*, 1992; Schütz *et al.*, 2004). El CGRP es genera per l'*splicing* alternatiu, específic de teixit, del gen de la calcitonina i n' existeixen dues isoformes, l' α -CGRP (la més abundant) i el β -CGRP, que es troba molt present al sistema nerviós entèric (Doi *et al.*, 2000). Ambdues isoformes comparteixen un alt grau d'homologia i es coexpressen en diverses estructures tant del sistema nerviós central com del perifèric. És un potent vasodilatador i té efectes diversos a teixits nerviosos i no nerviosos com per exemple al múscul on pot actuar com a factor neurotròfic anterògrad a les NMJs. El CGRP es transporta des del cos neuronal cap a les terminacions nervioses on queda emmagatzemat dins les vesícules grans de nucli dens (LDCV). Pot induir l'expressió dels AChRs, allarga el seu temps d'obertura i modula les propietats dels canals dels AChRs embrionaris (Csillik *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993; Sala *et al.*, 1995; Schütz *et al.*, 2004; Toth *et al.* 2009). El CGRP, tot i ser necessari per al manteniment de les NMJs de determinats músculs, pateix una regulació a la baixa postnatal coincident amb la maduració de les NMJs, fet que suggereix una funció del CGRP en la formació de les NMJs que es confirma davant l'increment d'expressió del CGRP en processos de reinnervació i el posterior remodelatge de les plaques motores de rates que han estat paralizades amb la toxina botulínica o bé sotmeses a la secció nerviosa (Calderó *et al.*, 1992; Csillik *et al.*, 1993; Tarabal *et al.* 1996a). Les lesions als nervis i la paràlisi alteren la producció dels factors neurotròfics al múscul i en les cèl·lules no nervioses ubicades al voltant del nervi, com passa en les cèl·lules de Schwann on el CGRP promou els contactes axó-cèl·lula de Schwann (Toth *et al.*, 2009); aquests factors són transportats als cossos de les MNs on promouran la seva supervivència. Les possibles i diverses funcions del CGRP: 1) l'expressió del CGRP està elevada durant la sinaptogènesi i la reinnervació, en miòcits adults el que possiblement succeeix és que hi ha un canvi en les propietats dels canals d'ACh; 2) els impulsos nerviosos poden alliberar CGRP dels seus terminals; 3) la inactivitat muscular augmenta l'expressió del CGRP en les MNs, possiblement induït pels factors tròfics; 4)

el CGRP podria inhibir l'*sprouting* dels terminals nerviosos; 5) el CGRP pot millorar l'eficiència de la transmissió postsinàptica a través de la fosforilació dels canals d'ACh als miòcits, procés que és mitjançat per la PKA (Lu *et al.*, 1993); 6) els canvis en els nivells del CGRP en les MNs estan correlacionats amb el creixement axonal i la plasticitat sinàptica; i 7) Al sistema nerviós entèric, el CGRP actua a nivell d'alliberació d'hormones gastrointestinals, coordinació de la mobilitat gastrointestinal, excitació de les neurones mientèriques i vasodilatació (Lu *et al.*, 1993; Sala *et al.*, 1995; Tarabal *et al.*, 1996a; Doi *et al.*, 2000).

7.6.4.5.g Canals de calci

Els nivells de Ca^{2+} incrementen espontàniament en els processos de diferenciació del desenvolupament primerenc fins i tot abans de la sinaptogènesi. El Ca^{2+} , és també responsable de la regulació del creixement de les neurites. Part d'aquesta regulació es deu als nivells de Ca^{2+} que si sobresurten d'una finestra molt estreta hi ha una aturada o una disminució del creixement axonal; l'altra part es basa en factors de transcripció que regulen l'expressió de gens que codifiquen per les molècules d'adhesió cel·lular o pels seus receptors (Gomez i Spitzer, 2000; Spitzer *et al.*, 2000; Spitzer 2002).

Recentment s'ha relacionat els canals de calci depenent de voltatge (VDCCs) tipus N i P/Q amb l'estructura i organització de les ZAs. Per una banda el múscul expressa, secreta i concentra la laminina $\beta 2$ a l'espai sinàptic. Els canals de calci i la laminina $\beta 2$ s'uneixen específicament i alhora, la subunitat β dels VDCCs s'uneix al Bassoon i RIM entre d'altres; els VDCCs, per tant, farien de pont d'unió entre la ZA citosòlica i la zona extracel·lular (Chen *et al.*, 2011).

Els canals de Ca^{2+} són essencials per a un correcte procés d'exocitosi: un potencial d'acció envaeix el terminal presinàptic provocant una entrada de calci a través dels canals de calci causant un increment en la concentració del calci intracel·lular. Llavors el calci s'uneix a un sensor del calci presinàptic que iniciarà l'exocitosi dels NTs a través de la fusió de les vesícules a la membrana presinàptica, els NTs es difondran per l'espai sinàptica i s'uniran als receptors postsinàptics. Els canals de Ca^{2+} els podem dividir en microdominis de Ca^{2+} , on la zona amb alta concentració de Ca^{2+} s'estén més de 100nm, o bé nanodominis de Ca^{2+} , on la zona amb alta concentració de calci és inferior als 100nm. La diferència entre l'ús d'un o altre canal al SNC pot ser específica de la via de senyalització, o bé que la regulació de la unió entre els canals de

Ca^{2+} i els sensors de Ca^{2+} sigui dinàmica i que pugui contribuir a la plasticitat presinàptica. La quantitat de canals de Ca^{2+} necessaris per cada alliberació de NTs és petita, i és encara més petita si es tracta de nanodominis de Ca^{2+} . Els avantatges funcionals dels nanodominis són l'eficàcia, la velocitat i l'eficiència energètica en l'alliberació dels NTs. Durant el desenvolupament el nombre de canals oberts per l'alliberació dels NTs està reduïda, però la unió d'aquests canals amb els sensors de Ca^{2+} és més forta. Quant més curta sigui la distància entre el sensor i el canal de calci més ràpida serà la resposta, per aquest motiu, a les ZAs hi ha diverses proteïnes que participen en l'acostament dels canals amb els sensors, per exemple RIM (**Fig. 17**; Eggermann *et al.* 2012).

7.7 Afectació de les NMJs en l'AME

Durant els últims anys han sortit diversos articles referents als defectes de les unions neuromusculars la majoria d'ells coincidents amb les troballes, com són l'acumulació d'NF als terminals presinàptics, en pacients s'observa un engruiximent de les terminacions nervioses, una simplicitat en les seves ramificacions i queden molt tenyides amb NF (Murray *et al.* 2008 i 2009; McGovern *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2011; Dachs *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Pràcticament absència de denervació, que en cas d'haver-n'hi és deguda a la manca del manteniment de les NMJs, però amb una ocupació del terminal postsinàptic menor en l'AME ja des d'estadis embrionaris (McGovern *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2010 i 2011; Dachs *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011); no obstant, Ling *et al.* (2011), van trobar denervació molt acusada del múscul *Serratus posterior inferior* a l'època embrionaria; Murray *et al.* (2008), van observar que no hi ha correlació entre l'encongiment de les plaques al TVA i l'àrea ocupada, indicant, per tant, que la patologia pre- i postsinàptica no són una conseqüència de l'altra. Retard en la maduració dels terminals sinàptics, amb les NMJs més petites i més simples, retard en el canvi de la subunitat γ per l' ϵ , la majoria de músculs tenen les alteracions majoritàries al terminal postsinàptic, en canvi el Diaph només té un dèficit en la maduració presinàptica (Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Dachs *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Alteracions a les ZAs, respecte al número de vesícules hi ha diversitat d'opinió: no varia (Kariya *et al.*, 2008), o varia amb una disminució significativa (Kong

et al., 2009; Lee *et al.*, 2011). Defectes en la neurotransmissió (Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). El creixement axonal, el nombre d'axons i la seva mielinització no està impedit (McGovern *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011), malgrat Jablonka *et al.* (2007) trobin un defecte en la mida dels axons que creixen en cultiu.

Murray *et al.* (2009), han estudiat l'alteració de l'expressió gènica només en etapes avançades de la malaltia. Els gens més afectats, exceptuant el gen *SMN*, estan relacionats amb les vies de senyalització, la integritat de la matriu extracel·lular i amb factors de creixement; *SMN* per tant està implicat en el manteniment però no en la regulació del creixement de les MNs i de l'axogènesi. Alteracions en l'agregació dels canals de calci en MNs deficientes en *Smn*, que poden comportar una disfunció de les ZAs, una alliberació alterada dels NTs i per tant la degeneració de la NMJ que causarà una disrupció del transport cel·lular a les MNs (Jablonka *et al.*, 2007; Dachs *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2011). L'afectació de les MNs més grans s'ha vist que és deguda a la pèrdua dels axons de més calibre (Kariya *et al.*, 2008). Reducció selectiva de les MNs glutamatèrgiques de la ME sobretot de les connexions sensori-motors; reducció de les neurones sensorials propioceptives i increment de la micròglia en animals delta7; (Ling *et al.*, 2010). En l'AME, s'observa una disminució de les SCTs, un cobriment parcial de diverses NMJs i una possible implicació de les cèl·lules de la glia¹⁸ amb un increment de les interaccions neurona-micròglia (Lee *et al.*, 2011).

Com ja s'ha explicat anteriorment, els músculs els podem classificar com a *fast-twitched* (músculs de ràpida contracció i per tant tenen més força) i *slow-twitched* (músculs de contracció lenta) o bé el podem classificar com a FaSyn i DeSyn en funció de la rapidesa de formació de les NMJs. Les observacions de Pun *et al.* (2002) en que els músculs DeSyn són més susceptibles en estadis primerencs del desenvolupament concorden amb els estudis realitzats en ratolins que manifesten l'AME on es demostra que en el múscul LAL, múscul característic per ser *fast-twitched* pur i innervat pel nervi facial, està menys afectat que el TVA, múscul *slow-twitch*; de fet el mateix LAL es pot dividir en dues parts que reben les entrades nervioses de diferents *pools* de MNs, la rostral i més resistent i la caudal, formada per fibres més FaSyn-like, més susceptible (Murray *et al.*, 2008 i 2009). Per altra banda, Ling *et al.* (2011) en un estudi molt extens de més de 20 músculs, tant axials com apendiculars, repartits al llarg del cos

¹⁸ Els astròcits produeixen molècules que potencien la sinaptogènesi.

detecten que els músculs *fast-twitched* tenen una lleugera tendència a ser més vulnerables que els *slow-twitch*, això però, no implica que tots els *fast-twitched* siguin vulnerables. Respecte els DeSyn o FaSyn no troben cap vulnerabilitat exclusiva, però sí una lleugera resistència dels DeSyn. Conclouen que no hi ha susceptibilitat muscular ni segons la localització del múscul ni segons el tipus de fibra, però sí que hi ha més afectació dels músculs proximals innervats per MNs cervicals o toràciques, que dels distals; suggereixen una implicació de les sinapsis centrals en l'afectació proximal.

8 Tractament de l'AME

Actualment, no hi ha cap teràpia específicament dirigida a modificar la progressió de l'AME. Molts dels tractaments proposats fins ara han estat orientats a promoure l'expressió del gen *SMN* actuant sobre el promotor d'*SMN2* a través d'inhibidors de les histones deacetilases (HDAC). Aquests inhibidors són capaços d'activar el promotor d'*SMN2* per modificació directa de l'estat d'acetilació de les histones (Andreassi *et al.*, 2003; Àvila *et al.*, 2007; Brahe *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2008). Avui dia també s'estan desenvolupant nous fàrmacs dirigits a altres mecanismes específics de la malaltia als nivells cel·lular i molecular (Baron-Delage *et al.*, 2000, Bosch-Marcé *et al.*, 2011; Butchbach *et al.*, 2009; Farooq *et al.*, 2011; Hofmann *et al.*, 2000; Nizzardo *et al.*, 2011; Rose FF 2008), basats en les noves tecnologies d'enginyeria genètica utilitzant petites molècules com l'RNA i els oligonucleòtids anti-sentit (Lorson *et al.*, 2010; Coady *et al.*, 2010), els lentivirus (Azzouz *et al.*, 2004), els virus adeno-associats (AAV) (Foust *et al.*, 2009 i 2010, Passini *et al.*, 2010) o el transplantament amb cèl·lules mare (Corti *et al.*, 2008 i 2009). Per tant, és crucial entendre els processos fisiopatològics implicats els principals símptomes de la malaltia, molts d'ells encara desconeguts (Sendtner *et al.*, 2010). La possible implicació primària del múscul en la malaltia de l'AME ha fet que es trobin, actualment, en el centre d'atenció: (a) medicaments que promouen la regeneració, activant les cèl·lules satèl·lit (p.e, IGF-1) i/o (b) els medicaments que milloren la maduresa de la musculatura (p.e, TSA), (c) els medicaments que augmenten la mida de la fibra muscular (p.e, follistatina) i (d) els compostos que regulen el desenvolupament i la funció de les NMJs durant la maduració (NTFS: BDNF, NGF, NT3, etc.) i l'estabilització dels músculs (Mi *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2008; Wyatt *et al.*, 2010). Un

bon fàrmac per a les malalties de les neurones ha de ser capaç de travessar la barrera hematoencefàlica (BHE), ja que si no fos així, el SNC (en el nostre cas la ME) no rebria el tractament.

Durant els darrers últims 10 anys, diferents grups han desenvolupat mètodes, *high-throughput* per a la recerca de fàrmacs amb possibles efectes positius sobre l'AME. El fet de tractar-se d'una malaltia monogènica fa que sigui més “fàcil” trobar possibles molècules que puguin ser efectives en el seu tractament. Andreassi *et al.* (2001), van identificar l'Aclarubicin com a compost que corregia l'error d'*splicing* de l'exó 7 en cèl·lules, transformades amb el virus de simis 40 (SV40), provinents d'un pacient amb AME tipus I. Jarecki *et al.* (2005) van dissenyar un estudi que partint de 558000 compostos contra el promotor de SMN2 van acabar l'assaig amb 5 compostos que alteraven els nivells de transcripció dels mRNAs del gen *SMN* en cèl·lules derivades de pacients AME. I al 2011, Makhortova *et al.*, van dissenyar un test en dues etapes: (1) en primer lloc buscar compostos que incrementaven SMN al nucli, al citoplasma i a les gemines, i després van testar diferents compostos enfrontant-los amb llibreries de molècules, amb la intenció de trobar dianes que podrien estar implicades en la determinació dels nivells d'*SMN*, ja sigui per incrementar la transcripció d'*SMN2*, corregint l'*splicing* o estabilitzant la proteïna, per posteriorment intentar connectar les diferents dianes cel·lulars amb vies de senyalització; això va permetre identificar alguns compostos que podrien ser adients per a ésser utilitzats com a possibles fàrmacs. Makhortova *et al.*(2011) van identificar (i) moduladors de canals iònics, tals com inhibidors de Na^+, K^+ -ATPasa; aquests inhibidors produeixen un guany net de Na^+ intracel·lular que pot provocar un augment dels nivells de Ca^{2+} a través de l'intercanvi de $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, van mostrar que increments en el Ca^{2+} promouen increments d'*SMN*. (ii) També van identificar factors de creixement que actuaven través de l'activació directa de receptors de les tirosina quinases i van trobar que un d'ells, el factor de creixement derivat de les plaquetes (PDGF), duplicava els nivells d'*SMN*, en gran part degut a la inhibició de la glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β , de la qual en parlem extensament a l' apartat 8.3.3.2). A mesura que es vagin entenent els processos i la identificació de les proteïnes reguladores implicades en la degradació d'*SMN*, es podran crear antagonistes específics d'aquestes molècules (Burnett *et al.*, 2009).

8.1 Estratègies terapèutiques en l'AME

Per a estudiar la malaltia i provar les possibles drogues s'utilitzen diferents procediments (Butchbach *et al.*, 2009). L'ús de models animals ajuda a entendre i estudiar la malaltia, però la translació a la teràpia requereix noves eines i la seva validació, bàsicament per la diferent farmacocinètica, la biodisponibilitat i efectes secundaris que puguin causar a altres teixits en humans. És per això que la translació dels resultats de d'animal a l'humà requereixi d'un procés exhaustiu de validació. Per una altra banda els cultius cel·lulars, per exemple de fibroblasts de pacients AME, i l'ús de la tecnologia, que les noves cèl·lules mare pluripotencials inuïdes (IPs) aporten amb la capacitat de generar MNs, pot ajudar a omplir el forat que hi ha entre els models animals i els humans.

L'AME, com ja s'ha detallat anteriorment, es classifica en diferents tipus en funció de la severitat de la malaltia, per tant, les drogues aplicades es poden comportar diferent en funció del tipus d'AME que tractem. Aquí rau la importància d'escollir bé el tipus de model a utilitzar i alhora la gran importància que té l'ús dels models animals, potser no seria desgavellat testar la mateixa droga en models diferents. Un exemple d'això el tenim en l'àcid valproic, testat en dos laboratoris diferents, en el primer laboratori van utilitzar cultius cel·lulars (MN i fibroblasts) de ratolins AME tipus I, van demostrar un increment de l'expressió d'*SMN* que no es va traduir en un creixement axonal (Rak *et al.*, 2009), mentre que Tsai *et al.* (2008), utilitzant animals d'AME tipus III van demostrar una recuperació a nivell muscular.

En les malalties genètiques com l'AME, es poden plantejar estratègies terapèutiques a nivell pre-transcriptional (incrementant l'expressió gènica) o post-transcriptional (ajudant a la proteïna a sobreviure o fent-la més activa):

8.1.1 Teràpia gènica

8.1.1.1 Increment de l'expressió d'*SMN*

Augmentar l'expressió d'*SMN2* va ser el primer objectiu per tractar l'AME. Hi ha diferents maneres d'augmentar l'expressió d'*SMN2*, la més coneguda és a través dels

inhibidors de la HDAC, és a dir, inhibir la condensació i la transcripció de la cromatina i promoure l'acetilació de reguladors transcripcionals. Es troben diferents HDACs (HDAC1-5) entre els quals, HDAC 1 i 2 s'associen el gen *SMN* durant el desenvolupament. No obstant, alguns inhibidors de les HDACs, com el VPA i el SAHA, que no s'uneixen ni a HDAC 1 ni 2 tenen increments en el gen *SMN*, per tant, caldria esperar millors resultats si es trobessin inhibidors directes de HDAC 1 i 2 (Kernochan *et al.*, 2005). Respecte el VPA, un segon objectiu seria incrementar *SMN* a través de molècules de senyalització que participen en la fosforilació de la tirosina i en la cascada del receptor de la tirosina quinasa i els seus factors de transcripció, com ara Stat5 (*signal transducers and activators of transcription 5*). El punt de connexió entre la proteïna SMN i Stat5 és la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2. S'ha proposat que SMN és una proteïna anti-apoptòtica i que comparteix la via d'apoptosi amb Bcl-2; per contra, la promoció de Stat5 és deguda a la regulació de l'expressió de les caspases o de proteïnes anti-apoptòtiques de la família de Bcl-2. Alhora Stat5 es regula a través de la janus quinasa 2 (JAK2), que està implicada en mecanismes de neuroprotecció. Stat5 pot regular l'expressió d'*SMN2*, reconeixent directament l'element putatiu d'unió de Stat5 a *SMN2* (Ting *et al.*, 2007). Entre els inductors de Stat5 hi trobem la prolactina, el TSA i el butirat de sodi (SB). Altres proteïnes Stat, podrien estar implicades en l'expressió d'*SMN*, com ara Stat1 que és induït per INF- β . Curiosament, Baron-Delage *et al.* (2000), van trobar que INF- β i INF- γ indueixen l'expressió d'*SMN*. Un tercer compost que incrementa l'activitat del promotor d'*SMN* és un derivat de la 2,4-diaminoquinazolina (D156844). Aquest compost millora significativament el fenotip, malgrat l'expressió d'*SMN* es mantingui pràcticament igual. Hi ha tres possibles explicacions: (i) l'expressió d'*SMN* s'ha incrementat notablement en les MNs, però no en els altres tipus de cèl·lules (astròcits, oligodendròcits, ...) i (ii) la diana de D156844 és DcpS (scavenger mRNA decapping enzyme). DcpS participa en el metabolisme dels mRNAs: pre-mRNA *splicing*, transport nuclear, traducció i degradació (Bail *et al.*, 2008). Llavors, la inhibició de DcpS pot provocar que s'incrementi la transcripció d'*SMN*, l'estabilització dels mRNAs d'*SMN2*, modificació de l'*splicing* dels pre-mRNAs d'*SMN2* o afectar la traducció dels trànscripts d'*SMN2*, i (iii) la millora fenotípica pot ser independent de la inhibició de DcpS (Butchbach *et al.*, 2009).

Alguns dels inhibidors de les HDAC (àcid valproic, SB, TSA), s'ha vist que poden augmentar un 2% la transcripció gènica de tots els gens (incloent el gen *SMN*). Les raons per les quals els tractaments provats en pacients AME i en models d'AME

murins no hagin tingut l'eficàcia que s'esperava, poden ser: (i) aquestes drogues no actuen específicament sobre el promotor d'*SMN2*, (ii) aquestes drogues poden ser tòxiques per les MNs i (iii) efectes secundaris indesitjats en la resta de tipus cel·lulars (Sendtner, 2010).

8.1.1.2 Potenciar la inclusió de l'exó7 (ASO i trans-*splicing*)

L'augment de la proteïna SMN potenciant l'exó 7 ha obtingut resultats prometedors en altres malalties genètiques com la distròfia miotònica i la distròfia muscular de Duchènne (Endesfelder *et al.*, 2004). Aquests tractaments es basen en l'ús de l'enginyeria genètica, amb oligonucleòtids anti-sentit (ASOs), RNAs trans-*splicing* i adeno-virus associat (AAV). L'ús dels AAVs són adequats per als models murins, però el seu ús en humans pot ser problemàtic donat que són molt immunogènics, per tant, no poden ser administrats contínuament. Diferents autors utilitzen ASOs per restaurar el gen *SMN* a través de la correcció de l'exó 7 en el gen *SMN2*. Sovint, una combinació d'injeccions intracerebroventriculars (ICV) i injeccions per via subcutània (SC) o intravenosa (IV) són els millors enfocaments per augmentar la proteïna FL-SMN a tot el cos (Hua *et al.*, 2011; Lorson *et al.*, 2010). A més a més, si els ASOs es combinen amb estratègies de trans-*splicing*, la millora de la malaltia és major (Coady *et al.*, 2010). L'RNA trans-*splicing* requereix: (i) un domini d'unió que interaccionarà amb una diana concreta, (ii) un domini d'*splicing* que pugui donar pas a una reacció d'*splicing* amb un intró determinat (iii) un exó o sèrie d'exons intactes per reemplaçar la regió defectuosa del gen (Lorson *et al.*, 2010). Cal tenir present que la seqüència objecte de l'ASO ha d'evitar qualsevol regió reguladora crucial per a l'*splicing* de l'exó 7. Una possible solució a aquest problema la van aportar Miyajima *et al.* (2002), que van demostrar que cèl·lules en cultiu a les quals se'ls hi aplicava ASOs dirigits directament contra una regió de l'intró 6 identificada com a un element cis-*acting* per a l'exclusió de l'exó 7 (que té la transició C-T), incrementava la inclusió de l'exó 7. La idea és que un RNA bifuncional tingui dues accions diferents: (a) la inhibició del silenciador de l'*splicing* mediat a través de la regió anti-sentit, i (b) el reclutament de les proteïnes SR (Lorson *et al.*, 2010). L'exó 7 té una regió que actua com a un ESE, lloc on s'hi uneix el factor de *splicing* Htra2- β 1 promovent la inclusió de l'exó 7 i incrementant així la FL-SMN. Llavors, Htra2- β 1 és una altra possible droga per al tractament de la malaltia (Hofmann *et al.*, 2000). Alteracions en el patró d'expressió dels gens van associats a processos

carcinogènics; hi ha un elevat nombre de medicaments que interfereixen en aquestes alteracions retornant el patró normal d'expressió, entre ells hi trobem l'antibiòtic aclacinomicina A (Aclarubicin) una antraciclomicina, que incorpora l'exó 7 en línies cel·lulars de pacients AME tipus I. L'avantatge d'aquest antibiòtic és que no actua de forma general en tots els gens, evitant així els efectes colaterals derivats; l'inconvenient és que al ser un quimioteràpic, no és recomanable en persones joves i nens (Andreassi *et al.*, 2001).

8.1.1.3 Restabliment complet del gen *SMN*

La completa restauració del gen *SMN* a través de virus modificats genèticament ja ha donat resultats interessants en models murins d'AME. Els virus utilitzats per a aquest mètode de tractament són: (i) lentivirus aplicats a diversos músculs que van mostrar transport retrògrad a MNs i amb una feble resposta immune tot just després de les injeccions; i (ii) diferents serotips de virus adeno-associats (AAV) (AAV9 i AAV8) amb els quals Foust *et al.* (2008) i Passini *et al.* (2010) ja han trobat resultats importants. Ambdós grups han aconseguit la restauració dels nivells d'*SMN* al SNC i al múscul, tot i que al múscul la restauració no ha estat completa. L'augment de la supervivència era evident sobretot quan la injecció es feia en nounats. Re-dissenyant el vector, com ara introduint modificacions de la càpside, mutagènesi o canviant els gens de posició, podria donar l'oportunitat de tractar els pacients amb edats més avançades (Foust *et al.*, 2010). Alguns efectes secundaris, encara per resoldre, van aparèixer molt de temps després de la injecció; en el cas dels AAV9 es van trobar amb necrosis a les orelles, cua i potes i en els AAV8 es van veure dificultats respiratòries, pèrdua de pes corporal, úlceres, incapacitat per orinar i necrosis. Traduir aquesta teràpia als pacients pot ser difícil, a causa de la immunogencitat de l'AAV en l'humà (Sendtner, 2010).

8.1.1.4 Transplantament amb cèl·lules mare

Les cèl·lules mare (StC) tenen la capacitat de proliferar i diferenciar-se en múltiples llinatges cel·lulars. Hi ha diversos tipus d'StC i no tots són adequats per a les malalties neuromusculars. Els més apropiats són: a) les cèl·lules mare neurals (NSC), cèl·lules generalment determinades per la capa germinal embrionària; b) les cèl·lules pluripotencials induïdes (IPS), generades a partir de teixits somàtics i reprogramades

com a cèl·lules mare semblants a les embrionàries (cèl·lules pluripotencials procedents de la massa interior d'un blastocist); c) cèl·lules multipotencials derivades de fetus (FNStC) que poden produir neurones, astròcits i oligodendròcits; d) cèl·lules mare hematopoiètiques (HStCs) que poden donar lloc a micròglia o cèl·lules micròglia-like; i e) cèl·lules mare mesenquimals (MSC), que si bé donen lloc a l'os, cartílag, greix i mioblasts, també es poden diferenciar en cèl·lules neurona-like i astròcit-like, essent aquestes darreres importants per la producció de factors de creixement protectors, com IGF-1 i el brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Els dos principals objectius per les StCs són: (i) idealment, el reemplaçament cel·lular i (ii) realísticament, proporcionar riquesa ambiental mitjançant la producció de factors neurotròfics, la neteja dels factors tòxics o la creació de xarxes neuronals auxiliars al voltant de les àrees afectades (Gowing i Svendsen, 2011; Lunn *et al.*, 2011). El descobriment de les cèl·lules IPSs obre la possibilitat de tenir un model de la malaltia humana *in vitro*. Chang *et al.* (2011) van establir línies d'IPSs a partir de fibroblasts de pacients amb AME tipus 1; les línies d'IPSs obtingudes a partir d'aquests pacients van posar de manifest: (i) la poca capacitat, que les cèl·lules AME transformades en IPSs, tenen de formar MNs i (ii) les anomalies en el creixement de les neurites; alhora, el subministrament d'SMN normalitzava el creixement de les neurites i la diferenciació correcta de les MNs. Tot i que aquestes cèl·lules són eines fantàstiques per a les investigacions en el desenvolupament humà i la malaltia, i en el cribatge de drogues, la utilització clínica està limitada pels canvis genètics induïts pels procediments de generació de les cèl·lules utilitzant molècules virals, i per l'expressió anormal de gens imprimats (Wyatt i Keirstead, 2010).

La majoria d'estudis de transplantament en malalties de la MN s'han fet en ratolins que desenvolupen l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), i fins al moment, només n'hi ha dos de referenciats en l'AME; ambdós estudis han estat realitzats amb el ratolí SMAΔ7 (Corti *et al.*, 2008 i 2009). El transplantament d'NSCs podria millorar els fenotips neurodegeneratius, a través de diversos mecanismes distints del reemplaçament neuronal, que inclourien el lliurament de factors de creixement amb propietats neuroprotectores i axogèniques, produïts per les mateixes cèl·lules mare, la reducció de substàncies tòxiques en el microambient i la substitució d'altres cèl·lules no neuronals (Corti *et al.*, 2008). El trasplantament d'NSCs en ratolins que desenvolupen l'ELA millora la seva neurogènesi i l'alliberament de factors de creixement. Les NSCs, a l'AME, milloren la integritat de la MN (valorada en termes de mida i nombre de

cèl·lules) i la funció motora, augment de pes corporal i la supervivència; no obstant això, el creixement dels axons de les MNs s'ha vist que és limitat. Pel que fa al múscul, hi ha una millora general: increment del diàmetre i del nombre de les miofibres i millora en l'estructura de les NMJs. Aquests resultats són més positius quan les NSCs vénen de línies seleccionades a través de drogues (Corti *et al.*, 2009). L'ús de les StC no és innocu, i hi ha tres possibles problemes que cal considerar; en primer lloc la producció de teratomes és freqüent en cèl·lules mare embrionàries i iPS, una solució podria ser la creació de cèl·lules progenitores neurals bi-potencials (formen astròcits i neurones però no oligodendròcits) (Gowing i Svendsen, 2011) o les cèl·lules mare neurals derivades de la línia seleccionades per drogues (Corti *et al.*, 2009), ambdues prevenen l'aparició de tumors. En segon lloc les cèl·lules gials poden alliberar senyals inhibidors que impedeixen el desenvolupament de les NSCs cap a neurones i cap a cèl·lules colinèrgiques MN-like a la ME, aquestes inhibicions es poden prevenir amb un procés, previ, de *priming* in vitro. En tercer lloc, tot i que els trasplantaments en models de ratolí d'ELA i AME tenen alguns resultats positius, quan aquests trasplantaments es van aplicar als éssers humans la resposta no va ser tan efectiva, la malaltia no va millorar i en alguns casos el trasplantament va causar efectes secundaris greus. Però, en el cas hipotètic que els resultats en els éssers humans tinguessin èxit, el principal obstacle seria el temps que tarden les MNs a assolir el múscul (Gowing i Svendsen, G 2011).

8.1.1.5 Suplement neurotròfic i neuroprotecció

En aquest apartat es vol recollir un conjunt de tractaments que no concorden amb cap dels apartats anteriors i que no van dirigits a un increment d'SMN, tot i que en últim terme, els nivells de la proteïna augmentin, també, lleugerament. El tractament amb la ceftriaxone, antibiòtic β -lactàmic, té una funció neuroprotectora. En animals que desenvolupen ALS es va veure que l'antibiòtic ceftriaxone retardava la pèrdua del to muscular i els hi allargava la vida, efecte que podria anar lligat a l'eliminació del glutamat extracel·lular acumulat a la ME. L'eliminació seria deguda a un increment de l'expressió del transportador de glutamat als astròcits (Eaat2), conegut com a GLT1 en ratolins. L'efecte que té sobre els ratolins amb AME està descrit a la **Taula 2** (al final de la introducció), amb una funció neuroprotectora de les MNs i en la integritat de la unió motora, que podria venir del canvi d'expressió de determinats gens (molts implicats en el metabolisme i transcripció dels RNAs). Curiosament un d'aquests gens que han

incrementat la seva expressió fins arribar a nivells dels ratolins WT és el gen modificador *plastin3*.

Se sap que els factors neurotròfics juguen un paper important en el correcte desenvolupament i manteniment de les unions neuromusculars. Aquest és el cas de la pleiotropina (PTN), un NTF que incrementa a les cèl·lules de Schwann denervades i que *in vitro* s'ha demostrat que té funcions en una gran varietat de teixits i tipus cel·lulars, així com un paper important en el sistema nerviós, induint el creixement de les neurites. S'expressa en el sistema neuromuscular en desenvolupament i té un paper important en l'agregació de l'acetilcolina a nivell post-sinàptic. La PTN està molt elevada al múscul dels embrions, mentre que gairebé no es pot detectar en el múscul adult, excepte quan hi ha denervació, on els nivells del seu RNAm augmenten ràpidament. Mi *et al.* (2007), demostren que la PTN actua de NTF a les MNs, obrint així una nova finestra de cara a possibles tractaments.

Un altre sistema de neuroprotecció i que ahora interfereix en la regulació de l'*splicing* del gen SMN2 és l'exercici físic diari que confereix plasticitat i supervivència cel·lular, promovent la reinervació de les NMJs (Grondard *et al.*, 2005). La maduració de les MNs i la NMJ (incloent la maduració muscular), en quant a activitat depenent, és deguda a l'activació dels receptors d'NMDA a través del glutamat (principal NT excitatori del SNC). Tenint en compte que les MNs embrionàries i neonatals són més susceptibles a morir, l'efecte protector de l'exercici físic a través dels receptors de NMDA és accelerar el desenvolupament postnatal, i evitar així, la prematura mort neuronal (Biondi *et al.*, 2007). Tractaments *in vivo* demostren que l'activació d'NMDAR amb dosis baixes d'NMDA endarrereix els símptomes i l'avançament de la malaltia, accelerant la maduració de les NMJs, potenciant l'expressió d'SMN a la ME i limitant el procés apoptòtic. Per altra banda, dosis altes de NMDA fan l'efecte contrari, provocarien exotoxicitat i incrementarien la mort cel·lular per apoptosi (Biondi *et al.*, 2010).

8.1.2 La proteïna SMN com a diana terapèutica

La proteïna SMN es degrada a través del sistema d'ubiquitinització del proteasoma (UPS) (Chang *et al.*, 2004; Burnett *et al.*, 2009). L'UPS és essencial en el desenvolupament neuronal, com ara la migració neuronal i la sinaptogènesi tant a nivell presinàptic com postsinàptic (Yi *et al.*, 2007). Diversos enzims etiqueten les proteïnes

que necessiten ser degradades, per la via de la ubiquitina. El procés proteolític comença després de l'acoblament d'almenys 4 mitges cadenes d'ubiquitina i després de l'alliberació de la proteïna al proteasoma S26. L'S26 el podem dividir en el proteasoma catalític (20S) i en el complex regulador (19S) (Yi *et al.*, 2007). Al nucli central de cada proteasoma S26 hi ha sis regions proteolítiques actives: dues trenquen residus hidrofòbics (*quimotripsina-like*), dues altres residus bàsics (*tripsina-like*) i les dues restants residus àcids (*caspara-like*). En aquestes regions es catalitza la divisió de les proteïnes en oligopèptids curts (Kisselev *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2011). Donat que tractaments amb inhibidors del proteasoma mostren un increment de la proteïna SMN, i sabent que SMN es degrada via ubiquitina, s'albiren dues noves possibilitats de tractament: la primera mitjançant la inhibició d'un o dos llocs actius del nucli central del proteasoma 20S, deixant per tant 4 llocs actius, i la segona estabilitzant la proteïna SMN evitant que comenci el procés d'ubiquitinització.

8.1.2.1 Inhibició de la degradació de la proteïna SMN

En cultius cel·lulars, la majoria dels inhibidors del proteasoma són tòxics. El bortezomid (un àcid dipeptidil borònic modificat, derivat de la leucina i la fenilalanina) és un medicament, amb baixa toxicitat utilitzat en el tractament del mieloma múltiple, que inhibeix l'activitat *quimotripsina-like* del proteasoma S26, mantenint els altres quatre llocs completament funcionals (Adams *et al.*, 1999). La baixa toxicitat del bortezomid en els cultius cel·lulars fa que sigui un fàrmac amb potencial terapèutic. La combinació del bortezomid amb altres drogues com la tricostatina A (TSA), que augmenta la proteïna SMN potenciant *SMN2*, incrementarien l'efectivitat en els tractaments (Kwon *et al.*, 2011a; taula 2) També és possible que la inhibició del proteasoma contribueixi en la millora muscular, per altres mecanismes independents d'SMN.

8.1.2.2 Estabilització de la proteïna SMN, potenciant l'estabilització d'SMN i/o inhibint la degradació d'SMN

Se sap que quan SMN està unida a la Gemina 2, o al complex sencer de les gemines, SMN és estable. No obstant això, el mecanisme de control de l'estabilitat de la proteïna SMN, encara no està definit (Kwon *et al.*, 2011b; Burnett *et al.*, 2009). Es pot estabilitzar SMN de dues maneres. En primer lloc, estimulants proteïnes que promouen

la formació del complex SMN-gemines, com la proteïna quinasa A (PKA) (Burnett *et al.*, 2009). La forskolina activa la PKA a través del cAMP. Els fibroblasts procedents de pacients amb AME acumulen proteïna SMN, però els nivells del seu mRNA no han canviat, per tant, la forskolina actua post-transcriptcionalment (Burnett *et al.*, 2009). De la mateixa manera, compostos com els agonistes β -adrenèrgics estimulen la via de AMPc activant la PKA. En segon lloc, podem inhibir la degradació d'SMN mitjançant el bloqueig de la seva ubiquitinització amb l'ús d'inhibidors de la ubiquitina, com ASK1 (Kwon *et al.*, 2011b). Se sap que l'expressió d'ASK1 indueix la diferenciació neuronal (creixement de les neurites, la inducció de proteïnes específiques de les neurones i la fosforilació de les proteïnes NF) *in vitro* (Takeda *et al.*, 2000), ASK1 té un paper crític en la inducció de l'apoptosi després de l'estrès oxidatiu i del reticle endoplasmàtic (ER), després de l'exposició a les citoquines pro-inflamatòries i després de l'esgotament dels factors de creixement (Homma *et al.*, 2009 i Kanamoto *et al.*, 2000).

8.1.3 El múscul com a diana terapèutica

Com ja s'ha explicat, a part de les neurones motores, els músculs també estan probablement afectats no només a causa de la denervació. Per això, la intervenció terapèutica sobre la cèl·lula muscular es un altra possible estratègia a considerar en l'AME. La regulació del volum citoplasmàtic associat als mio nuclis (procés que depèn de les taxes de síntesi i de degradació de les proteïnes) i el control de la quantitat de mio nuclis dins d'una fibra (procés que requereix la fusió de les cèl·lules satèl·lit activades) ambdós determinen la mida de les fibres postnatales. Un compost important en el desenvolupament muscular i la regeneració, i que activa les cèl·lules satèl·lit és el factor de creixement IGF-1. Aleshores, l'administració d'IGF-1, pot ser un mecanisme per potenciar la millora general del fenotip dels pacients d'AME. Estudis en ratolins sobre-expressors d'IGF-1 que han rebut tractament amb TSA (Taula 2) no detecten cap canvi en el fenotip (Bosch-Marcé *et al.*, 2011), possiblement degut a que els ratolins AME tenen menys capacitat per respondre a IGF-1, aquests resultats, estan en concordança amb els experiments de Hua *et al.* (2011), on l'expressió d'Igfals (*IGF-binding protein, acid labile subunit*) està molt reduïda en ratolins AME a P1. A part d'IGF-1, hi ha la follistatina, una glicoproteïna autocrina que retarda la pèrdua de MNs i millora la massa muscular, però sense que es detecti cap increment d'SMN. És bastant

probable que la causa d'aquesta millora sigui la capacitat que té al follistatina de preservar l'expressió de factors neurotròfics derivats del múscul en l'AME (Rose *et al.*, 2008), que serien necessaris per activar el creixement i remodelació dels terminals motors en l'adult.

L'aparició de compostos creats a través d'enginyeria genètica, com és el cas del *Met-Activating Genetically Improved Chimeric Factor-1* (Magic Factor-1), és una modificació genètica de l'*hepatocyte growth factor* que té com a receptor la tirosina quinasa Met. Aquest receptor s'expressa a molts teixits, incloent múscul i al teixit nerviós i promou la regeneració muscular, activant les cèl·lules satèl·lit, inhibint la diferenciació miogènica i protegint les cèl·lules davant l'apoptosi. En cèl·lules en cultiu s'ha vist que promou la diferenciació dels mio blasts i la seva supervivència. Ratolins transgènics amb Magic-factor 1 veuen incrementada la seva capacitat motora amb una hipertròfia dels músculs. El fet que s'hagi demostrat que pot recuperar fenotips distròfics (Cassano *et al.*, 2008) obre una altra porta a possibles vies de tractament.

8.2 Importància de la restauració primerenca d'SMN

Alguns grups discuteixen la necessitat de la proteïna SMN a nivell embrionari (Azzouz *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2001; Butchbach *et al.*, 2009; Lutz *et al.*, 2011). De fet, les larves de *Drosophila* i *C. elegans* amb delecions homozigotes del gen *Smn*, han adquirit la proteïna SMN dels seus pares heterozigots que els ha permès un desenvolupament primerenc normal; és només en etapes posteriors, que els mutants nuls han desenvolupat defectes en el creixement i la fertilitat i han mort abans d'arribar a l'edat adulta (Grice *et al.*, 2011). Destaquen la importància que la ràpida restauració de la SMN és crucial per tenir una resposta satisfactòria al tractament (Azzouz *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2001; Foust *et al.*, 2010, Lutz *et al.*, 2011). De fet, la finestra terapèutica és menor en la forma més severa d'AME, per la qual cosa, es suggereix l'administració prenatal d'SMN quan el model de ratolí correspon a l'AME tipus 1 (Chang *et al.*, 2001). Aquest retard en l'administració de la droga (en moltes proves es comença a administrar la droga quan ja han aparegut els primers símptomes) podria estar també relacionat amb la falta de recuperació del pes corporal; en algun cas esporàdic en el que els ratolins amb AME han augmentat de pes, s'ha vist que aquest sempre és molt inferior al dels seus germans sans de ventrada. De fet, la recuperació del pes corporal podria estar

relacionat amb l'inici tardà del tractament, com la majoria dels fàrmacs provats en ratolins que desenvolupen AME, (Farooq *et al.*, 2011, Kwon *et al.*, 2011a; Nizzardo *et al.*, 2011). No obstant això, quan s'aplica l'enginyeria genètica (Lutz *et al.*, 2011) la recuperació del pes corporal és excepcional, probablement a causa de la restauració d'SMN en tots els teixits.

Malgrat no hi hagi, encara, un tractament per a la cura de l'AME, la majoria de possibles tractaments experimentals disponibles actualment serien aplicables a pacients que tenen un desenvolupament no agut de la malaltia, és a dir, una AME tipus II. El fet que Lutz *et al.*, hagin pogut rescatar ratolins amb fenotip AME, es a dir que han tractat i solucionat l'AME post-simptomàtica, dóna també esperances a que la cura dels pacients AME tipus I pugui arribar algun dia. Lutz *et al.* fan èmfasi en la restauració d'SMN, ja sigui modulant el gen *SMN2* i/o administrant el gen *SMN1* o la seva proteïna als infants.

8.3 El liti com a tractament de malalties neurodegeneratives

El liti s'administra en determinades malalties psiquiàtriques, com és el cas del transtorn bipolar (BPD), antigament conegut com a trastorn maníac-depressiu. Descobriments realitzats durant els darrers 20 anys sobre l'etiologia del BPD, han revelat que aquest trastorn es pot associar a defectes en les vies de senyalització de la supervivència i mort cel·lular, que cursen amb una plasticitat i funcionalitat neuronal anòmala. Els nous descobriments sobre l'activitat al llarg de la vida en la neurogènesi i l'acció que determinats anti-depressius fan sobre els canvis funcionals i morfomètrics que pateixen aquests pacients, han fet que actualment la BPD es classifiqui dins d'una classe nova de malalties neurodegeneratives (Wada *et al.*, 2005).

8.3.1 Història del liti

A finals del segle XIX el liti vivia els seus millors moments quan Garrod el va introduir com a cura per la gota, tractament de pedres al ronyó, reumatisme i urèmia. Tal va ser l'èxit de les propietats medicinals del liti que les aigües amb alt contingut de liti van ocupar el mercat (Vichy i Perrier per exemple). Durant aquell període es va fer un excés en el consum de liti i els efectes tòxics no van tardar en aparèixer. Segons

Garrod (1859) el consum “moderat” de liti (de 1 a 4 pastilles 3 cops al dia) no produïa efectes tòxics, i així va ser fins que al cap de 50 anys, consumidors crònics de liti van començar a patir problemes cardíacs. Aquest fet, junt amb els efectes secundaris com l'estat de letargia, nàusees i tremolors, i l'aparició de nous fàrmacs, va fer que el liti caigués en desús i es retirés del mercat davant la mort de diversos pacients hipertensos que es prenién el LiCl com a substitut de la sal.

A finals dels anys 40, principis dels 50, Cade, en experiments de toxicitat de l'urea en cobaies va substituir l'àcid úric (molt insoluble en aigua) per l'urat de liti (l'urat més soluble en aigua) trobant un efecte protector davant la toxicitat de l'urea. Experiments posteriors van demostrar les propietats sedatives i anti-convulsives del liti, convertint-lo així en un bon medicament per a trastorns maníacs i l'epilèpsia.

Aquest redescobriment dels efectes del liti, va revolucionar el tractament del BPD. El trastorn bipolar és el trastorn psiquiàtric més comú, amb una incidència del 3-5%, i amb característiques de cronicitat, recaigudes freqüents, símptomes residuals, sub-síndromes, discapacitats cognitives i funcionals i amb un índex de suïcidi molt elevat (10-20%). El BPD es preveu que sigui la segona malaltia amb més prevalença cap al 2020. Fins fa uns anys les malalties maníac-depressives es consideraven malalties purament psiquiàtriques, actualment, però es consideren malalties sistèmiques que engloben diversos síndromes tals com anormalitats cognitives, motores, autonòmiques, endocrines i de la son. El tractament amb liti s'utilitza tant en crisis agudes de mania com a nivell profilàctic davant la recurrència d'episodis de mania i depressió, disminuint així la mortalitat causada per la malaltia (Wada *et al.*, 2005; Manji *et al.*, 1999). Els seus efectes però, van més enllà de la millora a nivell de comportament. S'ha vist que els pacients maníac-depressius tractats amb liti, incrementen la matèria grisa i el volum del cervell i milloren la viabilitat i funció neuronal amb increments dels nivells d'N-acetil-aspartat, indicant que l'atròfia que pateix el cervell d'aquests pacients és reversible i que amb tractaments químics es pot potenciar la neurogènesi (Wada *et al.*, 2005). Desafortunadament, no tots els pacients responen adequadament i/o no toleren els efectes secundaris que comporta el tractament amb liti (Phiel i Klein, 2001). Darrerament el descobriment de les vies d'actuació del liti per tal de trobar compostos amb la mateixa funcionalitat que el liti però amb menys efectes secundaris, ha provocat un interès del liti com a possible factor pel tractament de trastorns neurodegeneratius (Quiroz *et al.*, 2004).

A part dels efectes neuropsiquiàtrics en el BPD, depressions i determinades cefalees; en cultius cel·lulars, el liti protegeix davant l'excitotoxicitat i propicia la remodelació sinàptica, i en Dm, s'ha vist que pot incrementar l'alliberació de NTs a les NMJs (Phiel i Klein 2001). El liti pot alterar el desenvolupament dels organismes, curiosament, més en invertebrats (malformacions) que en mamífers (tumors), i fins i tot en humans (defectes cardíacs), intervé en el metabolisme mimetitzant els efectes de la insulina, incrementa la granulopoesi, incrementa les cèl·lules mare hematopoètiques pluripotencials (estimulant l'alliberació de citoquines i/o actuant sobre les mateixes cèl·lules mare). A més a més, en pacients amb càncer, el liti redueix la neutropènia sovint causada pels quimioteràpics (Phiel i Klein 2001).

8.3.2 Dianes moleculars del liti

El liti, és el més petit dels metalls alcalins. En concentracions terapèutiques (0,6-1,2mM) en els humans inhibeix determinats enzims de forma no competitiva, és a dir, desplaçant el cofactor (Mg^{2+}) de les zones actives; per tant, a diferència de les inhibicions competitives, a més concentració del substrat, més grau d'inhibició enzimàtica (Berridge *et al.*, 1989; Harwood, 2005). Alguns problemes que comporta la ingesta de liti són: l'alta toxicitat que té (la finestra de toxicitat és molt estreta), la poca tolerància que provoca en alguns pacients i, en estudis realitzats usant diferents animals, s'ha vist que produeix malformacions a diferents organismes en desenvolupament (Berridge *et al.*, 1989; Klein i Melton, 1996; Yoshioka *et al.*, 2009). D'entre els enzims inhibits pel liti hi trobem 4 fosfomonoesterases dependents del magnesi: inositol monofosfatasa (IMPasa), inositol polifosfat 1-fosfatasa (IPPasa), bifosfat nucleotidasa (BPNasa), fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa) i dos enzims metabòlics, la fosfoglucomutasa (PGM) i el glicogen sintasa quinasa-3 (GSK-3). Els enzims IMPasa i IPPasa estan implicats en el reciclatge i síntesi *de novo* de l'inositol, component imprescindible de la via de senyalització del fosfoinositol (IP). El liti intervé en la transducció de senyals mediat per la proteïna G, ja sigui inhibint-la o actuant sobre els intermediaris de la via com són l'adenil-ciclasa, la fosfolipasa C i la proteïna quinasa C (**Fig. 18**; Phiel i Klein 2001).

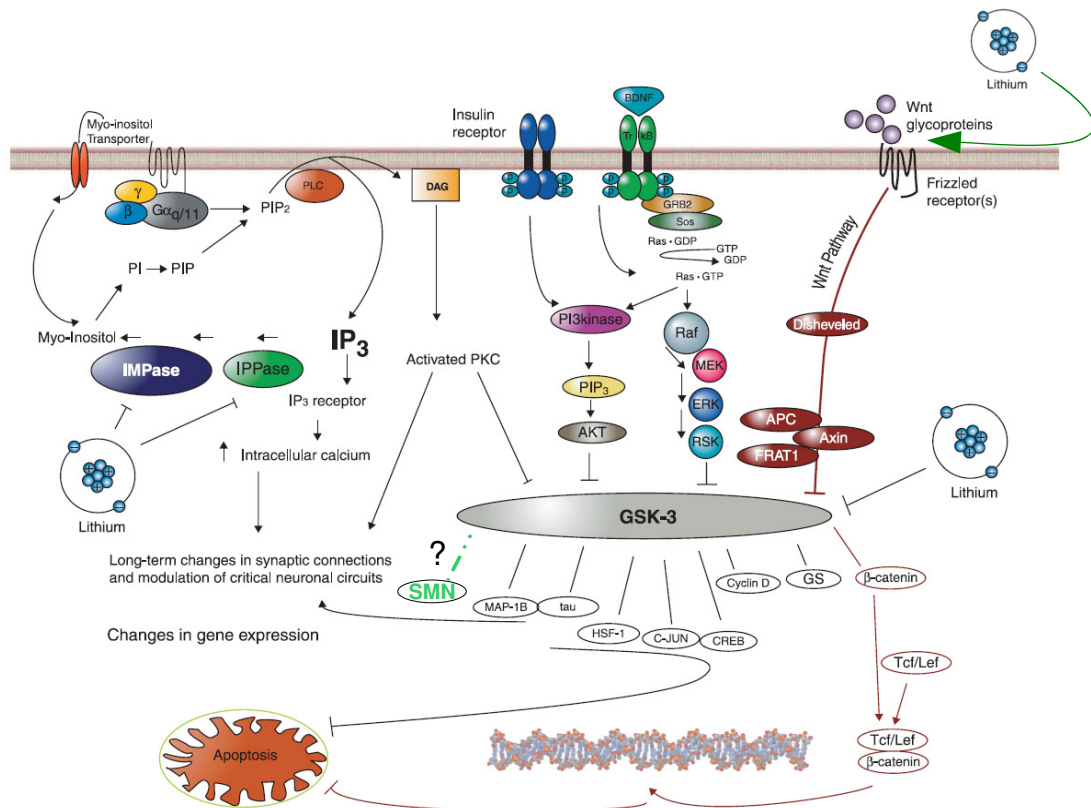


Figura 18. La glicogen sintasa quinasa (GSK) i l'inositol monofosfatasa (IMPasa) són dianes directes del liti. La GSK-3 és un intermediari de diverses vies de senyalització que inclouen vies de senyalització neurotròfiques, PI3K i la via de Wnt, l'activació d'aquestes vies inhibeix la GSK-3. En la via de les Wnts, la inhibició de la GSK permet un estabilització de la β -catenina, alhora, el liti mimetiza les glicoproteïnes Wnt fet que impedeix la formació del complex GSK-Axina, alterant la dinàmica dels microtúbuls en els cons de creixement i incrementant el branching. GSK-3 és també un regulador de SMN a través de la via PI3K-AKT. L'activació d'algunes proteïnes G indueixen la hidròlisi de fosfoinositol-4,5-bisfosfat (PIP2) a diacilglicerol (DAG) i a inositol-1,4,5-trifosfat (IP3) per l'acció de la fosfolipasa C. IP3 s'uneix al seu receptor que alhora funciona de canal de Ca^{2+} cel·lular. IP3 es recicla cap a PIP2 a través de la IMPasa i la inositol polifosfatasa fosfatasa (IPPasa); ambdues inhibides pel liti. (Modificació de Quiroz *et al.*, 2004).

8.3.3 Mecanismes d'acció del liti

8.3.3.1 Hipòtesi de la depleció de l'inositol

Els inositols fosfat són missatgers intracel·lulars que intervenen en un ampli ventall de vies de senyalització, són reserves de fosfat, participen en la síntesi del lípid de membrana fosfatidil-inositol, controlen l'alliberament del calci de les reserves intracel·lulars, medien la translocació de diverses proteïnes per tal que aquestes puguin actuar sobre diverses vies de senyalització, estan implicats en la quimiotaxis,

emmagatzemen minerals, i indirectament actuarien sobre l'expressió gènica inhibint la GSK3 a través de la PKC (Achariya *et al.*, 1998, Harwood, 2005). El model d'actuació del liti més acceptat és la depleció de l'inositol a través de la interacció del liti directament sobre IMPasa i indirectament sobre IPPasa provocant una disminució de les concentracions d'inositol i dels seus derivats, causant no només una aturada en la via de senyalització a través d'IP3, sinó que també en la via de senyalització del diacilglicerol (DAG), és a dir, hi hauria un bloqueig de les vies de senyalització lligand dependents a través de PKC, IP3 i conseqüentment del calci. La importància, a nivell neuronal, dels nivells dels diferents tipus d'inositol en concret d'IP3 i PIP2, rau: (1) en la implicació que té l'IP3 en la mobilització del Ca^{2+} dels compartiments intracel·lulars, i (2) la implicació de PIP2 en la formació del DAG que activa la PKC, proteïna quinasa que facilita l'alliberació dels NTs per diferents vies entre les quals hi ha la regulació del Ca^{2+} i el reclutament i l'alliberació de les vesícules pre-sinàptiques, per tant la funció neuronal quedaria afectada per ambdues bandes (**Fig. 18**; Harwood, 2005).

Al 1989, Berridge *et al.* formulaven una hipòtesi unificada de les accions del liti a través de la via de l'inositol. Discutien la implicació d'aquesta via en els ritmes circadians, l'epilèpsia o en la teratogènia. A finals dels anys 90, Klein i Melton (1996) van demostrar que les malformacions que causava el liti en organismes en desenvolupament no eren causades per la inhibició de la via de l'inositol, sinó per la inhibició de la via de senyalització de la glicogen sintasa quinasa 3 beta (GSK3- β).

8.3.3.2 Efectes del liti sobre la GSK3

La GSK3, és una serina-treonina-quinasa, altament conservada al llarg de l'evolució, es manté molt activa en cèl·lules quiescents i es regula per inactivació. Se'n coneixen dues formes, l' α i la β , però a la literatura generalment sempre es parla de la β , ambdues tenen propietats bioquímiques semblants però no idèntiques (Manji *et al.*, 1999; Phiel i Klein 2001). És una proteïna generalment molt activa a les cèl·lules i forma part de moltes vies de senyalització (PI3K, proteïna quinasa A i C, ERK, via de senyalització de glicoproteïnes [Wnt]) que actuen a través d'ella inactivant-la. Aquesta característica fa que la GSK3 reguli un gran ventall de processos cel·lulars, tals com la regulació del citoesquelet a través dels seus efectes sobre la proteïna tau (τ) i la Sinapsina I, efectes a nivell nuclear amb la fosforilació de c-jun, la translocació nuclear

de la β -catenina, la síntesi del glicogen, l'expressió gènica a través de PKC, la transcripció gènica i els ritmes circadians. També està implicada en fets relacionats amb la plasticitat sinàptica i l'apoptosi, i es pensa que regula el nombre de cèl·lules i la morfologia neuronal al cervell (Manji *et al.*, 1999; Phiel i Klein 2001; Harwood, 2005; Chuang i Manji 2007). Generalment quan la GSK3 està inhibida hi ha una disminució de l'apoptosi, i proteïnes pro-apoptòtiques com la p53 i el Bax es veuen disminuïdes mentre que proteïnes considerades anti-apoptòtiques com la Bcl-2 incrementen (**Fig. 19**). La disminució de GSK3 té efectes a llarg termini, a la funció del cervell i en el comportament animal fet que també succeeix en ratolins GSK-3 $\beta^{+/-}$ (Harwood, 2005).

El fet que la GSK3 sigui un enzim que participa en un ampli ventall de processos, requereix una regulació molt estricta. La fosforilació de determinats residus de la GSK3 poden incrementar o disminuir la seva capacitat d'unir-se al substrat. La fosforilació de la tirosina-216 en la GSK3- β o la tirosina-279 en la GSK3- α incrementen la seva activitat enzimàtica, mentre que la fosforilació de la serina-9 en la GSK3- β o de la serina-21 en la GSK3- α inhibeix la seva activitat enzimàtica. Aquesta inhibició es produeix a través de les vies de senyalització de les Wnts i dels receptors de les tirosina quinasa (RTKs) (Cohen i Goedert, 2004; Makhortova *et al.* 2011).

8.3.3.3 Efectes del liti sobre la via de senyalització Wnt (canonical wingless pathway)

Les Wnts són una família de glicoproteïnes involucrades en el desenvolupament embrionari, remodelació axonal, regulació de la proliferació cel·lular i desenvolupament de cèl·lules mare entre d'altres. En absència de les Wnt, la GSK-3 β forma un complex multiproteic amb l'axina i la proteïna *adenomatous polyposis protein* o APC; aquest complex fosforila la β -catenina, que és degradada ràpidament via ubiquitina-proteasome. La unió de les Wnts, o d'un agent mimètic com és el liti, amb el seu receptor fa que la GSK-3 β s'inactivi, evitant, així, que la β -catenina, proteïna moduladora de la dinàmica del citoesquelet, es degradi i, per tant, que es pugui translocar al nucli on participarà en la transcripció dels gens diana de Wnt (Phiel i Klein 2001). A més a més, el fet que la β -catenina quedi estabilitzada causarà una alteració de la dinàmica dels microtúbuls en els cons de creixement i incrementarà la ramificació axonal. Aquests efectes al citoesquelet apareixen a llarg termini i no tenen a veure amb

la fosforilació de la GSK, sinó que tenen a veure amb el control que exerceix la unió de Wnt amb el seu receptor, en la formació del complex multiproteic (**Fig. 18**). Un exemple el trobem en el VPA, un inhibidor d'HDAC, amb coneguda efectivitat en l'increment d'SMN (Rak *et al.*, 2009; Taula 2), s'ha vist que pot mimetitzar els efectes del liti en la via de les Wnts, incrementant així la β -catenina, però no inhibint la GSK (en aquets cas s'estabilitzaria la proteïna), aquest efecte del VPA, que podria venir de l'alteració de l'expressió gènica, sembla ser que és específic de les cèl·lules i varia en funció del desenvolupament de les mateixes cèl·lules. Per exemple, VPA no incrementa la β -catenina en les cèl·lules dels ganglis de l'arrel dorsal (DRGs) i actua de manera oposada al liti en el procés de ramificació dels axons (Harwood, 2005).

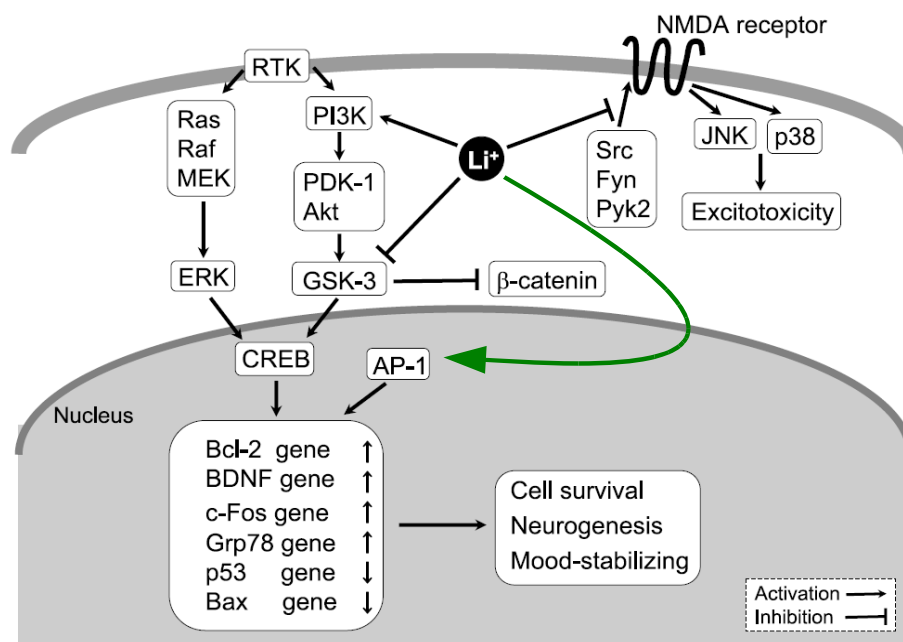


Figura 19. Mecanismes de neuroprotecció del liti: vies de senyalització. La inhibició de la GSK-3 pel liti, es pensa que és el major mecanisme de neuroprotecció induït pel liti. El liti protegeix de l'exitotoxicitat atenuant la fosforilació dels receptors de NMDA. L'activació de factors de transcripció per part del liti (p.e. CREB) potencia l'expressió de gens neuroprotectors com Bcl-2 i BDNF i *down*-regula gens pro-apoptòtics com Bax i p53. BDNF actua via PI3K-AKT i via ERK i ambdós activen CREB. Bcl-2 actua oposadament a Bax i p53, inhibint l'activació de les caspases i del citocrom c. En l'estrès de reticle, el liti atenua la sobrecàrrega de Ca^{2+} *up*-regulant AP-1 que alhora, activarà proteïnes anti-apoptòtiques i inhibirà les pro-apoptòtiques (modificació de Wada *et al.*, 2005)

8.3.3.4 Efectes neuroprotectors del liti

Diversos estudis *in vitro* han demostrat els efectes neuroprotectors del liti (a través de la síntesi de proteïnes), administrat en dosis terapèutiques: (i) davant diversos agents tòxics com altes concentracions de glutamat, en sobre-excitacions dels receptors d'NMDA, davant baixos nivells de potassi i davant dosis d'etanol (Chakraborty *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2008; Calderó *et al.*, 2010);(ii) l'efecte que té el liti en rutes de senyalització i en l'acció sobre factors de transcripció i (iii) sobretot incrementant la proteïna Bcl-2. La concentració de LiCl utilitzada en estudis sobre neurodegeneració, ha estat sempre al voltant de dosis que s'administren als pacients amb BPD, s'ha demostrat, però que amb dosis molt inferiors a les terapèutiques (0,35mmol/L en plasma), el Li ja té efectes positius de neuroprotecció (Chuang i Manji 2007, Harwood, 2005; Fornai *et al.*, 2008).

8.3.3.5 Efectes del liti sobre la família de Bcl-2 i Bax

A finals dels anys noranta, es va descobrir que el liti (igual que l'àcid valproic [VPA]) tenia efectes directes sobre la via de senyalització de la proteïna quinasa C (PKC), i que tenia efectes en la regulació de l'expressió de gens que s'expressen al SNC. L'ús de la *reverse transcription polymerase chain reaction mRNA differential display* (RT-PCR DD) va demostrar per primera vegada l'augment dels nivells de determinats mRNAs degut al liti, com és el cas del factor de transcripció PEBP2 β . PEBP2 β regula la proteïna Bcl-2 que té funcions neuroprotectores, considerada anti-apoptòtica i també relacionada amb la regulació de la mort cel·lular programada¹⁹ (PCD); de fet, davant exposicions cròniques al liti, Bcl-2 es troba incrementada. La gran família proteïnes reguladores de l'apoptosi i la PCD està formada per proteïnes protectores com la Bcl-2 i executores com Bax (**Fig. 19**; Manji *et al.*, 1999).

Bcl-2 és una proteïna localitzada a la membrana externa del mitocondri, al reticle endoplasmàtic i a la membrana nuclear i s'expressa al SNC de mamífers i rosegadors. Diversos mecanismes, tals com el segrest de pro-formes de caspases, efectes

¹⁹ La PCD és un procés altment regulat per senyals intrínsecs i extrínsecs, que regulen la mort cel·lular i l'atròfia. Sembla ser que algun d'aquests esdeveniments passen de manera patològica en processos neurodegeneratius, i la família de Bcl-2 hi juga un paper molt important.

antioxidants, efectes en l'homeòstasi del calci intracel·lular, etc., estan implicats en els efectes protectors de Bcl-2, alhora que protegeix les neurones de múltiples atacs, com radiacions, glucocorticoids, etc. Estudis en ratolins que desenvolupen l'ELA i sobre-expressen Bcl-2, la supervivència ha augmentat i la degeneració de les MNs és més atenuada. Darrerament s'han descobert dues possibles noves funcions de Bcl-2, la de promoure l'*sprouting* a les neurites i la seva intervenció en la regeneració axonal (Manji *et al.*, 1999).

8.3.3.6 Efectes del liti sobre l'exitotoxicitat pel glutamat, el kainat i l'estrès de reticle

L'activació excessiva del receptor de N-metil-D-aspartat (NMDA) per l'excés de glutamat, comporta una atròfia de l'hipocamp, fet comú en moltes malalties neurodegeneratives (Chuang i Manji, 2007). Pretractaments amb liti protegeixen les cèl·lules granulars del cerebel, entre d'altres, davant l'exitotoxicitat pel glutamat mitjançant la inhibició de l'entrada de Ca^{2+} via el receptor d'NMDA. El liti actuaria atenuant la fosforilació constitutiva de la Tyr¹⁴⁷² de la subunitat NR2B del receptor d'NMDA, provocant així una reducció de l'entrada de Ca^{2+} , fet que contribueix a l'efecte neuroprotector del liti. El glutamat activaria la via RNMDA-cjun-p38- excitotoxicitat la qual queda anul·lada davant el pretractament amb liti (**Fig. 19**) (Wada *et al.*, 2005). Dins el mateix àmbit de l'exitotoxicitat, Calderó *et al.* (2010) van demostrar, en cultius organotípics d'embrions de pollastre, que tractaments amb liti rescataven les MNs de la mort induïda pel kainat.

L'estrès de reticle va associat a una sobrecàrrega de Ca^{2+} al citoplasma. El liti atenua la sobre-càrrega de calci i *up*-regula la proteïna AP-1 que activa proteïnes anti-apoptòtiques (Bcl-2) i inhibeix les pro-apoptòtiques (Bax, i p53) (**Fig. 19**) (Wada *et al.*, 2005).

8.3.3.7 Efectes del liti sobre la regulació a l'alça del brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Les neurotrofines són molècules essencials en el desenvolupament, la diferenciació, el manteniment (amb la protecció de les neurones davant lesions cerebrals) i la plasticitat (estructural i funcional) del cervell al llarg de la vida. El

BDNF és una neurotrofina abundant en àrees del cervell amb propietats plàstiques, com p.e. l'hipocamp, l'hipotàlem i l'escorça cerebral, i regula la transmissió sinàptica. El BDNF és regulat per la mateixa activitat neuronal i és necessari i suficient per induir canvis estructurals de llarga durada a les espines dendrítiques (Tapia-Arancibia *et al.*, 2008).

El liti incrementa l'expressió i la secreció extracel·lular de BDNF, activant el seu receptor (TrkB) de forma autocrina/paracrina i seguint la via de senyalització *mitogen-activated-protein kinase* (MAPK) i *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (juntament MEK) (**Fig. 19**). Els nivells de TrkB, d'altres neurotrofines i dels seus receptors respectius, però, no incrementen. Per tant el liti actua exclusivament sobre BDNF (Wada *et al.*, 2005).

8.3.3.8 El liti i l'activació de les vies de senyalització de supervivència cel·lular

Dues vies de senyalització altament conservades al llarg de l'evolució, crucials en la formació, manteniment i reparació de la xarxa neuronal, supervivència cel·lular i longevitat són: (1) PI3K-AKT-GSK i (2) Ras-Raf1-MEK-ERK (**Fig. 18**). La desregulació d'aquestes dues vies comportaria el desenvolupament d'una malaltia neurodegenerativa.

La GSK3 està activada en cèl·lules no estimulades, actua fosforilant proteïnes senyalitzadores com la glicogen sintasa, factors de transcripció com p.e. la β -catenina, proteïnes estructurals com la tau (τ) i del factor d'inici de traducció eIF2B. L'estímul de receptors de proteïnes G o el receptor Wnt, inhibeixen GSK3. per tant la inhibició de GSK3 és crucial per a la supervivència cel·lular.

8.3.3.9 cAMP-responsive element binding protein (CREB)

CREB és un dels substrats intermedis de les vies de senyalització de supervivència cel·lular que promou la transcripció de molècules neuroprotectores, com el BDNF i Bcl-2, i té un paper important en la neuroplasticitat. El tractament de cèl·lules SH-SY5Y amb liti incrementava l'activitat de CREB. L'activitat transcripcional de CREB requereix la seva fosforilació i es regula per l'adenilat ciclase (AC), el Ca^{2+} i factors de creixement. Alhora, la GSK-3 β inhibeix CREB través d'una

segona fosforilació, per tant, la inhibició de la GSK3, mitjançant el liti, provoca un increment de l'activitat de CREB en la seva unió al DNA (Wada *et al.*, 2007). Per altra banda, l'AC és l'encarregada de transformar l'ATP en AMPc, i aquest activa la PKA, enzim que regula canals iònics, elements del citoesquelet i factors de transcripció, entre d'altres. Al SNC, la PKA actua sobre CREB promovent la transcripció de molècules neuroprotectores (**Fig. 19**). El liti, per tant, incrementa l'activitat de CREB per dues vies: a través de la inhibició de la GSK-3 β (Wada *et al.*, 2005) i de l'augment de l'activitat de l'AC (Quiroz *et al.*, 2004).

8.3.3.10 El liti i els seus efectes sobre la neurogènesi i la regeneració neuronal

Durant molt de temps es pensava que la pèrdua de neurones era un fet irreversible. Eriksson *et al.* (1998) van demostrar l'existència de neurones noves provinents de cèl·lules progenitores a l'hipocamp de cervells humans. La regulació de la neurogènesi en adults és un procés dinàmic regulat per diversos factors intrínsecs i extrínsecs. Dins els factors promotors hi trobem l'aprenentatge, l'exercici físic, diversos factors de creixement com el BDNF i l'IGF-1, NTs/hormones, CREB i antidepressius (p.e. El liti). Per altra banda, l'envelliment, l'estrès, els opiacis, l'activació dels receptors d'NMDA, els glucocorticoids i l'eix hipotalem-pituitària-adrenal, retarden la neurogènesi. El liti indueix la neurogènesi a través d'ERK i CREB, però a través d'una via de senyalització diferent a la que regula la supervivència cel·lular donat que Bcl-2 i BDNF no estan incrementades en la neurogènesi (Wada *et al.*, 2005). Per contra, la regeneració neuronal sí que està associada a un increment de Bcl-2, Huang *et al.* (2003) van observar que l'increment de Bcl-2, provocat pel liti, promovia la supervivència de les cèl·lules ganglionars de la retina en cultiu incrementant el nombre de neurites i la seva longitud.

8.3.3.10.a Mecanismes moleculars de la neurogènesi induïda pel liti

Un pas crític en la maduració neuronal és l'adquisició de la polaritat. Els mecanismes pels quals aquesta s'adquireix són desconeguts. La GSK-3 β , està regulada al llarg del desenvolupament, amb el seu pic durant l'axogènesi. La GSK-3 β és present a l'axó en creixement, però reclosa a les dendrites i al cos neuronal en les neurones

madures i al final de l'axogènesi. En estudis de cultius cel·lulars de neurones de rata que tenen una forma mutada de la GSK-3 β , que permet la seva expressió contínua, s'observa que s'inhibeix la formació de l'axó, mentre que la reducció de l'activitat de GSK-3 β dóna lloc a neurones amb diversos axons. Per tant, l'aplicació d'inhibidors de la GSK-3 β pot ser un enfocament nou per promoure la generació axonal després de danys neuronals (Wada *et al.*, 2005). Un altre mecanisme que intervé en la neurogènesi són els canals de Na⁺ voltatge depenents. Canals indispensables per a la generació i conducció dels potencials d'acció de tot tipus de neurones. Els canals de Na⁺ juguen un paper molt important en el procés de competició axonal, són essencials en l'extensió de l'axó per tal de trobar el camí per formar correctament la sinapsi neuro-efectora. Els canals de Na⁺ són proteïnes estructurals i mantenen la integritat estructural i funcional de les neurones. L'augment de l'activitat elèctrica causada per la sobre-expressió dels canals de Na⁺ acaba amb l'increment en l'expressió d'NTs inhibidors (GABA i glicina), mentre que la disminució d'aquesta expressió culmina amb l'augment d'NTs excitadors (glutamat i acetilcolina). El liti incrementa els canals de sodi i el nombre de cèl·lules amb canals de Na⁺ a la superfície cel·lular, però poc es coneix de la seva implicació en la neurogènesi (Wada *et al.*, 2005).

8.4 Efectes del liti en malalties no psiquiàtriques

El fet que la proteïna GSK3 intervingui en múltiples processos i que el liti sigui el seu inhibidor “universal” ha propiciat que s'hagi estudiat les seves implicacions en diversos tipus de malalties. No obstant, cal anar amb compte a l'hora d'utilitzar els inhibidors de la GSK donat que són potencialment oncogènics; p.e., la GSK fosforila els prot-oncogens c-jun i c-myc. La inhibició de la GSK portaria a la seva desfosforilació, provocant la seva activació/acumulació.

8.3.1 Alzheimer i taupaties

Les malalties neurodegeneratives més comunes es caracteritzen per la presència d'inclusions proteïques anormals en les cèl·lules nervioses del cervell. En el cas de l'Alzheimer (AD) i les taupaties, aquestes inclusions estan formades per la proteïna Tau (τ), que està associada als microtúbuls, i per dipòsits extracel·lulars del pèptid β -

amilode (producte de la proteïna precursora amiloide [APP]) en l'AD (Cohen i Goedert, 2004). La implicació de la GSK3 en la malaltia de l'Alzheimer té lloc a través de dues vies diferents: primer, la inhibició de la GSK-3 β fa que hi hagi una disminució de la fosforilació de la proteïna tau, proteïna que en el cas de l'Alzheimer es troba hiperfosforilada; per tant, la inhibició de GSK-3 β propiciaria una disminució de la τ fosforilada, millorant així la seva unió als microtúbuls; en cultius de neurones humanes (NT2N) promou també l'assemblatge dels microtúbuls. En segon lloc, se sap que les proteïnes precursors de la β -amilode A4 (APP) i la presinilina-1 estan mutades en casos d'Alzheimer familiar; aquestes mutacions provoquen un increment de la producció de la proteïna β -amilode o de la seva agregació, produint citotoxicitat i incrementant l'activitat de la GSK-3 β (Cohen i Goedert, 2004; Manji *et al.*, 1999; Wada *et al.*, 2005). La presinilina-1, al contrari que la β -amilode, té la característica d'estabilitzar la β -catenina quan s'uneix a ella evitant, així, que es degradi. La GSK-3 β forma part del procés de degradació de la β -catenina, amb la qual cosa, si s'inhibeix la GSK-3 β podem disminuir la degradació de la β -catenina reduint així l'apoptosi de les neurones afectades (Manji *et al.*, 1999). L'ús del liti en l'AD: (1) disminueix els nivells dels pèptids de β -amilode al cervell, evitant els efectes citotòxics i la desestabilització de la β -catenina a través de la inhibició de la GSK-3 β i, (2) redueix la fosforilació de τ , tant en cèl·lules neuronals com no neuronals possiblement a través de la inhibició de GSK3, però cal tenir en compte que altres proteïnes com les MAP quinases també participen en la fosforilació de τ .

En les taupaties, és important tenir en compte que la inhibició indiscriminada de la GSK3, pot comportar que la ratio (1:1 en cervells no patològics) de les diferents isoformes de τ s'alteri donant lloc a l'efecte advers de demència i neurodegeneració causats per aquesta desproporció (Cohen i Goedert, 2004).

8.3.2 Diabetis

La diabetis és la malaltia més comuna del metabolisme, amb múltiples complicacions si no es tracta correctament. Una causa de la malaltia és la incapacitat de secretar insulina. La diabetis tipus 2, majoritàriament, es tracta amb metformina, un component derivat del lilà, i tot i que redueix els nivells de glucosa en sang, té poca potència i té efectes secundaris; la metformina no activa les vies de senyalització de la

insulina, per tant, no s'eviten els efectes de la diabetis a llarg termini. La via de senyalització de la insulina és la PI3K-PKB-GSK3; en conseqüència, inhibidors de la GSK3 podrien tenir efectes positius en la diabetis, donat que podrien mimetitzar la capacitat que té la insulina de promoure la conversió de la glucosa en glicogen. El liti, un inhibidor de la GSK3 és capaç d'activar la glicogen sintasa i per tan estimular la síntesi de glicogen al múscul (Cohen i Goedert, 2004).

8.3.3 Malaltia de Huntington

La malaltia de Huntington, és una malaltia neurodegenerativa que afecta els ganglis basals del cervell. És d'herència autosòmica dominant i en cas d'heretar-la, l'aparició de la malaltia s'avança de generació en generació. La causa de la malaltia és un increment de còpies del triplet CAG a l'extrem amino-terminal de la proteïna huntingtina, fet que provoca la formació d'agregats. La inhibició de la GSK3 a través del liti confereix una protecció de les cèl·lules davant la formació dels agregats i de la mort, incrementant Bcl-2 i β -catenina; Alhora, el liti promou la proliferació de les cèl·lules progenitores neuronals i astroglials (Cohen i Goedert, 2004; Wada *et al.*, 2005).

8.3.4 La síndrome del fràgil X

La síndrome del fràgil X, és una malaltia hereditària lligada al cromosoma X, per tant, d'afectació només masculina, que cursa amb un retard mental, hiperactivitat, autisme i característiques facials peculiars entre d'altres. Tal i com passa en la malaltia de Huntington, la seva causa es deu a una expansió anòmala d'un trinucleòtid: CGG, que causa una inactivació del gen *fragil X mental retardation (FMR1)*. La manca de la proteïna FMR (FMRP), que és una proteïna reguladora negativa de la traducció, causa un augment molt elevat de la síntesi proteica al cervell. La inactivació de la GSK a través del liti, modula la síntesi proteica millorant els símptomes dels pacients amb fràgil X (Liu *et al.*, 2010).

8.3.5 L'ELA

L'ELA, és una malaltia neurodegenerativa de la qual no hi ha cura, és de curs ràpid i amb un fatal desenllaç. Cursa amb una degeneració de les MNs de la medul·la espinal, del cervell i de l'ecorça motora. Tot i que es desconeix la causa de la malaltia, és bastant probable que l'agregació proteica, l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial, l'exotoxicitat causada pel glutamat i reaccions neuroimmunològiques puguin tenir a veure amb la degeneració de les MNs (Bareito *et al.*, 2010). Fornai *et al.* (2007), recorrent als efectes neuroprotectors que confereix el liti, van demostrar que la inhibició de la mono-inositol-fosfatasa 1 (promotora de l'autofagia) a través del liti, podia causar efectes positius en la malaltia, tals com el retard en la progressió de la disfunció motora en pacients humans. I en ratolins G93A, el liti provoca: a) una disminució de la gliosi reactiva; b) manteniment del nombre de MNs i de la seva mida en la ME i al nucli ambigu; c) disminució dels agregats de la proteïna SOD1; i d) recuperació dels mitocondris a la ME en ratolins G93A. Dissortadament, Gill *et al.* (2009) i Pizzasegola *et al.* (2009) han obtingut resultats totalment oposats als de Fornai.

8.3.6 Liti en AME

Makhortova *et al.* (2012), en un complex estudi per tal de trobar possibles dianes terapèutiques per l'AME, van descobrir que la inhibició de la GSK-3 β a través de la cascada de senyalització per PDGF (PDGF-PI3K-AKT), determinava un increment considerable dels nivells d'SMN. És més en cèl·lules on la GSK havia estat *down-regulada*, els nivells d'SMN incrementaven; per tant, GSK3 quinasa és un regulador molecular d'SMN. Per determinar si la via de PI3K-AKT és la que regula en major part SMN van utilitzar inhibidors en la cascada d'actuació de PDGF i van veure que l'ús d'antagonistes de PI3K tenia efectes inhibitoris sobre SMN, confirmant així la importància de la via PI3K-AKT sobre SMN. GSK3 fosforila SMN i la fa adequada per a la seva degradació. En resum, la inhibició de GSK3 estabilitza la proteïna SMN. No obstant, no totes les cèl·lules expressen els mateixos receptors; per exemple, PDGFR és molt abundant als fibroblats i molt poc a les MNs. Per tant, compostos com l'alsterpaullona que *in vitro* són capaços de rescatar MNs amb baixos nivells d'SMN actuen a través d'altres vies. La GSK3 és un enzim sotmès a diverses vies de regulació, i

no totes tenen a veure amb la SMN. Per exemple, quan s'inhibeix ERK i p38 l'efecte sobre SMN és escàs. A l'apartat de resultats d'aquesta tesi, hem deixat reflectits els nostres experiments amb liti en un model animal d'AME.

Taula 2. Resum dels diferents tipus de possibles tractaments per l'AME

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SMAD7 hSMA fibroblasts	Bortezomib (Btz)	Inhibition ubiquitination	Ip, 0,15mg/Kg, P5 every other day (EOD) Dose test	RR improved NMJ size ↑	ChAT ↑	SMN protein ↑ (except CNS)	≈	Kwon, DY 2011
SMAD7	Bortezomib + TSA	Inhibition ubiquitination + inhibition HDAC	Ip, 0,075mg/Kg Btz EOD + 4mg/Kg TSA daily P5	Weight gain better response compared to them alone	better response compared to them alone	SMN protein ↑	↑ 6 days	Kwon, DY 2011
SMAD7 hSMA types I and III	TSA	inhibition HDAC	IP, 10mg/Kg, P5 daily	RR, ambulation, forelimb grip strength improvement NMJ ↑ Myofiber diameter ↑	AHC size ↑ ChAT ↑	↑ SMN transcription activating SMN2 and promote exon7 inclusion	↑ 19%	Avila, AM 2007 (11)
Fibroblasts from SMA type I SMA type II SMA type III Patients type II and III	Phenylbutyrate (PB)	inhibition HDAC	500mg/Kg/d	N/A	N/A	↑ types II and III 400% ↑ type I 160% ↑ fl-SMN	N/A	Andreassi, C 2003 Brahe, C 2005
SMA type I mouse cell line NSCs and primary embryonic mouse fibroblasts	Valproic acid (VPA)	inhibition HDAC	100μM in presence of BDNF and CNTF	N/A	≈ axonal elongation, growth cone size and excitability	↑ SMN protein in NSCs and MN	↓ survival in isolated SpC Mns	Rak, K 2009

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SMA-like type I Taiwanese SMA model	Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	inhibition HDAC	200mg/Kg/d from E15 water+solvent 25mg/Kg/2xd feeding needle	↑ newborn ↑ weight gain ↑ motor abilities (TT) ↑ muscle fibers size Recovery NMJs	 ↑ MN counts and size	 ↑SMN expression SpC, muscle, liver and brain	↑ survival 4 days ↑ 30,3%	Riessland, M 2010 (7)
SMA-like type II and III (Taiwanese SMA model) SMA type 1 pregnant mothers	Sodium butyrate (SB)	inhibition HDAC	Ad libitum in water, 4-80mg/day for 1-12 weeks, start after diagnosis (not specified) <i>Ad libitum</i> in water 4-80mg/day star E15	No muscular atrophy in tail lessens severity SMA type 1 pups	Increase SMN in MNs	↑fl-SMN mRNA transcripts	Type II ↑ 4-5 days	Chang, JG 2001
SMA-like mouse embryonic fibroblasts SMA patient lymphocytes	Stat5 inducers TSA, SB, Sodium Vanadate, Aclarubicin and Hydroxyurea	Increase SMN2 expression	10nM, 25mM, 50/100 μM, 80nM and 100-500μM/mL	N/A	Neurite outgrowth, axon extension, ↑ gems ↑ cells with gems, gems/cell	↑ SMN ↑ SMN	N/A	Ting, CH 2007 (1)

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
fibroblasts from SMA patients: both INFs induce SMN expression	Interferons type I (β) and type II (γ)	increases SMN protein by inducing SMN and SMN2 gene expression	1000U/mL	N/A	N/A	both INFs \uparrow SMN expression	N/A	Baron-Delage, S 2000
SMAD7 SMAD7 pregnant mother with posterior pups administration	2,4-diaminoquinazoline derivatives a)D152344 b)D153249 c)D156844	Increase SMN promoter activity	30mg/Kg/d a) and b) 3mg/Kg/d c) from P4 3mg/Kg/d from E11	Improves motor phenotype delay body weight loss	Prevents mNs loss	c) light increase of SMN protein	\uparrow 21% \uparrow 30%	Butchbach, MER 2009
SMA-like severe $Smn^{-/-};SMN2^{tg/+}$ Taiwanese model	ASO-10-27	Gene therapy Correct SMN exon7 splicing	ICV 1 shot P1 20 μ g SC 2 shots P0+P3 50 μ g/g both both +2 more shots of SC P5+P7 P0, P3 SC dose dependent (40, 80, 160 μ g/g)	Full motor recovery Rotaroad, muscle strength and HomeCageScan (160 μ g/g) muscle fiber area improved in 80% (160) restoration of NMJs	\uparrow gems \downarrow MN loss (160)	\uparrow CNS \uparrow SNC + peripheral tissues especially in liver \uparrow dose-dependant	\uparrow 6 days \uparrow 108 days \uparrow 173 days \uparrow 137 days \uparrow 84, 170, 248 days	Hua, Y 2011 (2)

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SMA type I cell line modified with SV40 SMA type I original cell line NSC34 a MN-like cell line	Aclarubicin	Anthracycline antibiotics. Promotes the incorporation of exon7 mainly in SMN2, by increasing the expression of TFs	10nM per 4000cells/cm ² , efectos remain after drug removal	N/A	↑ gems	fl-SMN restoration fl-SMN restoration fl-SMN restoration	N/A	Andreassi, C 2001 (13)
SMA type 1	ASO Trans-Splicing RNA vector (ts-RNA)	Gene therapy	ICV 1 shot P1	Low penetrance of ts-RNA no weight gain	N/A	↑ SMN levels ↑snRNP assembly	↑ 70%	Coady, TH 2010
SMN2;D7;Cre_ER;Ssmn ^{Res/+} SMN2;D7;Ssmn ^{Res/+}	Inducible Ssmn rescue allele with TM	Gene therapy SMN restoration	1 shot 75mg/Kg TM P4 early Ssmn restore, correlates with better phenotypic rescue	↑ RR, Rotaroad, grip strength and open-field ↑ body weight Slight recovery NMJ pathology ↑ NMJ size	↓ MN loss ↑ gems/MN ↑ AChR ↓NF agregates	↑ SMN-mediated snRNP assembly in CNS and peripheral tissues	↑50%	Lutz, CM 2011 (3)
C57l/6 (WT/WT animals)	AAV Self complementary (scAAV9)	Gene therapy SMN restoration through AAV9 SpC transduction	1 injection IV facial vein P1 4e11 scAAV9 particles	N/A	Expression restricted to MNs and astrocytes, few in peripheral tissues	N/A	N/A	Foust, KD 2009 (8)

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
Fibroblasts from SMA Type I patient SMAD7	Lentivector	Gene therapy SMN restoration through lentiviral gene transfer system (lentivector)	Bilaterally at GN (30µL each), diaph (20µL each), IC (10µL each), facial (10µL each), ling (5µL each) P2 Single injection, multiple sites	N/A 2-3 days delay i weight loss and motor skills	Up to 7 gems/cell Gem ↑ Facial and lumbar MNs ↑	SMN Restoration SMN restored in about 70% MNs and brain ↑ SMN muscle	N/A ↑ survival 3-5 days more	Azzouz, M 2004
SMAD7	scAAV9	Gene therapy SMN restoration through AAV9-SMN	1 injection IV facial vein P1 5e11 scAAV9 genomes	↑ RR normal ambulation ↑ body weight EPC not fully restored ↓NF accumulation	N/A	↑ Brain, SpC and quadriceps	↑ survival >250 days	Foust, KD 2010 (9)
SMAD7	scAAV	Gene therapy SMN restoration through AAV8-hSMN	1 injection ICV and SpC P0 5e10 genome copies	↑ myofiber size ↑ NMJ architecture ↑ arborization compared to WTD7 ↓ NF accumulation ↑ Motor function ↑ body weight	↑ MNs and gem-like structures Modest preservation of MNs	↑ SpC, in neurites and a subset of MNs ↑ SMN in muscle	↑ survival >50 days	Passini, MA 2010

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SMAD7 NT2 cells	Prolactin, works via STAT5 pathway	Hormone cell cycle related functions as a growth-, differentiating- and anti-apoptotic. Cytokine-like etc..	Ip, 2,5mg/Kg/d from P1 25-50ng/mL	Improves body weight and RR	N/A	↑ SMN mRNA and SMN protein in CNS less increase in muscle	↑ 70%	Farooq, F 2011
SMAD7 crossed with mice overexpressing mIGF-1	IGF-1	Hormone essential in muscle development, induces muscle regeneration promoting proliferation of Satellite cells. Might have NT effects on MNs	N/A	↑ muscle mass no amelioration of motor function	N/A	≈	↑ 40% Improves when combined with TSA (8mg/Kg/d)	Bosch-Marcé, M 2011
SMAD7	Ceftriaxone	β-lactam antibiotic, clear the glutamate increasing the expression of excitatory aa transporte 2 in astrocytes	Ip, 200mg/Kg/d from P5	Slight improve of weight Good improvement in RR, tube test and hind-limb ↑ diameter and number of myofibers ↑ NMJs size	↓ loss of MNs ↑ MNs diameter	↑ fl-SMN ↓ SMND7	↑ 4 days (32,78%)	Nizzardo, M 2011 (4)

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SMAD7	Follistatin	Inhibition several TGF- β (i.e: myostatin). SMN-independent treatment that enhances eskeletal muscle	Ip a)0,75mg/Kg 2xd b)1mg/Kg EOD c)10mg/Kg EOD	RR and ambulation improvement in a) and b) \uparrow muscle mass	MN counts \uparrow AHC area \uparrow ChAT \uparrow	No effect	\uparrow 4.6 days in b) \approx a) and c)	Rose, FF 2008 (5)
SMAD7 In vitro analysis in SMA MNs	NSC Stem cell trasplantation		Intratechal in the cerebrospinal fluid injection of primed ALDH ^{hi} SSC ^{lo} 20 000 cells P1	Slight weight recovery Improvement of ambulation and gait security (grip assay and open field) \uparrow number and myofiber diameter, muscle area and NMJ diameter	Generation of neurons and MNs in the parenchyma \uparrow ChAT + cells \uparrow MN size and number \uparrow axon length and growth cone area \approx dendrite outgrowth	N/A	\uparrow 5 days \approx survival	Corti, S 2008 (6)
SMAD7	ES- NSC and OSG-ES trasplantation	MN replacement	Cerebrospinal fluid 20 000 cells P1.	Slight weight recovery \uparrow grip strength \uparrow muscle area and myofiber number	\uparrow MN number \uparrow MN diameter	N/A	\uparrow 7-8 days	Corti, S 2009

INTRODUCCIÓ

Model animal/cell cultures	Agent	Mechanism of action	Dosage, route of administration and age	Therapeutic effect	Effect on pathology MNs	Effect on SMN	Live span	References
SpC explant culture Sciatic nerve transection in rats Facial MN death induced in mice pups	Pleiotropin (PTN) application of hrecPTN	NT factor	HrecPTN 100ng/mL HEK-293 ^{PTN} 80-100ng/mL	N/A	Motor axons outgrowth Regeneration myelinated axons Rescue of facialMNs in mouse with HEK-293 ^{PTN} transplant	N/A	N/A	Mi, R 2007 (10)
SMA-like type II Taiwanese model	Exercise training	neuroprotection	N/A	↑ muscular phenotype	↑MN survival	↑ splicing correction	N/A	Grondard, C 2005
SMA type I SMN ^{-/-} ;hSMN2 ^{+/+} SMA-like type II Taiwanese model	NMDA receptor activation	Neuroprotection ↑ SMN2 expression	Intrathecally 5pmol/g NMDA (100μM) P1 P8	N/A Accelerates muscle and NMJ maturation ↑motor skills	N/A ↑ MN survival	↑ SMN in SpC transcriptional ↑ SMN in SpC posttranscriptional	↑ survival 6 days ↑ survival 20 days	Biondi, O 2010 (12)

INTRODUCCIÓ

- (1) when Stat5 is knocked down SMN2 expression might be downregulated except for vanadate, thus vanadate induces both transcriptional activation and alternative splicing
- (2) IGF-1 is a potent NTF, essential for the development and the regeneration of the muscle inducing the satellite cells proliferation. SMA newborn mice have reduced levels of the IGF binding protein mRNA, this levels are rescued after ASO treatment
- (3) SMA created mouse exons 7 and 8 from Smn mouse gene were replaced for exons 7 and 8 from hSMN2. An inverted copy of Smn exon 7 was placed in the intron between exons 7 and 8. Cre-ER is a tamoxifen (TM) inducible allele. SMN2:D7;Cre_ER;Smn^{Res/Res} are similar to SMAD7
- (4) Ceftriaxone exerts a neuroprotective effect on SMA SpC via GLT1
- (5) follistatin treatment ameliorates SMA phenotype in part by preserving or maintaining the neuronal circuitry
- (6) ALDH^{hi}SSC^{lo} cells were isolated from SpC neurospheres and primed before the injection
- (7) Taiwanese SMA model develops severe SMA with a mean survival of 10 days
- (8) Transgene expression stable over the time.
- (9) EPC (End plate currents) it is determined by the number of synaptic vesicles released after nerve stimulation (quantal content) and the amplitude of the muscle response to the transmitter release from a single vesicle.
- (10) New treatment tool
- (11) TSA promotes muscle maturation rather than regeneration (myogenin and MyHC increase)
- (12) The different way of increasing SMN protein is different in the two models, probably because the SMN2 transgene used in each mouse model may be slightly different. Or due to the different time that NMDA was injected (P1 or P8)
- (13) As it is a chemotherapeutic drug it is not suitable for young SMA patients

V HIPÒTESI I OBJECTIUS

L'atròfia muscular espinal és una malaltia neuromuscular d'origen genètic i que afecta a la població infantil. La seva causa és la deleció, en la majoria dels casos, o mutació del gen survival motor neuron (SMN). Des dels seus inicis s'ha considerat que la causa principal de la malaltia era la mort de les motoneurons α , situades a la banya ventral de la medul·la espinal. Recentment, però la implicació del múscul com a causa principal s'ha començat a discutir, diferents grups han trobat alteracions en les unions neuromusculars prèvies a la mort de la MN. Nosaltres hem volgut aprofundir en la caracterització dels defectes al múscul i més en concret a les unions neuromusculars, per tal de trobar algun indici sobre la possible implicació del múscul en l'AME. A part hem plantejat la hipòtesi de si el liti, que es dóna com a tractament en pacients psiquiàtrics que pateixen trastorns bipolars, i que recentment ha aparegut com a possible tractament per l'esclerosi lateral amiotròfica (Fornai *et al*, 2008), té efectes terapèutics en l'AME.

Objectius:

- 1- Caracterització del fenotip, la supervivència de dos models murins transgènics i els canvis en la medul·la espinal, micròglia i astròglia del model agut d'AME
- 2- Caracterització de la complexitat de les unions neuromusculars en dos models de ratolins transgènics. Estudi dels marcadors presinàptics implicats en l'estructura vesicular i l'ancoratge de les vesícules a la membrana presinàptica, estudi dels canals de calci en diversos músculs i edats.
- 3- Caracterització dels canvis ultraestructurals, estudi de l'apoptosi i morfometria del múscul en el model murí agut d'atròfia muscular espinal (SMN^{-/-};hSMN2^{+/+}).
- 4- Caracterització de l'estat dels macròfags i de dos òrgans del sistema immunitari en dos models d'atròfia muscular espinal.
- 5- Determinar si el liti, un potent i efectiu catió en desordres psiquiàtrics com el trastorn bipolar. Implicat en la inhibició d'enzims multifuncionals com la GSK-3 β , i

amb efectes neuroprotectors, produeix alguna millora en un model murí d'atòfia muscular espinal.

VI MATERIALS I MÈTODES

9 LLISTAT DE PRODUCTES

PRODUCTE	CASA COMERCIAL
ABC (Vectastain)	Vector
Acetat de sodi	Sigma
Acetat d'urani	Panreac
Àcid acètic	Panreac
Àcid cítric	Serva
Àcid clorhídric	Sharlab
Àcid periòdic	Sigma
Àcid pícric	Merck
Acrilamida	BioRad
Agarosa	CONDA
Etanol absolut	Riedel de Hæn
Azida	Flucka
Blau de toluidina	Merck
β -mercaptoetanol	Sigma
Carbó actiu	Sigma
Citrat sòdic	merck
Cloroform	Sigma
Clorur de Liti 8M	Sigma
Clorur de potassi	Panreac
Clorur de sodi	Sigma
Coomasie brilliant blue	Flucka
DABCO	Sigma
DAPI	Sigma
Dc protein assay	Biorad
Diaminobencidina (DBA)	Sigma
DNA kit d'extracció (The REDExtract-N-AmpTMTissue PCR kit)	Sigma
DPX	Panreac
EDTA	Sigma

Eosina amarillenta	Panreac
Eter dietílic	Panreac
Eucaliptol	Panreac
Formaldehid	Panreac
Fosfat disòdic	Merck
Fosfat monosòdic	Merck
Fucsina bàsica	Sigma
Gelatina	Prolabo
Glicerina	Merck
Glicina	Serva
Glicerol	Sigma
Glutaraldehid 25%	EM Sciences
HANKS' balanced salt (HBSS)	Sigma
Hematoxilina de Harris	Gurr
Hidroxi de sodi 1N	Panreac
Iodat de sodi	Merk
Isopropanol	Sigma
Llet en pols	Asturiana
Membrana de transferència de PVDF	Immobilon TM-P, Millipore
Metabisulfit de sodi o potassi	Merk
Metanol	Scharlau
Metilbutà	Panreac
Mowiol	Calbidochem
Nadic metil anhidre (NMA)	Aname
Normal goat serum	Gibco
Normal horse serum	Gibco
Oligonucleòtids (seqüències de)	Sigma-Aldrich
Tetròxid d'osmi	EM Sciences
Òxid de mercuri	Merck
Òxid de propilè	Baker
Paper de filtre (Blotting paper GB0059)	Acefesa
Parafina	Panreac
Paraformaldehid	Flucka
Peròxid d'hidrogen	Panreac

Persulfat d'amoni	Sigma
Reïnes inclusió Embed-812	EM Sciences
"Running buffer"	Biorad
Serum boví fetal (FCS)	Gibco
Dodecil sulfat sòdic (SDS)	Serva
Sucrosa	Panreac
Sulfat d'alumini i potassi	Merck
Sulfat de crom i potassi	Merck
"Supersignal Chemiluminescence detection kit"	Pierce
SYBR safe	Molecular Probes
Sylgar	Down Corning (Wiesbaden Alemanya)
Tattoo paste	Fine Sciences Tools
TEMED	Sigma
Timol, cristalls	Merck
Tionina	Merck
"Tissue Freezer medium" (TFM)	Triangle Biomedical Sciences
Tragacanto (goma de)	Merck
Tripan blue	Sigma
Tris base	Serva
Tritó X-100	Sigma
Tunel (In Situ Cell Death Detection Kit;POD)	Roche
Tween 20	Sigma
Violeta de Cresil	Merck
Xilè	Scharlau

10 Llistat d'anticossos

10.1 Anticossos primaris

Anticòs/marcador	Funció	Casa comercial	Dilució
α -bungarotoxina AlexaFluor-488 / 647	Receptors d'acetilcolina postsinàptics	Molecular probes	1/500
Bassoon	Proteïna de bastida de la membrana presinàptica, implicada en el cicle de les vesícules sinàptiques	Synptic Systems	1/200
Calcium channel * ($\alpha_{1\beta}$ subunit) $Ca_v2.2$	Són mitjancers de l'entrada dels ions de Ca^{2+} dins la cèl·lula i desencadena l'alliberació de neurotransmissors o d'hormones	Sigma	1/100
Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP)	Potent vasodilatador que té diversos efectes tant al sistema nerviós com no nerviós	Sigma	1/1000
Cleaved caspase-3	Detecta les cèl·lules que es sotmeten a processos d'apoptosi	Cell Tehnology	Signaling 1/250
Cystein String Protein (CSP)	Xaperona. Proteïna de les vesícules sinàptiques implicada en l'alliberació de neurotransmissors desencadenada pel Ca^{2+} . Interacciona amb les proteïnes SNARE com VAMP 2, VAMP 7 i syntaxina 4. Durant l'endocitosi, participa, juntament amb Hsp70, en el procés d' <i>uncoating</i> de les vesícules recobertes de clatrina	Chemicon	1/1000
Glial fibrillary acidic protein GFAP	Proteïna que s'utilitza com a marcador dels astròcits del sistema nerviós central dels vertebrats	Abcam	1/1000

Glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β)	GSK3. és una proteïna activa en moltes vies de senyalització intracel·lulars, com la proliferació cel·lular, migració, inflamació i respostes immunitàries, regulació de la glucosa i apoptosi. La GSK3 generalment inhibeix les seves proteïnes diana per fosforilació	BD Bioesciences	1/2500
Glicogen sintasa quinasa 3 β fosforilada (p-GSK-3 β)	Forma inhibida de la GSK-3 β	Cell Signaling	1/1000
Ionized Calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1)	Proteïna d'unió al calci específica de la micròglia	Wako	1/500
MCP-1 (monocyte chemotactic protein mouse specific)	Reclutament dels monòcits cap a les zones danyades o infectades	Cell Signaling Technology	1/1000
Munc-13	Implicada en l'encebat de les vesícules sinàptiques	Synaptic Systems	1/500
Munc-18	Proteïna de membrana implicada en l'ancoratge i fusió de les vesícules	Synaptic Systems	1/1000
Neurofilament 160kDa (NF)	Proteïna del citoesquelet neuronal	Chemicon	1/500
NF-68kDa	Proteïna del citoesquelet neuronal	Abcam	1/1000
Pax7*	Marcador de les cèl·lules satèl·lit	Hybridoma bank	1/100
Piccolo	Proteïna de bastida per les proteïnes implicades en l'endo- i l'exocitosi de les vesícules sinàptiques	Synaptic Systems	1/200

Rab3aA	Proteïna d'unió al GTP; al cervell és la proteïna rab majoritària i molt abundant a les vesícules sinàptiques	Synaptic Systems	1/200
Rabphilin 3A	Proteïna, de les vesícules sinàptiques, sensora del Ca^{2+} dependent del Rab3	Synaptic Systems	1/500
RIM (Rab3 interacting molecule)	Proteïna presinàptica de la zona activa que regula l'alliberació de neurotransmissors desencadenat pel Ca^{2+} . És una proteïna efectora del Rab3 a les zones actives	Synaptic Systems	1/500
Survival motoneuron (SMN)	Proteïna d'expressió ubiqua amb múltiples funcions	BD Biosciences	1/100
Synaptic vesicle protein 2 (SV2)	Proteïna present a totes les vesícules sinàptiques, probablement implicada en el manteniment del <i>pool</i> de vesícules sinàptiques competents per a l'exocitosi estimulada pel calci	Hybridoma bank	1/1000
Synaptobrevin-1 (VAMP-1)	Proteïna majoritària de les vesícules sinàptiques implicada en la fusió	Synaptic Systems	1/1000
Synaptophysin (SyPhys)	Proteïna vesicular estructural més abundant, implicada en l'endocitosi de les vesícules sinàptiques	Dako	1/100
Synaptotagmin-1 (SyTg)	Proteïna de les vesícules sinàptiques sensora del Ca^{2+} ; desencadena l'alliberació dels neurotransmissors	Synaptic Systems	1/100

Vesicular acetylcholine transporter (VAChT)	Proteïna de membrana de les vesícules sinàptiques que transporta l'acetilcolina	Synaptic Systems	1/1000
Laminin-2		Sigma	2µg/mL

* N2 frozen. Origen dels anticossos: mouse, chicken, rabbit, rat.

10.2 Anticossos secundaris

Cy3 anti-rabbit	Jackson immunoresearch	1/500
Cy5 anti-rabbit	Jackson immunoresearch	1/500
Anti-rabbit biotinylated	Vector laboratories	1/500
ECL TM anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase	Amersham	1/4000

Els estudis que es presenten en aquesta tesi han estat fets en dos models animals d'AME comprats a The Jackson laboratory (www.jax.org): SMA tipus 1, FVB.Cg-Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1^{tm1Msd}/J* (número d'estoc 005024) i SMAdelta7, FVB.Cg-Tg(SMN2*delta7)4299Ahmb Tg(SMN2)89Ahmb *Smn1^{tm1Msd}/J* (número d'estoc 005025). La formació de les colònies ha estat curosament controlada i els ratolins han estat alimentats *ad libitum*. Tots els experiments han estat aprovats pel Comitè d'atenció i ús d'animals de la Universitat de Lleida, sota la normativa de la Generalitat de Catalunya (DOGC 2073, 1995) i s'han fet evitant al màxim el patiment dels animals.

11 GENOTIPAT SMA tipus I i SMA delta 7

Objectiu de la tècnica i mostres utilitzades

Els animals s'identifiquen a través d'un marcatge amb tinta de tatuatge a les extremitats, i amb un trocet de cua dels ratolins, generalment de P0, es determina el genotip de l'animal, és a dir si és heterozigot ($mSmn^{+/-};hSMN2^{+/+}$) o homozigot per SMA ($mSmn^{-/-};hSMN2^{+/+}$) o homozigot per WT ($mSmn^{+/+};hSMN2^{+/+}$) en el cas dels SMA tipus 1; i ($mSmn^{+/-};hSMN2^{+/+};hSMN\Delta7^{+/+}$) per als heterozigots o ($mSmn^{-/-};hSMN2^{+/+};hSMN\Delta7^{+/+}$) pels homozigots SMA Δ 7 i ($mSmn^{+/+};hSMN2^{+/+};hSMN\Delta7^{+/+}$) pels homozigots WT Δ 7.

Els animals WT han estat utilitzats com a control dels experiments i els heterozigots (HET) han servit per a mantenir la colònia. La nomenclatura utilitzada en tota la tesi, però més concretament en l'apartat de resultats ha estat:

- Per als SMA tipus I: SMAT1 (en cas dels homozigots SMA) i WTT1 (en cas dels homozigots WT)

- SMA Δ 7 o tipus II: SMA Δ 7 (en cas dels homozigots SMA) i WT Δ 7 (en cas dels homozigots WT)

Solucions

- Primers 5'-3' comprats a Sigma-Aldrich (són els mateixos tan per SMA tipus I com per SMAΔ7):

WT F ctccgggatattgggattg 300 i 400pb

SMA R ggtaacgccagggtttcc 300pb

WT R tttcttctggctgtgccttt 400pb

- The REDExtract-N-AmpTMTissue PCR kit (Kit d'extracció de DNA) de Sigma-Aldrich, conté el necessari per a l'extracció del DNA i els reactius per a la PCR (a punt per utilitzar):

Quantitat per mostra per l'extracció del DNA:

12,5mL de tissue prep

37,5mL d'extract solution

50mL de neutralizer

Quantitat per mostra de la barreja de PCR:

3,15mL dH₂O

1,2mL de primer forward (100mM)

0,6mL de primer WT reverse (100mM)

0,4mL de primer SMA reverse (20mM)

4,65mL de Red (proporcionat pel kit d'extracció)

- TAE 1x: 20mL de TAE 50x en 1L de dH₂O

- Agarosa 1x: 1g d'agarosa en 100mL de TAE 1x

* EDTA 0,5M 9,306g EDTA, 30mL dH₂O₂, ajustar el pH amb NaOH enrasar a 50mL

* TAE 50x per 1L: 242g tris base, 57,1 ac acètic glacial (afegir al final), 100mL 0,5M EDTA (pH8), H₂O miliQ, filtrar la solució.

Procediment

- S'afegeixen 50mL de la barreja de tissue prep d'extract solution es barreja bé i es deixen 10 min a temperatura ambient.
- Posar les mostres 3 min a 95°C
- Neutralitzar amb 50mL de neutralizer i es barreja bé.
- Per cada 10mL de barreja de PCR s'afegeixen 2mL de DNA.
- Es posen les mostres al termociclador seguint el següent protocol:

- 1) 94°C 5 min
- 2) 94°C 30 segons (seg)
- 3) 62°C 1 min
- 4) 72°C 1 min
- 5) 72°C 2 min
- 6) 4°C infinit

Del pas 2 al 5 es repeteix 35 vegades

- Còrrer el gel d'agarosa a l'1% i SYBR safe (1:10000) durant 30 min
- Veure el resultat al trans il·luminador

Problemes i solucions

Al començament de genotipar els animals hi va haver problemes en els resultat de la PCR. La banda superior dels heterozigots (que designa el WT) pràcticament no es veia i es van haver d'ajustar les concentracions, és per això que els primers de WT forward i WT reverse s'utilitzen a concentracions de 100µM.

12 DISSECCIÓ I PROCESSAMENT DE LES MOSTRES*Solucions*

- Paraformaldehid (PFA) 4% (es prepara en calent, sense sobrepassar els 80°C): 40g PFA, 300-400ml dH₂O, 1-2 lleties NaOH, quan es torna transparent afegir 500mL de tampó fosfat 0.2M, un cop fred ajustar pH a 7,4, filtrar i guardar a la nevera.

- Tampó fosfat salí (phosphate buffer saline (PBS)) 1x: 100mL PBS 10x, 10L de dH₂O.
- Sucrosa 30%, azida 0,02%: Tampó fosfat 0.1M, 300g sucrosa, 1mL azida al 20%.
- Porta objectes amb gelatina: 1,5g gelatina dissolts en 300mL de dH₂O; escalfar i afegir 0.15g sulfat potàssic cròmic i homogeneïtzar. Submergir els portes 5min en l'homogenat i assecar a 60°C.
- Tissue Freezer Medium (TFM).
- Fixador de Carnoy: 60% etanol, 30% cloroform, i 10% àcid acètic glacial.
- Fixador de Bouin: àcid pícric 600mL, 200mL formaldehid i 40mL àcid acètic.
- Metilbutà.

* Tampó fosfat: 53,39g/1500mL dH₂O de di-sodi hidrogen fosfat dihidrat, 13,79g Sodi fosfat monobàsic monohidrat pH=7,4.

* PBS 10x: 175,2g NaCl, 4g KCL enrasar amb 1000mL de TF 0.2M pH 7.4.

* Azida sòdica 0,2g azida, TF 0,2M.

Procediment

Els ratolins utilitzats comprenien les edats: d'estat embrionari 18 dies (E18) (comptant com a dia embrionari 1 (E1) el dia en què es veia el plug positiu) fins a 15 dies post-natals (P15). Els ratolins han estat sacrificats per decapitació o dislocació dels ossos de la nuca. S'ha clavats els animals en plaques de Petri cobertes amb Sylgard i les mostres s'han disseccionat immerses en solució Hanks.

Seguidament es procedeix a la dissecció de:

- Músculs *Levator auris longus* (LAL) (**Fig. 20A**), diafragma (diaph) i *Transversus abdominis* (TVA) (**Fig. 20B**), músculs plans els quals seran fixats 1h en PFA 4%, posteriorment submergits en PBS 1x. S'ha fet un parell de canvis amb PBS 1x i s'han congelat fins a ser usats per a la tècnica de whole mount (veure apartat 3.3 de materials i mètodes).

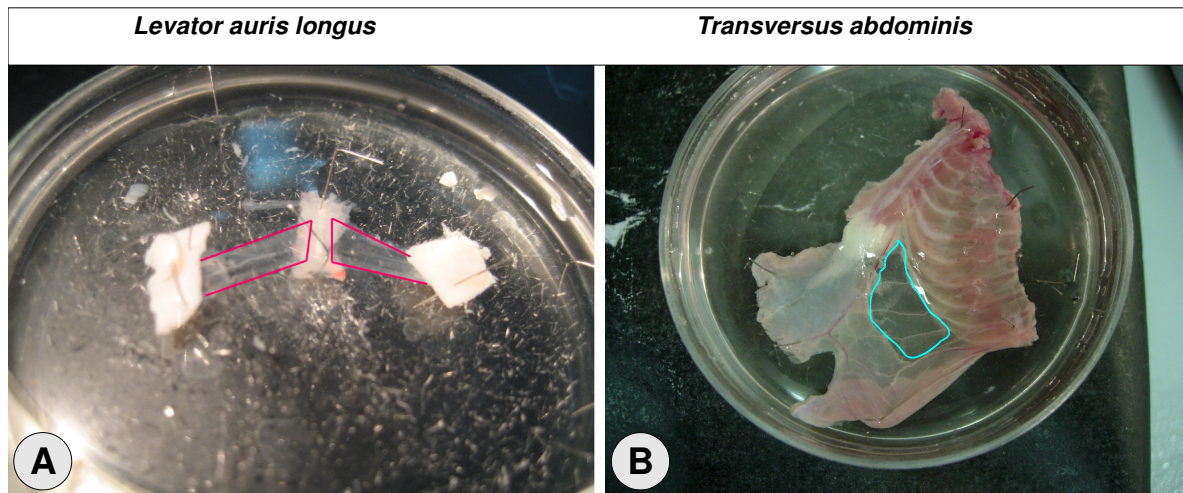


Figura 20. Imatges dels dos músculs plans utilitzats per a l'estudi de les unions neuro-musculars en la seva totalitat. (A) *Levator auris longus* (LAL) emmarcar en rosa i (B) *Transversus abdominis* emmarcar en blau cian.

- Músculs *Tibialis anterior* (TA), *Extensor digitalis longus* (EDL), *Gastrocnemius* (GN), *Soleus* (SOL), *Lingual* (Ling), *Intercostalis* (IC), *Sternomastoid* (StM). Aquests músculs han estat disseccionats i submergits de 4-6h a 24h en PFA 4% en funció de l'anticòs a utilitzar. Posteriorment s'han crioprotegit amb sucrosa al 30% durant 24h, s'han inclòs en TFM i tallat al criostat a 16µm. En determinats casos s'han congelat directament crioprotegint-los amb metilbutà refredat per N₂ líquid, o bé submergit directament en N₂ líquid per a western blot.
- Medul.la espinal (ME). En funció de l'experiment les MEs s'han processat igual que els músculs, fixant-les en PFA 4%, o en Carnoy per a talls de parafina.
- Timus, melsa, fetge, ronyó i cor, s'han fixat en PFA 4%.

13 MÈTODES DE TINCIÓ CLÀSSICA

Objectiu de la tècnica i mostres utilitzades

En determinades ocasions s'ha fet us dels mètodes de tinció clàssics per tal d'identificar estructures. Les tincions dutes a terme han estat l'hematoxilina-eosina, tinció PAS i la tinció amb violeta de cresil. Les mostres utilitzades han estat bàsicament la ME, els músculs i els ronyons.

Solucions

- Hematoxilina de Harris

6g H; 0,6g iodat de sodi; 52,8g sulfat d'alumini; 250mL d'etilè-glicol; 60mL d'àcid acètic glacial i 690mL de dH₂O

- Eosina 1%

1g eosina en 100mL de dH₂O.

13.1 Tinció hematoxilina-eosina

La tinció d'hematoxilina-eosina (H-E) és un dels mètodes de tinció més utilitzats en histologia. El mètode es base en la tinció amb hematoxilina que tenyeix les estructures àcides donant un color blau-porpra; seguida de la tinció amb eosina que tenyeix les estructures bàsiques en tons rosa-ataronjats.

Procediment

- Submergir els portes en hematoxilina durant 5min
- Virar el color durant 5min amb H₂O de l'aixeta
- Submergir en eosina durant 5min
- Rentar amb dH₂O
- Fer un rentat ràpid amb etanol absolut
- Procedir en el procés de deshidratació passant per alcohols creixents de 70° a 100° (10min/pas)
- Submergir primer amb xilè i posteriorment amb xilè eucaliptol
- Muntar amb DPX

13.2 Tinció amb violeta de Cresil

Tinció genenralment utilitzada per tenyir el sistema nerviós central, és un colorant acidòfil que tenyeix el nucli cel·lular i el reticle endoplàsmic rugós (substància de Nissl).

Solucions

- Violeta de cresil 1%

1g de violeta de cresil i 100mL de dH₂O. Abans d'utilitzar afegir 15 gotes d'àcid cètic glacial al 10% i filtrar.

Procediment

- Rentar les preparacions amb (1-3 min)
- Tinció amb violeta de cresil al 1% (5-10 min)
- Rentar amb dH₂O (1 min)
- Diferenciació en alcohol-acètic (etanol 70% amb àcid acètic) (~ 15 segundos)
- Procedir en el procés de deshidratació passant per alcohols creixents de 70° a 100° (10min/pas)
- Submergir primer amb xilè i posteriorment amb xilè eucaliptol
- Muntar amb DPX

13.3 Tinció PAS

Tinció amb àcid periòdic i el reactiu de Schiff. Aquest tipus de tinció es caracteritza per tenyir carbohidrats i macromolècules riques en carbohidrats. S'usa per detectar el glicogen en els diferents tipus cel·lulars i tissulars.

La reacció química es produeix quan l'àcid periòdic trenca la unió dels anells de les hexoses i de les hexosamines amb els seus carbois adjacents, per formar grups aldehids; quan el reactiu de Schiff reacciona amb els aldehids es desprèn el color porpra característic. Aquesta tinció és una alternativa a les tècniques d'impregnació argèntica.

Solucions

- Àcid periòdic al 0,5%

0,5g d'àcid periòdic en 100mL de dH₂O

- Reactiu de Schiff

1g de fucsina bàsica en 200mL de dH₂O bullint, remenar i deixar refredar; filtrar i afegir 10mL d'àcid clorhídric; esperar 10min i afegir 1g de metabisulfít de sodi o de potassi, 2g de carbó actiu, remenar (1min) i filtrar mentre es remena

- Aigua sulfurosa

10mL d'àcid clorhídric; 10mL de solució al 10% de bisulfít de sodi i afegir dH₂O fins als 100mL

- Hematoxilina de Harris

Procediment

- Desparafinar els talls

xilol 2x 5min

- Hidratació

- etOH 100° 3 min

- etOH 96% 3min

- etOH 70% 3min

- dH₂O 5min

- Tinció

- Solució aquosa d'àcido periòdico al 0,5% 5-10 min

- dH₂O 3 min

- Reactiu de Schiff 15-20 min

- Rentar en aigua sulfurosa acabada de preparar

- Rentar amb aigua de l'aixeta

- Solució d'hematoxilina de Hansen 3 min

- Procedir en el procés de deshidratació passant per alcohols creixents de 70° a 100° (10min/pas)

- Submergir primer amb xilè i posteriorment amb xilè eucaliptol

- Muntar amb DPX

14 TÈCNiques IMMUNOCITOQUÍMIQUES**14.1 Immunocitoquímica en seccions de criostat per a fluorescència***Objectiu de la tècnica i mostres utilitzades*

Detecció de diferents marcadors en mostres de teixit tallades al criostat a través de la reacció antígen-anticòs que es posa de manifest amb un anticòs secundari fluorescent. Per exemple, en el cas dels músculs, els anticòs primaris utilitzats reconeixen la maquinària pre-sinàptica, per tant, per poder analitzar els resultats i tenir valors objectius s'ha marcat l'aparell post-sinàptic amb l' α -Bungarotoxina (α -Bgtx) conjugada amb Alexa-flour 488.

Solucions

- PBS 1x.
- PBS-Tritó 0,1%: 1L PBS 1x, 1mL tritó.
- Normal goat Serum (NGS).
- Glicerol/PBS (1:1).
- Mowiol: 19,2g mowiol, 48mL dH₂O₂, 37,2mL glicerol, 96mL tris-HCl 0,2M pH8,5.
Preparar a 50°C, centrifugar 7000 r.p.m. 20-30min, decantar i afegir el dabco 0,1%.
Reservar a -20°C.
- 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) utilitzat a 50ng/mL.

Procediment

- Deixar assecar les preparacions.
- Incubació de les seccions en PBS-Tritó 0,1x durant 50min per permeabilitzar les mostres i rentar 10min amb PBS 1x.
- Incubació amb NGS al 10% en PBS 1x durant 1h.
- Incubació tota la nit amb l'anticòs primari en cambra humida a 4°C.
- Rentar 2x10 min en PBS-Tritó 0,1%.
- Rentar 1x10 min en PBS 1x.
- Incubar amb l'anticòs secundari, DAPI i en el cas dels músculs també amb l' α - Bgtx Alexa-fluor 488, 1h a temperatura ambient.
- Rentar 3x10 min amb PBS 1x.
- Muntar amb mowiol o glicerol al 30%.
- Observació al microscopi d'epifluorescència Olympus BX51 i captura d'imatges al microscopi confocal Fluoview 500 d' Olympus.

11.4.2 Immunocitoquímica en seccions de criostat per a marcatge amb peroxidassa

Objectiu de la tècnica i mostres utilitzades

L'ús del marcatge per Diaminobencidina (DAB) ens permet mantenir les preparacions tenyides sense que perdin la immunoreactivitat i l'anàlisi sota el microscopi òptic convencional. Aquesta tècnica s'ha per a determinar la caspasa 3 activa a múscul i per veure la diferència en la densitat de macròfags en múscul, melsa i fetge amb l'ús del marcador Iba-1.

Solucions

- PBS 1x.
 - NGS.
 - Tractament amb peroxidassa: 3mL de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) al 30% en 100mL de PBS 1x.
 - Reactiu ABC de Vectastain: 10mL A + 10mL B + 980 mL PBS (deixar a la foscor) 250mL de PBS.
 - Solució de revelat amb DAB: 2,5 mL de la solució de DAB (en estoc 24mg/mL), 80µL d'H₂O₂ al 30%.
 - Glicerol 50%.
- *DAB estoc: **3gr** de DAB en 120 ml d'H₂O

Procediment

- Deixar assecar les preparacions.
- Incubació de les seccions en H₂O₂ 1% durant 1h.
- Rentar amb PBS-Tritó 2x10min i rentat amb PBS1x 10min.
- Incubar amb NGS al 10% en PBS1x durant 1h.
- Incubar tota la nit amb l'anticòs primari en cambra humida a 4°C.
- Rentar 2x10 min en PBS-Tritó 0,1% i un rentat amb PBS 1x.

- Incubar amb l'anticòs secundari biotinilat 1h a temperatura ambient.
- Rentar 3x10 min amb PBS 1x.
- Incubar amb el reactiu ABC Vectastain durant 1h a temperatura ambient.
- Rentats 3x10 min amb PBS 1X.
- Revelat de 6 a 20 min amb DAB.
- Rentats 3x10 min amb PBS 1x.
- Muntar amb glicerol al 30%.
- Observació i captura d'imatges al microscopi

En el cas que es vulguin muntar amb DPX cal un procés de deshidratació (de a) a g) 10min per condició):

- Etanol 70°
- Etanol 96° I
- Etanol 96° II
- Etanol 100° I
- Etanol 100° II
- Xilè I
- Xilè/eucaliptol
- Muntar amb DPX

14.3 Whole mount

Objectius de la tècnica i mostres utilitzades

Immunohistoquímica del múscul sencer com el Diaf i dels músculs plans LAL i TVA en microplaques no tractades de 24 pous (Iwaki). Amb el Whole mount podem marcar la placa motora en la seva totalitat i ens permet estudiar més objectivament i obtenir una imatge real de les unions neuromusculars.

Solucions

- PBS 1x.
- PBS tween 0,02%: 200µL tween, 1L PBS.
- NHS 20% tritó 0,4%: 8mL NHS, 160µL tritó en 40mL PBS 1x. Reservar a -20°C.
- Glicerol 50%.

Procediment

- Rentats 3x10 min amb PBS 1x.
- Bloqueig amb NGS 20% tritó 0,4% al llarg d'un matí.
- Incubar amb l'anticòs primari preparat amb NGS 20% i tritó 0,4% durant 2 nits. en moviment a 4°C.

- Rentats amb PBS tween 0,02% al llarg del matí.
- Incubació amb l'anticòs secundari i la α -Bgtx-AlexaFluor 488 tota la nit en moviment a 4°C .

- Rentats amb PBS tween 0,02% al llarg del matí i un rentat amb PBS 1x.
- Muntar amb glicerol al 50%.
- Observació al microscopi d'epifluorescència Olympus BX51 i captura d'imatges al microscopi confocal Fluoview 500 d' Olympus.

14.4 Marcatge TUNEL*Objectius de la tècnica i mostres utilitzades*

El mètode Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) ens permet detectar les cèl·lules que moren pel procés d'apoptosi. S'ha utilitzat en seccions de criostat dels músculs IC i TA.

Solucions

- Solució de bloqueig: 3% H₂O₂ en 90mL de Metanol (MeOH) Solució de permeabilització: 0,1g citrat en 100mL dH₂O i 100mL de tritó.
- TUNEL mixture de Roche: treure 100mL de label solution (vial 2) per 2 controls negatius-- afegir els 50ml de l'Enzyme solution (vial 1) als 450 ml restants del label solution i barrejar bé.
- Substrat DAB.

Procediment

- Rentat de les mostres amb PBS 1x 30min a temperatura ambient.
- Incuació amb solució de bloqueig 10min a temperatur ambient.
- Rentar 10 min amb PBS 1x.
- Incubació de les mostres amb la solució de permeabilització 30min a temperatura ambient (en el cas de mostres delicades la permeabilització es farà només amb tritó).
- Rentats 2x10min amb PBS 1x.
- Afegir 50mL de TUNEL reaction mixture i posar una capa de parafilm a sobre; incubació en cambra humida 1h a 37°C.
- Rentats 3x10min amb PBS 1x.
- Afegir 50mL de Converter-POD (vial 3) sobre del porta i tapar amb una capa de parafilm; incubació en cambra humida 30min a 37°C.
- Rentats 3x10min amb PBS 1x.
- Afegir 50-100mL de substrat DAB; incubació 10min a temperatura ambient.
- Rentats 3x10min amb PBS 1x.
- Muntar amb glicerol o bé DPX.
- Observació i captura d'imatges al microscopi Olympus BX 50 equipat amb una càmera Nixon DXM 1200.

14.5 Morfometria*Objectius de la tècnica i mostres utilitzades*

Per tal de poder calcular l'àrea de les fibres musculars del TA, les potes s'han disseccionat i congelat directament per preservar al màxim possible les propietats morfològiques intactes.

Solucions

- Tragacanto dissolt en H₂O miliQ. Afegir tragacanto a l' H₂O miliQ fins a tenir una massa pastosa; afegir 1 gra de timol a la barreja.
- Metilbutà.
- N₂ líquid.

Procediment

- Posar la pota en posició vertical en un cercle de suro a on prèviament hi hem posat el tragacanto.
- Submergir la peça en metilbutà dins d'un vas de precipitats subergit en N₂ líquid.
- Un cop el tragacanto ha solidificat posar la peça dins de N₂ líquid.
- Tallar al criostat (Leica) a 16µm.
- Un cop assecada la mostra procedir a la tinció amb la lectina wheat germ aglutinin (WGA) conjugada amb Alexa-flúor 488 o amb un anticòs anti-laminina (25µg/mL):
 - (1) Fixar la mostra amb etOH i 5% d'àcid acètic.
 - (2) Rentar 3x10 min amb PBS 1x.
 - (3) Incubar amb NGS 1h.
 - (4) Incubació amb l'anticòs anti- laminina o WGA (en aquest cas saltar-se el pas 3).
 - (5) Rentar i muntar.
- Capturar imatges del TA al microscopi confocal Olympus Fluoview 500 i analitzar l'àrea de les fibres amb el programa Visilog.

Problemes i solucions

En les tècniques immunocito/histoquímiques el principal problema que ens podem trobar és que l'anticòs no funcioni, és a dir que no ens doni senyal o que el senyal que dona sigui molt feble. En aquest cas el primer que es pot fer és reduir el temps de fixació. Se sap que temps llargs de fixació poden fer alterar l'antigen causant que l'anticòs a utilitzar no el pugui reconèixer el seu antigen. Es pot també permeabilitzar més la mostra amb tractaments que en alguns casos poden ser agressius pel teixit (veure apartat 3.6). Donat que les motres que s'utilitzen són de ratolí, l'ús d'anticòs monoclonals obtinguts en ratolins pot portar problemes de background a l'utilitzar un anticòs secundari contra ratolí; es pot intentar evitar el background amb l'ús de l'affinipure Fab Fragment goat anti-mouse IgG.

14.6 Tractament de les mostres en el microones per a immunocitoquímica

Objectius de la tècnica

Aquesta tècnica és per posar al descobert antigens que han quedat tapats per la fixació o bé pel processament previ del teixit.

Solucions

Tampó A: àcid cítric 2.1g en 100mL dH₂O pH=6

Tampó B: Citrat sòdic 2.94g en 100mL dH₂O pH=6

Tampó C: 9mL tampó A, 41mL tampó B en 500mL dH₂O

Procediment de permeabilització

- Posar les mostres en una cubeta que conté tampó C.
- Introduir la cubeta al microones juntament amb dues cubetes més amb 250 mL dH₂O.
- Posar el microones a 450 wats (90°C aproximadament) durant 15min i deixar refredar.
- Rentar les mostres amb PBS 1x 10 min i començar el procediment de la immuno directament amb el bloqueig amb NGS.

15 RECOMPTE DE MOTONEURONES

Objectius de la tècnica i mostres utilitzades

L'objectiu de la tècnica és quantificar el nombre de motoneurons lumbar en els nostres models animals. Les mostres utilitzades són medul·les espinals de ratolins E18, P0/1 i P5/6 de SMA tipus 1 i E18, P0/1, P7/8 i P13/15 de ratolins SMAΔ7.

Solucions

- Fixador Carnoy per a la ME de ratolins d'edats E18-P5/6.
- Fixador Bouin per a la ME de ratolins més grans de P6 (el fixador Bouin té propietats descalcificadores).

- Parafina líquida.
- Violeta de cresil (13.2)
- Albúmina de Mayer: batre 2 clares d'ou a punt de neu i deixar-ho a la nevera durant 24h. Decantar l'albúmina, afegir el mateix volum de glicerina i cristalls de timol. Guardar a la nevera.
- Etanol.
- Xilè.
- Xilè-eucaliptol (1:1).

Procediment

- Disseccionar i fixar les MEs amb el fixador adequat, 24-48h si és fixador Carnoy i 15 dies si en el cas d'utilitzar el fixador Bouin.
 - Submergir les medul·les en OH 70° (Si el fixador ha estat el bouin fer uns quants rentats amb OH 70° per tal d'eliminar al màxim l'àcid pícric).
 - Deshidratar amb alcohols de graduació creixent i després submergir les mostres en xilè.
 - Submergir en parafina líquida 4-6h.
 - Muntar els blocs de parafina, un cop freds guardar a la nevera.
 - Tallar al micròtom (Reichert-Jung) a 8µm les MEs d'E18, a 12µm les MEs de P0-8, i a 14µm les MEs de P10-P15
- i muntar les mostres sobre portaobjectes amb albúmina de Mayer.
- Deixar assecar els porta-objectes a 60°C 1-2 dies.
 - Tenyir amb violeta de cresil.
 - Hidratació de la mostra:

- xilè 3x10min
- etOH 100° 2x5min
- etOH 96° 2x5min
- etOH 60° 1x5min
- 1 bany dH₂O

- Tinció amb violeta de cresil.
- Renatat amb dH₂O.

- Deshidratació.

- etOH 70° 1min
- etOH 96° 2min
- etOH 100° 5min
- xilè 1x10min
- xilè-eucaliptol 10min

- Muntatge amb DPX.

El recompte de les MNs de la banya ventral l'hem fet cada 10 seccions segons els criteris de Clarke i Oppenheim, 1995:

* Reconeixement de les neurones: 1) són un tipus cel·lular gran; 2) tenen un patró de tinció característic degut a l'abundància de la substància de Nissl, que correspon al reticle endoplasmàtic rugós; i 3) tenen un nucli molt gran que no queda tenyit (blanc) però amb un nuclèol molt prominent i tenyit com el citoplasma.

* Recompte del nombre de MNs, aparentment sanes: els criteris han estat 1) la presència d'un soma gran; 2) nucli fàcil d'identificar i amb la membrana nuclear intacta i 3) la presència d'almenys un nuclèol gran. Amb aquests criteris no és necessari aplicar factors de correcció per evitar comptar la mateixa cèl·lula dues vegades (Clarke i Oppenheim, 1995).

El nombre total de MNs s'ha calculat multiplicant per 10 el nombre de MNs obtingut en el recompte.

Problemes i solucions

Els problemes més greus que ens podem trobar és que la mostra no hagi estat ben fixada, o que la parafina líquida no hagi penetrat bé i ens impedirà tenir talls correctes, en cap dels dos casos hi ha res a fer. Un altre problema és que el procés de deshidratació no s'hagi fet correctament, ens n'adonarem perquè al passar de l'OH 100° al xilè, el xilè es tornarà tèrbol, en aquest cas cal fer el procés a l'inversa i repetir la deshidratació canviant els alcohols que podien estar en concentracions no adequades.

16 WESTERN BLOT

Objectius de la tècnica i mostres utilitzades

L'objectiu de la tècnica és la quantificació de proteïnes a diferents teixits, per tal de determinar si hi ha diferències entre els diferents teixits analitzats i entre els animals WT i els SMA. Les mostres utilitzades han estat extractes de medul·la espinal i de múscul intercostal i de la pota. En el cas del múscul de la pota, donat que els animals eren petits, s'ha agafat tota la musculatura sense diferenciar el TA dels altres.

Solucions

Tampó homegeneïtzador:

- Tampó 4xSR: 8% SDS en Tris HCl pH=6.8 0.5M
- Tampó 1xSR: 2% SDS en Tris HCl pH=6.8 1.125mM
- Inhibidor de proteases comercial de Roche

Tampó de càrrega:

- Tampó 4xSS: sucrosa 20% + 0.02% d blau de bromofenol
- Tampó 2xSSR (1:1 4xSS:4xSR) + 2% de β -mercaptoetanol

Tampó de transferència: Biorad

Tampons neteja i bloqueig:

- TBST:

Solució estoc	Per 1000mL finals	Concentració final
Tris-HCl pH8	10 mL	20 mM
NaCl 2,5M	50 mL	0,125 M
Tween 20	1 mL	0,10%
dH ₂ O	939mL	

- Tampó B:

Solució estoc	Per 50 mL finals	Concentració final
Molico (llet en pols desnatada)	2,5 g	5,00%
TBST	50 mL	

- Tampó I:

Solució estoc	Per 100 mL finals	Concentració final
Tampó B	5 mL	0,25% molico
TBST	95 mL	

- Dc protein assay per mostra (x3): 25 µL de la barreja: 500 µL reactiu A + 10 µL reactiu S*, 200 µL de reactiu B, 3 µL mostra.

Deixar 15 min a temperatura ambient.

*En el nostre cas com que les mostres ja porten SDS no cal posar el reactiu S

El reactiu A és: Solució alcalina de coure i tartrat

El reactiu B és: Reactiu de Folin diluit

- Gels d'acrilamida (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

Solució estoc	Gel separador 10% per 10mL
Acilamida/bis 30%	3,34 mL
Tris 1.5M pH 8,9	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfat amoni 10%	80 µL
H ₂ O	3,96 mL
TEMED	5 µL

Solució estoc	Gel empilador 5% per 6mL
Acrilamida/bis 30%	1 mL
Tris 0,5M pH 6,5	1,5mL
SDS 10%	60 µL
Persulfat amoni 10%	40 µL
H ₂ O	3,4 mL
TEMED	5 µL

- Solució de tinció de membrana: 25% isopropanol, 10% àcid acètic, 0,1% Coomassie R-250 en dH₂O.
- Solució de decoloració de membrana: 10% isopropanol, 10% àcid acètic.
- Membrana de transferència de PVDF i retalls de paper de filtre (Blotting paper GB005).

Procediment

A- Homogenat i l'extracció de proteïnes

- Pre-escalfar el tampó 1xSR a 100°C 1min abans d'homogeneïtzar les mostres (750 µL H₂O mQ + 250 µL 1xSR).
- Afegir un volum aproximat de 50 a 200µL en funció de la mostra. Escalfar la mostra de tant en tant per tal de facilitar el procés. Les mostres de múscul s'han homogeneïtzat utilitzant l'ultra-Turrax T8 homogenizer (IKA Labor Technik).
- Deixar 5 min a 100°C.
- Centrifugar els homogenats durant 5-10 min i recuperar-ne els sobrenedants (si la mostra queda mucosa sonicar 10 seg).
- Quantificar la proteïna pel mètode de Folin-Lowry (Lowry et al, 1951) amb el "Dc protein assay" sobre una placa d'ELISA.
- Calcular la concentració de proteïna a través d'un control positiu.

B- Preparació de la mostra per carregar al gel d'acrilamida

Totes les mostres es preparen a la mateixa concentració de proteïna de 15µg, s'afegeix el tampó de càrrega 4xSS i un 2% de β-mercaptoethanol. És carreguen 20 µL per pou.

C- Transferència a membranes PVDF

- Mullar la membrana amb metanol i rentar ràpidament amb aigua.
- Mullar la membrana amb el tampó de transferència 5 min mínim.
- Preparar el "sandwich" per la transferència de sota a sobre:
 - 2 papers de filtre mullats amb el tampó de transferència.
 - membrana de transferència (PVDF).
 - 2 papers de filtre mullats amb el tampó de transferència.
- Aplicar 22V 6 mA/cm² per membrana 1h en l'aparell d'electrotransferència continu en semi-sec (Bio-Rad).

D- Detecció

- Bloquejar la membrana amb 40 mL de tampó B, a temperatura ambient i en agitació.
- Rentats amb TBST: 1x 15 min i 2x 5 min.
- Incubació en 25 mL de tampó I i l'anticòs primari, tota la nit a 4°C i en agitació.
- Rentats amb TBST: 1x 15min i 1x 5 min.
- Rentat amb tampó I 10 min.
- Incubació en 25 mL de tampó I i l'anticòs secundari 30 min.
- Rentats amb TBST: 1x 15 min, 1x 10 min i 3x 5 min.
- Incubació amb Supersignal Chemiluminescence detection kit (0,5 mL de cada solució) 5 min.
- Exposició 2-5 minuts al Lumi.
- Repetir els passos 2-8 per al control de l'actina o tubulina (en el cas que el pes molecular del primari sigui molt semblant a l'actina o a la tubulina cal fer el procés de l'stripping).

E- Stripping (opcional però recomenable)

- Rentats de la membrana amb TBST (0,05% Tween) 10 min i en agitació.
- Incubació 30 min a 57°C amb la solució de stripping:

10 g SDS + 3,93 g TRIS en 500 mL d'H₂O miliQ (afegir 7,8 µL de β-mercaptoethanol per cada mL del preparat)

- Rentats de la membrana amb TBST (0,05% Tween) 10 min en agitació.
- Reiniciar el procés del protocol de WB pel nou anticòs.

F- Tinció de la membrana

- Col·locar les membranes en solució de tinció 3min a temperatura ambient i en moviment.
- Es contrasta amb la solució de decolorarió i es deixa assecar.

Problemes i solucions

Cal anar en compte a l'hora de carregar el gel d'acrilamida, evitar que no salti extracte d'un pou al pou veí. Tenir molta cura a la transferència i assegurar-se que no queden bombolles entre la membrana i el gel.

17 MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

Objectius de la tècnica i mostres utilitzades

Aquesta tècnica va destinada a estudiar la ultraestructura de mostres de múscul de ratolins SMATI i SMAΔ7 en edats post-natals (P0/1-P5/6) i pre-natals (E18), per tal d'identificar canvis primerencs i quan la malaltia està molt avançada, tant en les fibres musculars com en les unions neuromusculars.

Solucions

- Tampó de fixació: Gluteraldehid 1%, PFA 1%, TF 0.1M pH 7,4 1h a 4°C.
- Medi Hank's.
- Acetat de sodi 0,1M.
- Acetat d'Uranil 0,1M.
- Preparació de la resina mare.

Producte	Quantitat
Embed-812	20 mL
DDSA (dodecenil subsinic anhidre)	16 mL
NMA (nadic methyl anhidre)	8 mL
DMP-30	800µL

Procediment

- Fixació mostres en fred i a 4°C (sota campana):

- 1.1 Fixar amb tampó de fixació i reservar 1h a la nevera.
- 1.2 Canviar a tampó fosfat 0,1M.
- 1.3 Rentats amb tampó fosfat 3x10 min.
- 1.4 Immersió en tetròxid d'Osmi 1% 2h.
- 1.5 Rentats amb acetat de sodi 0,1M 2x2min.
- 1.6 Immersió en acetat d'uranil aquós 0,5% 30min.
- 1.7 Rentats amb acetat sodi 0,1M 2x2min.

- Deshidratació (fred 4°C sota campana):

- 2.1 etanol 30% 30min.
- 2.2 etanol 50% 30min.
- 2.3 etanol 70% 30min (o tota la nit).
- 2.4 etanol 96% 30min.
- 2.5 etanol 100% 30min.
- 2.6 òxid de propilè 2x30min.

- Infiltració amb resina (temperatura ambient i agitació):

- 3.1 Resina al 50% 1h.
- 3.2 Resina al 75% tota la nit.
- 3.3 Resina total 2x1h.

- Polimerització de la resina total a 60°C durant 48h i obtenció dels blocs amb la mostra inclosa.

- Obtenició de seccions semifines (0,5-1 μm de gruix).
- Tinció amb blau de toluidina i observació dels semifins al microscopi òptic per tal d'identificar una zona que ens interessi.
- Obtenició de seccions ultrafines (70-90 nm de gruix) amb l'ultramicrotom (Ultracut) sobre reixetes de coure.
- Contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom.
- Observació al microscopi electrònic (Zeiss EM 910).

18 TRACTAMENT AMB LITI

El tractament amb liti s'ha fet en ratolins SMA Δ 7 i per determinar la corba de litèmia i possible toxicitat s'ha utilitzat ratolins Wild-type CD1 d'edats compreses entre P1 i P16.

Solucions

Clorur de Liti 8M \rightarrow solucions estoc:

1mEq: 1,25mL de LiCl en 10mL Sèrum Fisiològic 0,9%.

2mEq: 2,5mL en 10mL SS 0.9%.

3mEq: 3,75mL LiCl en 10mL SS 0.9%.

Sèrum fisiològic 0,9% estèril: 9g NaCl en 1000mL dH₂O.

18.1 Corba de litèmia en ratolins CD1

Les concentracions de liti utilitzades han estat de 1, 2 i 3mEq/Kg i s'ha extret mostres a les 6h, 12h, 24h, 3d, 7d i 10d post injecció. S'ha decapitat l'animal i el sagnat ha estat recollit en un eppendorf. Es deixa coagular la sang unes 4 hores per posterior centrifugació i extracció del sèrum que es congelarà fins a la lectura dels nivells de liti.

Les mostres de sèrum s'han enviat als Laboratoris Echevarne per tal de determinar la concentració de liti en sang (el sèrum pot romandre congelat fins a l'anàlisi). En funció d'aquesta corba (veure resultats) s'ha aplicat una dosi diària de 1mEq/Kg i de 2mEq/Kg a ratolins SMA Δ 7 i WT Δ 7 com a controls.

18.2 Procediment d'injecció del LiCl i sèrum fisiològic

S'ha dividit els animals en 4 grups, WTΔ7 i SMAΔ7 control, que se'ls hi ha injectat sèrum fisiològic i WTΔ7 i SMAΔ7 liti, que se'ls hi ha injectat 1 o 2mEq de liti. L'administració s'ha fet amb xeringues d'insulina i amb una agulla de 30G (és el tipus més fi que es troba al mercat). L'administració es fa per via subcutània a l'alçada de les vèrtebres dorsals. En ser els ratolins tant petits (1.5g a P1) és bastant fàcil que a l'injectar surti una mica de líquid, per tal d'evitar-ho, l'agulla s'ha introduït poc troç i amb l'escaire mirant cap amunt. Donat el baix pes dels animals i per tal de poder administrar un volum mínim, la solució d'estoc s'ha diluït 1/50 per a ratolins amb un pes que comprèn de 3,5-4g, i 1/30 per a ratolins amb un pes superior a 3,5-4g. La fórmula d'injecció és: pes animal * 50 = volum d'injecció.

Els animals alhora s'han dividit en tres grups: (a) per a l'estudi de la corba de supervivència, (b) per a l'extracció de mostres a P8 i (c) per a l'extracció de mostres en edats terminals (P11-13).

18.3 Proves de comportament

Les proves de comportament s'han fet a dies alterns seguint els procediments descrits per El-Khodori *et al.*(2008). El registre de pes s'ha fet diàriament.

18.3.1 Righting reflex

Els animals es situen, en una superfície plana, d'esquena a terra. Es registra el temps que els ratolins triguen a posar-se de 4 potes dins d'un marge de 30 segons. Es considera la prova per acabada quan els 4 peus estan correctament situats per començar a caminar. Edat d'evaluació: a partir de P1.

Observacions

És una prova molt fiable i objectiva.

18.3.2 Hind-Limb Suspension test (HLST) o tube test

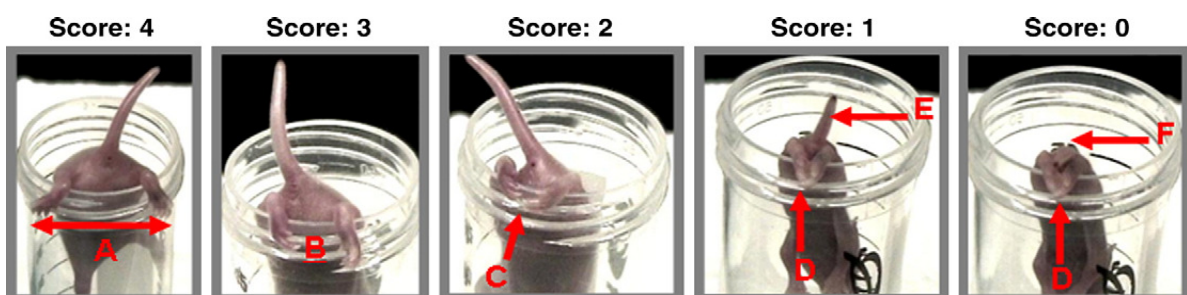
Test desenvolupat per PsychoGenics Inc. Valora la funció motora en animals recent nascuts, mitjançant l'avaluació de la força, debilitat (feblesa) i fatiga dels músculs proximals de les potes del darrera en neonats. També avalua la funció neuromuscular, la força dels músculs del cos i la postura. El test, generalment es fa en dues parts.

Es posa l'animal dins d'un tub de 50ml (amb una bola de cotó al fons) cara avall dins i amb les potes del darrera penjant. Es deixa els animals 60 segons de marge.

Edat d'evaluació: des de P2 a P12.

Paràmetres a evaluar:

- 1- Temps que tarda a caure.
- 2- Nombre de vegades que l'animal empeny per sortir del tub.
- 3- Hind-limb score (HLS), avalua la posició de la cua i les potes en els primers 10-15seg, el criteri d'avaluació és:



El-Khodor *et al.*(2008)

Puntuació 4: Separació normal de les cames i la cua totalment aixecada.

Puntuació 3: Malgrat la petita debilitat que es denota, les potes tenen una lleugera inclinació cap a un costat però no arriben a tocar-se. La cua es manté en estat erecte.

Puntuació 2: Els peus estan més propers i sovint es toquen, la cua, generalment està una mica caiguda.

Puntuació 1: Les potes es toquen gairebé sempre. La cua es manté en la diagonal formant un angle d'uns 45° amb el cos.

Puntuació 0: Les potes es toquen permanentment, una recull l'altre. La cua està totalment plana. Els animals en aquest punt tenen prolemes per aguantar-se i no caure.

Obsevacions

El HLS és una prova fiable, malgrat té un cert punt de subjectivitat. Jo recomenaria que la prova de comportament la faci sempre la mateixa persona per tal de reduir l'esbiaix.

El paràmetre 2 s'ha descartat degut al moviment constant dels animals (sobretot WTD7) que impedia ser objectiu en la prova.

Per altra banda, el problema principal s'ha tingut amb els animals WTD7 que a partir de P8 es posen més nerviosos i a vegades no es podia completar la prova donat que es deixaven caure; en aquest cas es procedia a fer el tail suspension test (TT) on el que es mira és la posció de les potes mentre s'agafa l'animal per la cua. Es pot dir que els animals SMAΔ7 han sigut més aplicats.

18.3.3 Negative geotaxis

Avalua coordinació motora i sensibilitat vestibular.

Edat d'evaluació: des de P4.

Es posa l'animal en una superfície rugosa inclinada (35° aprox) de cap per avall.

Score és:

- pot girar-se i pujar en els primers 60seg.
- ho prova però defalleix a girar en 60seg.
- no pot fer el test degut a una clara inhbitat per feblesa muscular evident i gairebé paràlisi completa.

Es registra quan de temps es tarda a girar i a començar a pujar i pels que no poden fer-ho el temps anotat és 60 segons.

Obsevacions

Aquest test es va descartar de les proves donat que en un 90% dels casos els ratolins SMAΔ7 no es podien ni mantenir en el pendent.

19 CITOMETRIA DE FLUX*Objectius de la tècnica i mostres utilitzades*

La citometria de flux és una tècnica que ens permet determinar els percentatges de diferents poblacions cel·lulars. En aquets cas es determinen les poblacions limfocitàries CD4, CD8, doble negatives (DN) i doble positives (DP) i si la mort d'aquestes es per apoptosi o necrosi en els òrgans limfoides timus i melsa.

Solucions

- Medi de tinció: - PBS 1x
 - Fetal Calf Serum 1%.
- Tampó d'hemòlisi per ordre d'ús: - 900μL H₂O.
 - 100μL de PBS 10x.
 - 10mL de medi de tinció.
- Tampó amb Ca²⁺ per a l'anexin V.
- Tinció utilitzada i dilucions:

Tinció	Dilució	Marcatge
CD4	1/50	PE
CD8	1/50	FITC
AnnexinV	5μL	APC
7-AAD	1/200	

Procediment

- Dissecció de la melsa i del timus i posar la mostra en una placa de Petri amb medi de tinció o medi de cultiu.
- Aixafar les mostres per la part esmerilada de dos porta-bjectes prèviament rentats amb alcohol absolut (molt important en cas de fer-se cultius).
- Recollir tot el medi de cultiu de la placa de petri i netejar amb medi nou. Posar les mostres dins d'un tub de centrífuga cònic.
- Centrifugar 5 min a 1000 revolucions per minut (r.p.m).
- Decantar i ressuspendre el pellet.
- Hemòlisi de la mostra.
- Centrifugar 5 min a 1000 r.p.m
- Decantar i treure els trossos de teixit que hi pugui haver
- Afegir 1mL (en cas de mostres de ratolins adults necessitarem almenys 5mL) de medi de tinció i fer el comptatge a la cambra de Neubauer:

10µL tripan blue + 10 µL mostra

posar 10 mL a la cambra de Neubauer i comptar tres quadrats grans

Aplicar la fórmula per a obtenir el nombre total de cèl·lules

Fòrmula: $2 \times \text{mitjana recompte} \times 10^4 \times \text{factor de dilució} = \text{cèls/mL}$

- Al tub final de reacció hem de tenir $10^6 - 5 \times 10^6$ cèl·lules per tub.
- Afegir 100µL de tinció per cada 50µL de mostra.
- Incubar tots els marcadors excepte l'anexina 30min a la nevera.
- Afegir 500µL de medi de tinció.
- Centrifugar 5 min a 1000 r.p.m.
- Afegir 200µL de medi de tinció als tubs que no portaran anexina, afegir 200µL de tampó de calci als tubs que portaran anexina.
- Afegir 5µL d'Anexin V i llegir al citòmetre.

20. PROCESSAMENT D'IMATGES I ANÀLISI ESTADÍSTICA

Pel tractament d'imatges s'ha utilitzat el programa d'AdobePhotoshop 11.0.2 per tal de processar-les posteriorment amb el programari Visilog 6.3 (Noesis), per a obtenir les àrees de les fibres musculars, l'ocupació de la placa motora per part d'un marcador vesicular i l'arborització del neurofilament, entre d'altres (veure resultats).

Les dades s'han recollit considerant cada animal com a un individu indicant en cada cas el nombre de mostres utilitzades. El tractament estadístic s'ha fet amb el

programa PASW Statistics 18 expressant la mitjana \pm SEM. L'anàlisi estadística aplicada ha estat o bé la t-Student o bé l'ANOVA seguida del test post.hocde Bonferroni. S'han considerat com a significatius els valors inferiors a 0,05 ($p < 0.05$).

VII RESULTATS

Objectiu

Caracterització del fenotip, la supervivència de dos models murins transgènics i els canvis en la medul·la espinal, micròglia i astròglia del model agut d'AME.

21 Fenotip, supervivència i canvis en la medul·la espinal de dos models animals d'atròfia muscular espinal: SMA tipus I i SMA delta7

Els dos models animals utilitzats pateixen una forma d'atròfia muscular espinal (AME) d'evolució ràpida. Els AME tipus I (SMAT1) moren al voltant dels 6-7 dies postnatsals i els SMAdelta7 (SMA Δ 7) al voltant dels 14-15 dies postnatsals. Per fer un paral·lelisme amb els humans, els SMAT1 correspondrien a l' AME tipus I o malaltia de Werdnig-Hoffman (**Fig. 21A**) i els SMA Δ 7 fluctuen entre l' AME tipus I d'evolució més lenta o l' AME tipus II (**Fig. 21B**), tot va en funció dels autors. La severitat de la malaltia es veu reflectida en la mortalitat postnatal; mentre que gairebé la meitat dels animals SMAT1, nascuts, moren al llarg del primer dia de vida (46,5% n=39 de 84 SMAT1 nascuts), la mortalitat postnatal en els SMA Δ 7 és pràcticament la mateixa que la dels heterozigots i una mica més alta respecte els WT Δ 7 (5% n=9 de 173 SMA Δ 7 nascuts; 4,6% n=15 de 367 HET Δ 7 nascuts; 2,6% n=4 de 153 WT Δ 7 nascuts), per tant considerariem que la mortalitat postnatal en els SMA Δ 7 està dins la normalitat del model.

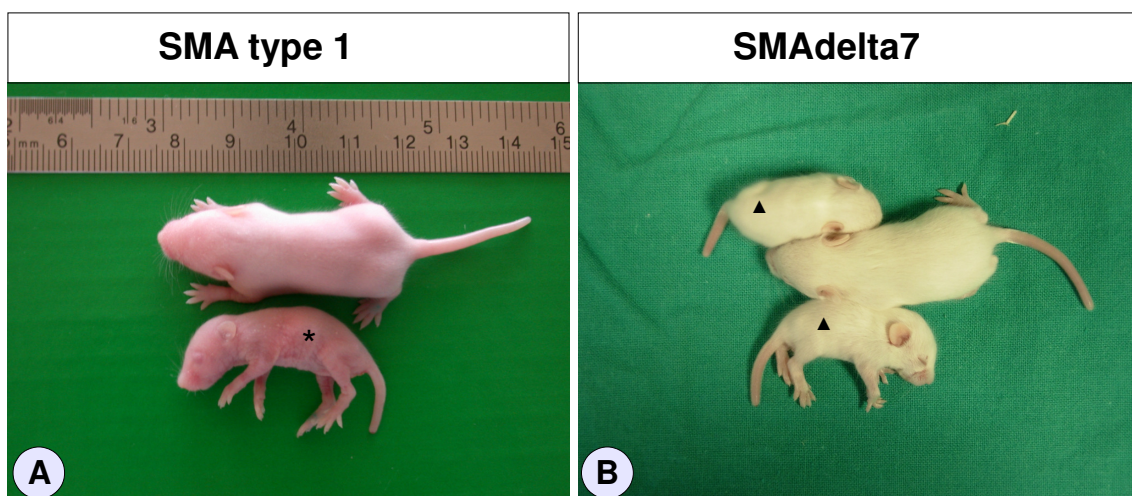


Figura 21. Imatges dels ratolins dels dos models animals en l'estadi terminal de la malaltia. SMAT1 a dia postnatal 6 (P6) (A*) i SMA Δ 7 (B▲) a P12. En ambdós casos es pot observar l'atròfia muscular evident i les dificultats per mantenir-se en estat de pronació.

Sembla ser que la dificultat que tenen els animals en ingerir l'aliment, afectant l'estat nutricional dels cadells malalts, no és el major culpable del fenotip AME, és a dir, malgrat tots els animals pateixen una reducció del pes corporal i una atròfia muscular considerables, només aproximadament el 50% dels ratolins terminals d' ambdós models tenia l' estómac buit en el moment de la recollida de les mostres. En general, aquestes troballes són consistents amb els resultats publicats anteriorment en el mateix model animal (Monani *et al*, 2000; Jablonka *et al*, 2006). En l'estadi terminal de la malaltia, es va detectar que els animals tenien una pèrdua moderada, però significativa, de les motoneurons (MNs) de la banya ventral de la medul·la espinal (ME) (20% en SMAT1) (**Fig. 22A-B**). En el animals recent nascuts també s' aprecia una petita pèrdua de MNs, no significativa, possiblement deguda a la variabilitat individual. No es van trobar diferències en el nombre de MNs a la zona lumbar dels animals en estat embrionari de 18 dies (E18), indicant que el procés natural de mort cel·lular programada en les MNs, que en ratolins té lloc a la ME entre E13 i E15 (Yamamoto, 1999), no es veu alterat per la deficiència d'SMN. Per detectar altres possibles canvis en la ME dels ratolins AME, es va realitzar immunotinció específica per a amb GFAP i Iba-1 per visualitzar l'astròglia i la micròglia respectivament. No es van detectar canvis en la micròglia (**Fig. 23**), per contra, l'astròglia present al voltant de les MNs estava incrementada en els SMAT1. La quantificació relativa de la superfície positiva per GFAP a la banya ventral, demostra que aquesta està incrementada 3 vegades en els animals nounats i de 5 en els animals terminals. No es van observar canvis a E18 (**Fig. 24**).

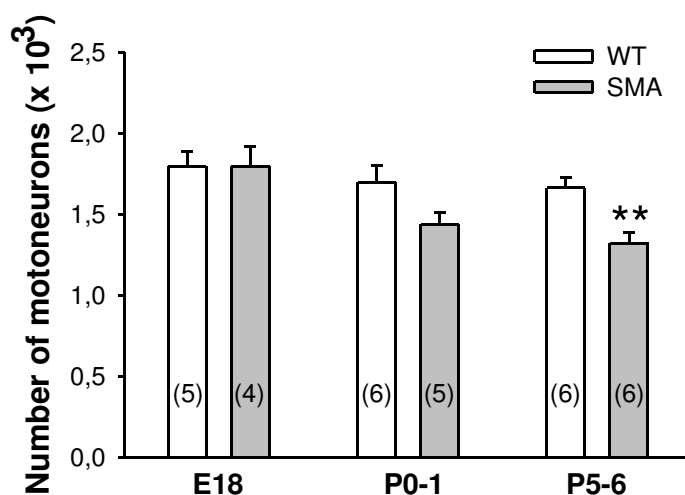


Figura 22. Nombre de motoneurons (MNs) a la banya ventral de la zona lumbar de la medul·la espinal (ME) en animals amb atròfia muscular espinal tipus 1 (SMAT1)(A). S'observa una davallada significativa de MNs en les etapes terminals de la malaltia en ambdós casos. En estat embrionari i nounat no s' observen canvis significatius. *p<0.01 versus WT (t-Student)

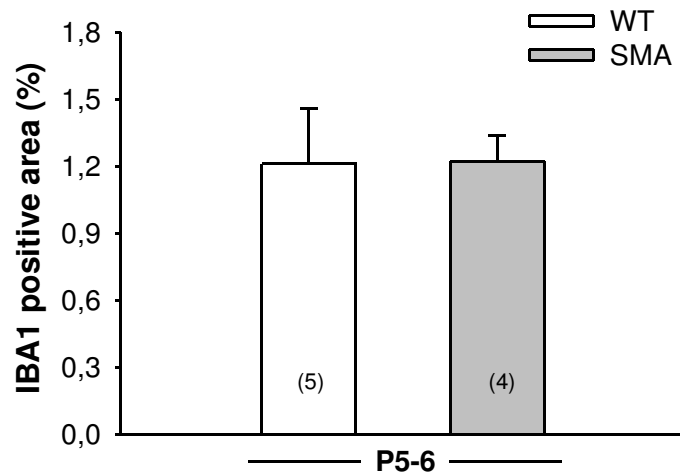


Figura 23. Canvis en la micròglia a la banya ventral de la zona lumbar de la ME. No s'observen diferències, a l'estadi terminal de la malaltia, entre SMAT1 i WTT1 en la quantificació de les cèl·lules positives per Iba-1. (t-Student).

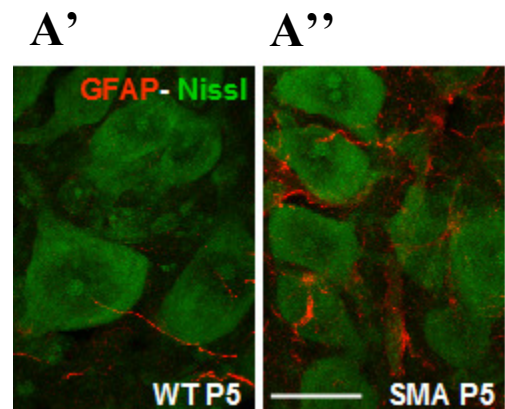
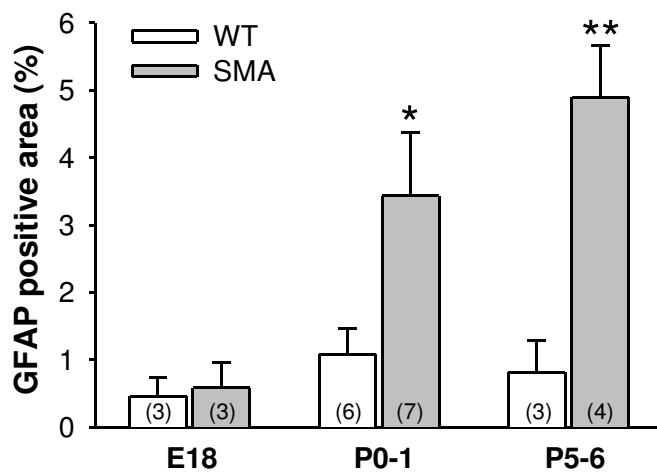


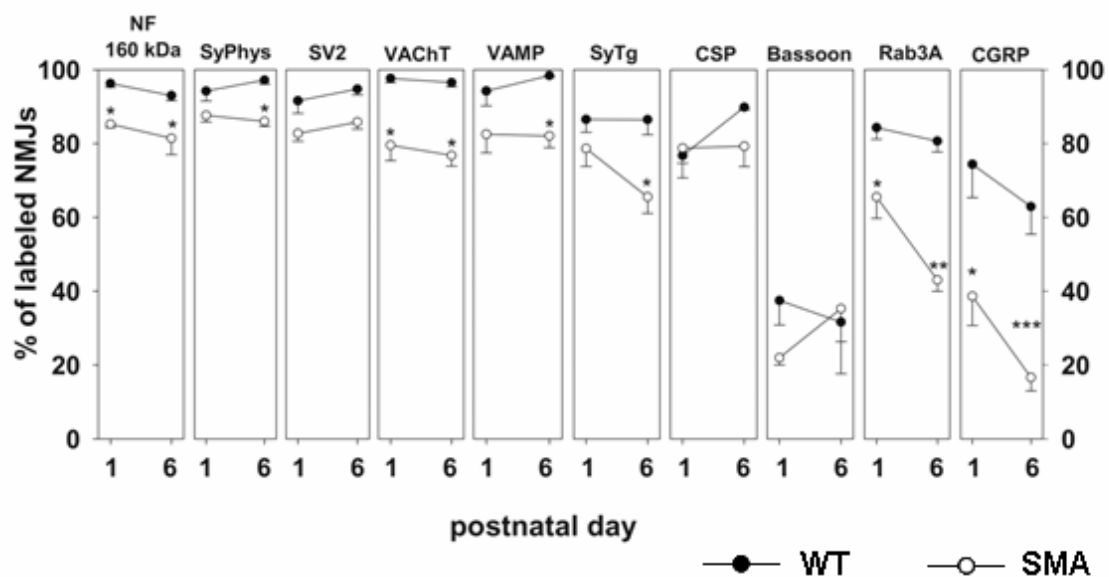
Figura 24. Canvis en l'astròglia a la banya ventral de la zona lumbar de la ME. La positivitat de la glial fibrillary acidic acid protein (GFAP), està incrementada al voltant de les MNs postnatsals en els ratolins SMAT1 (A). (A'-A'') imatge representativa de la GFAP (vermell) adjacent als cossos de les MNs visibles pel pintat amb Nissl fluorescent (verd). * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$ versus WT (t-Student). Escala A' = 25 μ m (Vàlid per A'').

Objectiu

Caracterització de la complexitat de les unions neuromusculars en dos models de ratolins transgènics. Estudi dels marcadors presinàptics implicats en l'estructura vesicular i l'ancoratge de les vesícules a la membrana presinàptica i estudi dels canals de calci en diversos músculs i edats.

22 Expressió defectuosa de proteïnes sinàptiques en ratolins SMAT1 i SMAΔ7

L'AME és una malaltia clàssicament considerada com a malaltia de la MN, de manera que la pèrdua d'aquestes, degut als baixos nivells de la proteïna SMN, fa que es manifesti amb aquest fenotip tan característic. La davallada moderada de les MNs lumbars en ratolins SMAT1, però, no explica del tot la paràlisi tant severa que pateixen els ratolins afectats per la malaltia, per aquesta raó hem buscat canvis al múscul i a la unió neuromuscular (NMJ) que puguin explicar aquest dèficit motor. La discapacitat en el transport axonal de proteïnes, com l'actina i ribonucleoproteïnes al llarg dels nervis motors pot ser essencial (Zhang *et al*, 2003; Rossoll *et al*, 2003). Per determinar canvis prematurs en les proteïnes de les NMJs, es va analitzar, per immunohistoquímica, l'expressió de 9 marcadors sinàptics, combinats amb l' α -Bungarotxina (α -Bgtx), en el múscul intercostal (IC) (**Fig. 25**). Els resultats mostren que, tot i haver-hi diferències significatives entre els SMAT1 i els WTT1 amb els marcadors de sinaptofisina (SyPhys), SV2 i de neurofilament (NF), només hi havia un 10% de pèrdua del marcador, indicant una molt baixa freqüència de denervació, fet que tampoc explica l'acusada afectació motora dels ratolins SMAT1. SV2 i SyPhys es poden utilitzar indistintament donada la seva col·localització (**Fig. 26**), tal i com també succeeix amb



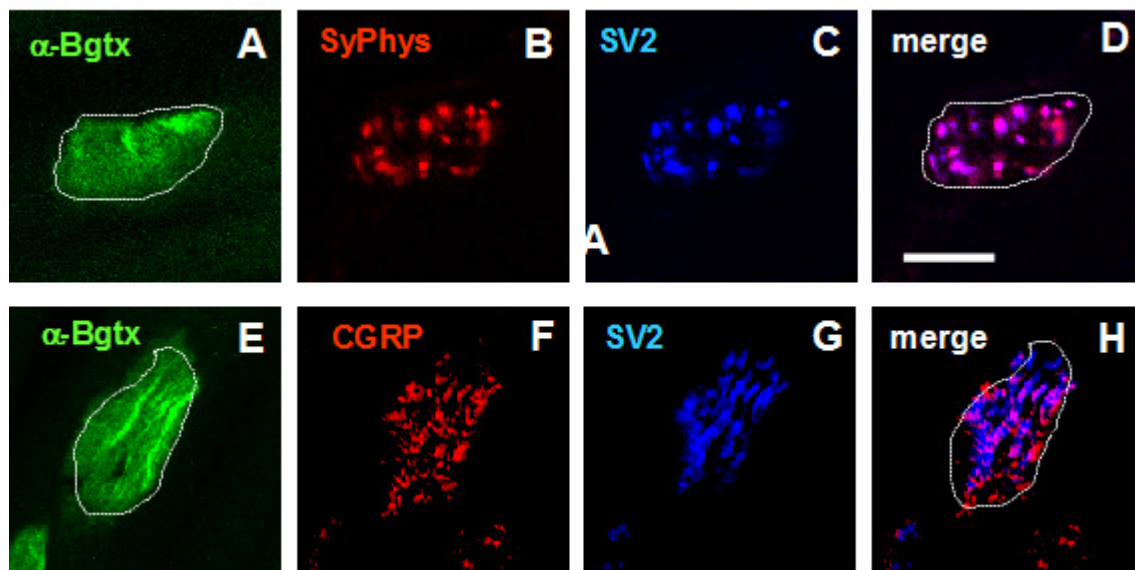


Figura 26. Imatges de la compartimentalització del CGRP en un grup de vesícules amb triple marcatge. El CGRP (vermell) i el marcador vesicular SV2 (blau) no col·localitzen a la NMJ delimitada postsinàpticament per la α -Bgtx (E - H). Per contra, la sinaptofisina (SyPhys) (vermell) i la SV2(blau) mostren col·localització (A - D). L'escala a D = 10 μ m (vàlid de A - H).

els dos NFs utilitzats (68kDa i 160kDa), que s'han usat ndistintament. Les proteïnes implicades en l'adquisició del fenotip colinèrgic i la funcionalitat de les vesícules sinàptiques, per exemple: la VACHT, VAMP-1 (implicada en l'exocitosi), la SyTg o el Rab3A (proteïnes sensors del calci); proteïnes implicades en la fusió vesicular com la sinaptobrevina 1 (VAMP-1), la sinaptotagmina (SyTg) i el Rab3A, estaven disminuïdes a P0 en els animals SMAT1. La SyTg té un comportament semblant a les proteïnes ja esmentades, mentre que el Rab3A pateix una depleció en ratolins SMAT1 nounats, depleció encara més acusada en l'estadi terminal. Rab3A és un sensor del calci, però també està implicat en el transport i acoblament de les vesícules a la zona activa (Leenders, AG 2001). Aquest comportament, encara més acusat (**Fig. 25**), succeeix també amb el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), un neuro-pèptid que coexisteix, en vesícules separades, amb l'acetilcolina en les NMJs de vertebrats, (**Fig. 26E-H**).

Figura 25. Expressió d'algunes proteïnes sinàptiques en les unions neuromusculars (NMJs) del múscul intercostal (IC) de ratolins WT i SMAT1. Percentatge de les NMJs de WT (●) i SMAT1 (○) avaluades en animals nounats (P0-1) i animals terminals (P5-6). Es van analitzar mostres d'entre 4 i 12 animals per immunotinció específica. Per tal de poder identificar les sinàpsis, la immunotinció, es va combinar amb el marcatge amb l' α -Bungarotoxina. Encara que la majoria de les proteïnes sinàptiques estan disminuïdes en els ratolins SMAT1, la major part de les NMJs romanen innervades als estadis terminals de la malaltia. El calcitonin gene-related peptide (CGRP) i el Rab3A estan notablement disminuïts en les NMJs dels SMAT1. *, p<0,05; **, p<0,01; i ***, p<0,001 respecte els WT (ANOVA seguida del test de Bonferroni).

El CGRP està regulat durant el desenvolupament, essent més actiu i trobant-se amb més abundància a les NMJs en desenvolupament o en regeneració (Matteoli *et al*, 1988; Matteoli *et al*, 1990; Sala *et al*, 1995; Tarabal *et al*, 1996) i s'emmagatzema en les vesícules de nucli dens. La depleció del CGRP és exclusiva en els nervis motors i en les NMJs ja que la immunoreactivitat en el sistema sensorial/visceral es manté en els músculs afectats dels SMAT1, marcatge que ha servit com a control positiu de la mateixa tècnica (**Fig. 27**).

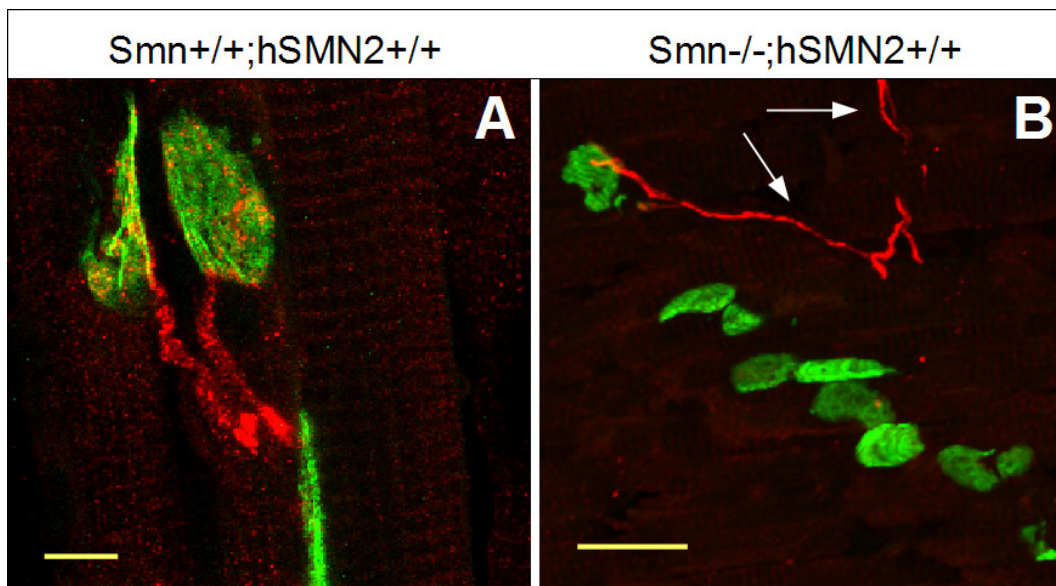


Figura 27. Il·lustració de les NMJs del múscul intercostal (IC) d'un ratolí WTT1 (A) i d'un ratolí SMAT1 (B), marcades amb CGRP (verd) i α -Bgtx (vermell). S'observa la desocupació de les NMJs en el SMAT1 però el manteniment del marcatge en els nervis sensorials (fletxa). Escala A = 10 μ m i B = 25 μ m.

La detecció de canvis en els marcadors Rab3A i CGRP en nounats va incentivar l'estudi a nivell embrionari (E18). Com ja s'esperava els marcadors de SyPhys i NF no estan alterats en els ratolins SMAT1 (**Fig. 28A-B**); el Rab3A (**Fig. 28C**) tampoc pateix canvis prenatals, mentre que el CGRP (**Fig. 28D**) indica una forta depleció a E18. El comportament del CGRP en els ratolins SMAT1 segueix la mateixa tendència en forma de campana, però amb una depleció significativa en les 3 edats estudiades.

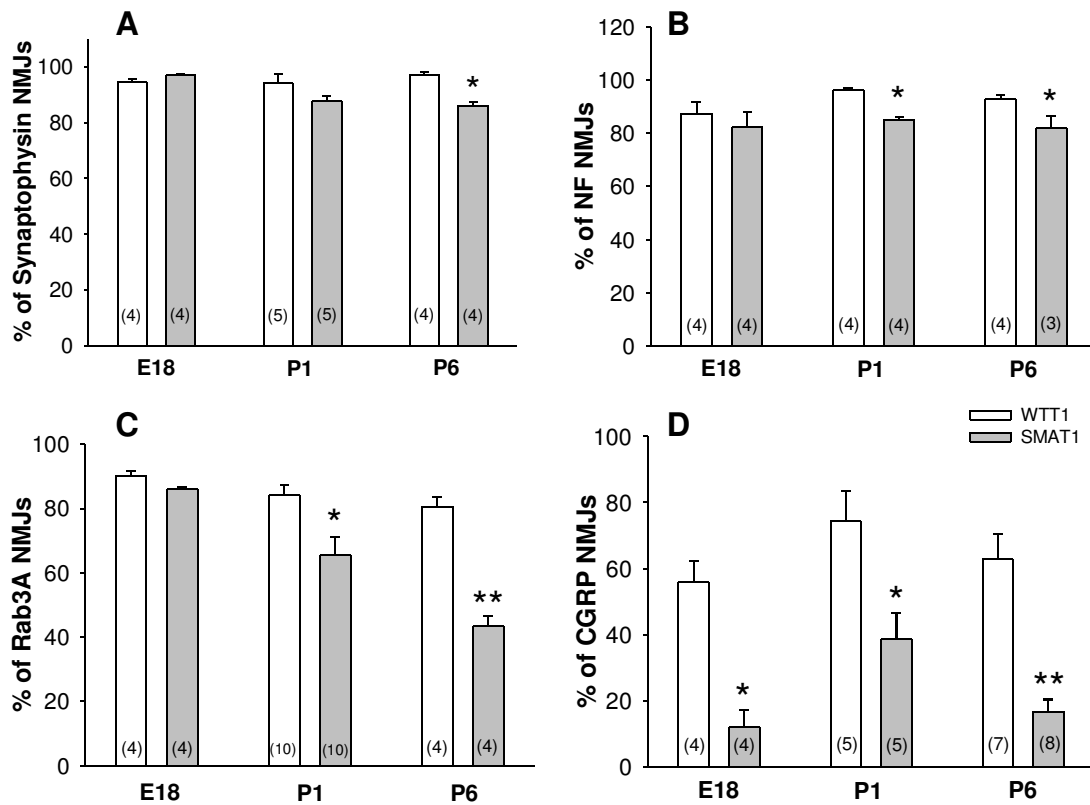


Figura 28. Percentatge d'ocupació dels marcadors presinàptics escollits per un estudi de diversos tipus musculars i diferents models animals en el múscul IC de E18-P6 en ratolins que pateixen l'AME tipus 1 (SMAT1). S'observa una lleugera disminució ($\approx 10-15\%$) en el marcador estructural de vesícules, la SyPhys (A) i en el NF (B); l'estudi del Rab3A (C) mostra una davallada més acusada als nous i molt evident en els terminals; el CGRP (D) s'observa una davallada significativa a E18, es pot observar la distribució al llarg dels diferents punts observats que és igual a la dels WTT1, amb l'evident depleció del marcador CGRP. Els números entre parèntesi es refereixen al nombre d'animals utilitzats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ANOVA seguida de Bonferroni.

El desenvolupament de l'aparell postsinàptic sembla defectuós en el múscul IC dels ratolins SMAT1, en un 23% a E18 i 65% a P5-6. S'ha de tenir en compte que les plaques motores estudiades en els ICs són talls de les mateixes, i tot i haver escollit les que tenien l'aparell més pla (similar a una placa sencera) la desviació pot ser bastant gran, aquesta podria ser l'explicació del resultat obtingut en les NMJs postsinàptiques a P0-1, on no hi ha diferències significatives entre els animals WT i els malalts. Quan s'observa l'aparell postsinàptic sencer en un múscul pla com és el *Transversus abdominis* (TVA), podem observar que pràcticament no hi ha diferències entre els WTT1 i els SMAT1, fet que ens fa pensar que les diferències en els ICs siguin causades per la desviació que hi pot haver (Fig. 29AB).

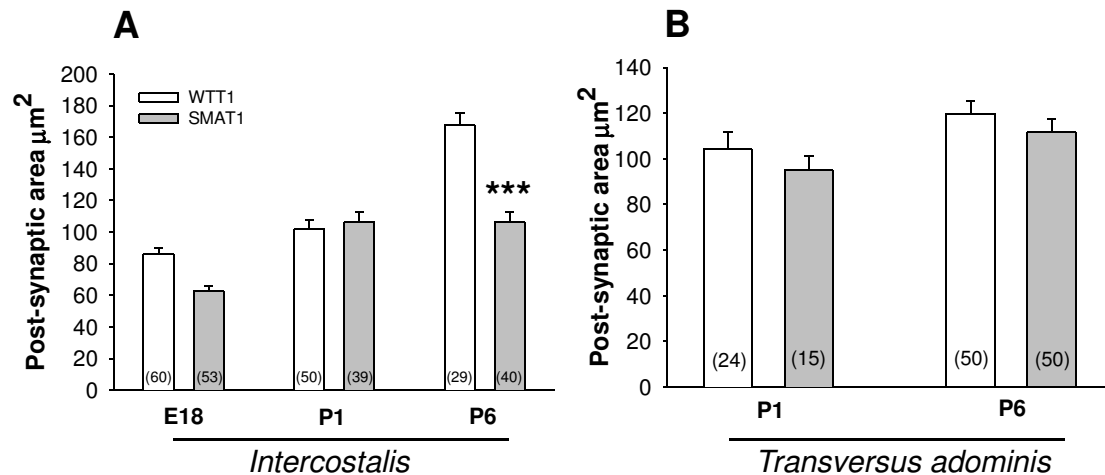


Figura 29. Mesures dels terminals postsinàptics tenyits amb α -Bgtx en els músculs IC i TVA de ratolins SMA tipus I. (A) Gràfica de les mesures del terminal postsinàptic en talls de criostat del múscul IC a l'edat de E18, P1 i P6; s'observa una disminució de l'àrea de l'aparell postsinàptic en l'etapa terminal de la malaltia. (B) Gràfica de les mesures del terminal postsinàptic en preparacions whole mount del múscul pla TVA a les edats de P1 i P6, no s'observen diferències entre els SMAT1 i els seus controls (WTT1). Els números entre parèntesi indiquen el nombre de plaques motores analitzades. *** $p < 0.001$ (t-Student).

Després d'escollir el CGRP, la SyPhys, el NF i el Rab3A com a marcadors representatius, vàrem procedir a l'estudi de diferents tipus musculars (**Taula 3**) en el mateix model animal. Els músculs utilitzats en seccions de criostat van ser els distals: soli (SOL), *tibialis anterior* (TA), *gastrocnemius* (GN) i *extensor digitorum longus* (EDL), i els proximals: lingual (Ling), esternoclidomastoïdal (StM) i diafragma (Diaph), i el múscul pla *transversus abdomini* (TVA), aquest darrer sencer. En els músculs distals, contràriament a l'observat en els ICs, no s'aprecien canvis significatius en cap dels marcadors utilitzats. El CGRP no va poder ser analitzar al SOL, donat que el CGRP està absent dels nervis motors de WTs i SMAs en aquest múscul. L' StM pateix una davallada no significativa en els SMAT1; el Ling, un múscul amb característiques molt diferents a la resta, mostra un increment en el CGRP. Voigt *et al*, (2010) va descriure per primera vegada canvis ultra-estructurals en el Diaph i nosaltres al 2011 (Dachs, E 2011) vàrem descriure canvis significatius a la placa motora amb els marcadors CGRP, Rab3A i NF+SyPhys. Fins llavors, el Diaph s'havia considerat un múscul no afectat en l'AME (McGovern *et al*, 2008). L' estudi del múscul proximal pla TVA, múscul afectat per l'AME (Ruiz *et al*, 2010), que ens permet veure la sinapsi en la seva totalitat, a través de la tècnica del *whole-mount*, ens corrobora els canvis significatius prèviament observats en el IC, amb una lleugera denervació (~9%)

detectada pels marcadors SV2 i per la SyPhys que en aquest cas s'ha utilitzat juntament amb el NF; el Rab3A amb una disminució molt significativa en l'estadi terminal de la malaltia, però no en nounats, i el CGRP que es confirma com a marcador severament afectat en els músculs proximals dels ratolins SMAT1 (**Fig. 30**). Resumint, respecte els animals control, els músculs distals dels ratolins AME no presenten canvis substancials en els marcadors que ens indiquen l'estat de denervació, en estadis terminals de la malaltia. Els músculs proximals dels ratolins AME, pràcticament no presenten denervació mentre que els marcadors CGRP i Rab3A estan significativament afectats.

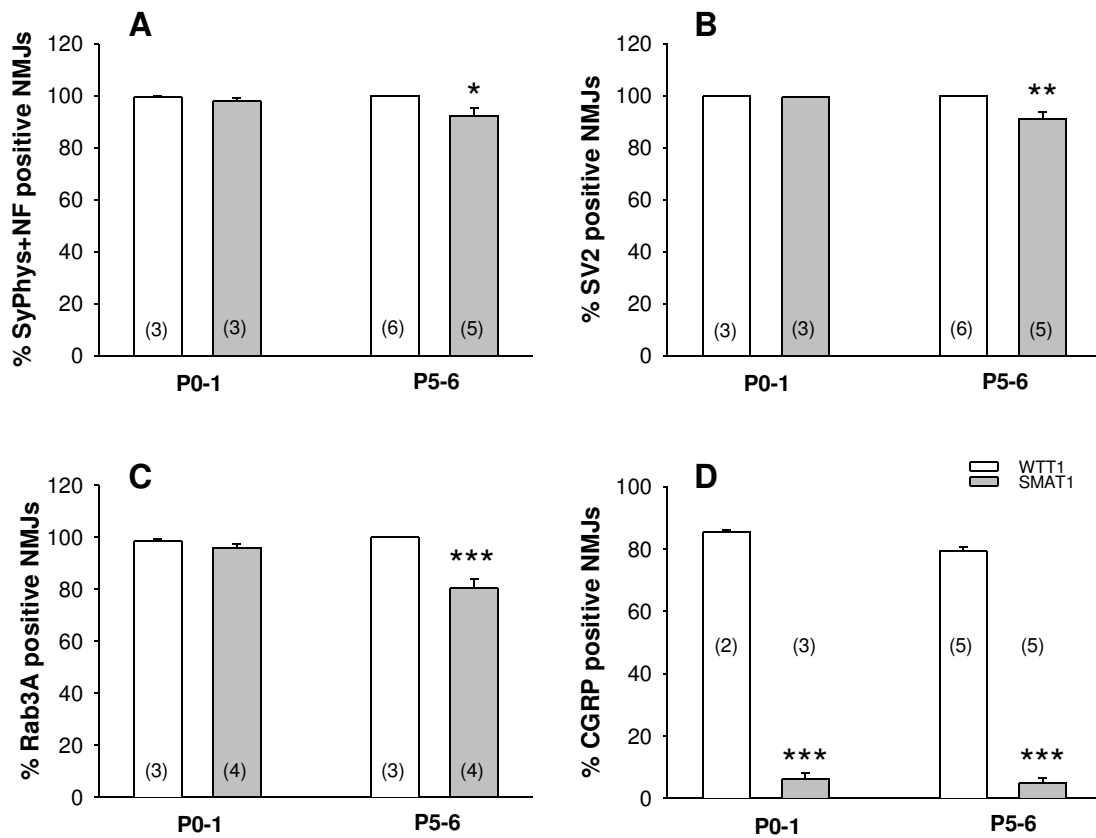


Figura 30. Percentatge d'ocupació dels marcadors presinàptics SyPhys + NF, SV2, Rab3A i CGRP en el múscul pla *Transversus abdominis* (TVA) de P0-P6 en ratolins que pateixen l'AME tipus 1. S'observa una lleugera denervació (~9%) en els marcadors estructurals de vesícules sinàptiques, SyPhys junt amb el NF (A) i en el SV2 (B); l'estudi del Rab3A (C) no mostra canvis entre els SMAT1 i WTT1 a P0-1 però sí una davallada en els ratolins terminals; el CGRP (D) s'observa una davallada molt significativa en els nounats que es manté en els ratolins terminals. Els números entre parèntesi es refereixen al nombre d'animals utilitzats. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ANOVA seguida de Bonferroni.

L'estudi dels marcadors en el model animal d'AME delta 7 (SMA Δ 7), indiquen que els músculs Ics (**Taula 3**) no estan denervats, no hi ha diferències entre els SMA Δ 7 i els WT Δ 7 en el NF i la SyPhys; respecte el Rab3A, es denota una tendència a la baixa però sense significació; en el cas del CGRP la tendència a la baixa és més acusada que l'observada amb el Rab3A però tampoc és significativa. El CGRP es regula a la baixa durant el desenvolupament, per tant, el fet que en els WT trobem poques NMJs positives entra dins la normalitat, ara bé, el fet que s'observin diferències, notables, entre els WTT1 i els WT Δ 7. Per observar el comportament en els músculs distals s'ha utilitzat el TA; no s'ha vist denervació en cap de les tres edats examinades. El NF, però està augmentat significativament en els SMA Δ 7 terminals, una possible explicació seria perquè els WT Δ 7 ja han començat a fer el canvi de NF mentre que els SMA Δ 7 no (**Taula 4**).

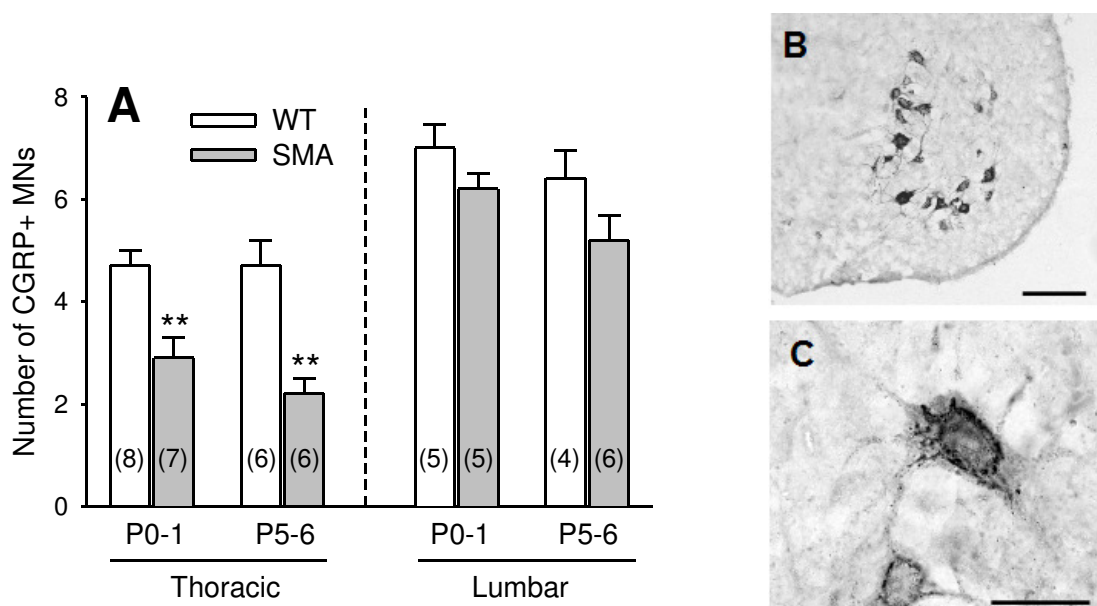


Figura 31. Expressió CGRP en les MNs lumbar i toràciques en animals WTT1 i SMAT1. (A) S'observa una depleció de CGRP en les MNs toràciques d'animals postnats i terminals, però no en les MNs lumbar. Els nombres en parèntesi indiquen el nombre d'animals analitzats. ** $p < 0.01$ versus WT (t-Student). (B i C) Imatges representatives de les MNs lumbar positives pel CGRP en un ratolí WTT1 a P5, s'observa el CGRP al cos de la MN i un patró granular en algunes neurites. Escala B = 100 μ m i C = 25 μ m.

% d'immuno-reactivitat positiva en les unions neuro-musculars del múscul *Intercostalis*

	SMA type 1 (4-8)				SMA delta7 (4-5)					
	WT P0-1	SMA P0-1	WT P5-6	SMA P5-6	WTD7 P1	SMAD7 P1	WTD7 P7-8	SMAD7 P7-8	WTD7 P13-15	SMAD7 P13-15
CGRP	74.37±9.05	38.62±7.93*	62.9±7.52	16.62±3.63‡	61.5±4.17	34.6±10.75	12±3.8	5.75±2.13	17±3.65	10.75±3.22
SyPhys	94.2±2.69	87.62±1.75	97.15±1.05	86±1.35*	99.12±0.31	96±1.06	90.25±4.17	87±1.88	-	-
NF	96.25±1.03	85.25±0.94*	93±1.41	81.4±4.4*	-	-	-	-	-	-
NF+SyPhys	-	-	-	-	94.5±1.95	90.28±3.56	-	-	87±3.96	87.37±2.35
Rab3A	84.3±3.18	65.5±5.79*	80.65±2.93	43.47±3.22†	64.87±14.8	59.6±20.89	59.75±1.19	49±1.41	57±9.48	39.8±13.73

Taula 3. Anàlisi immunohistoquímica del múscul IC d'animals WT i SMA tipus 1 i SMAD7. Els resultats s'expressen amb el percentatge de plaques motores positives totals (mitjana±sem). Els nombres entre parèntesi indiquen el nombre d'animals estudiats. *p<0.05; †p<0.01; ‡p<0.001 *versus* WT (ANOVA seguida de Bonferroni).

% d'immuno-reactivitat positiva en les unions neuro-musculars del *Tibialis anterior*

	SMA type 1 (4-8)		SMA delta7 (3-4)					
	WT P5-6	SMA P5-6	WTD7 P1	SMAD7 P1	WTD7 P7-8	SMAD7 P7-8	WTD7 P13-15	SMAD7 P13-15
CGRP	57.41±10.33	67.68±8.16	59.75±5.57	63±5.36	63.75±9.49	16.25±1.93‡	20±1.63	9.5±2.1
SyPhys	97.12±1.55	97.28±1.67	99±0.7	97.5±1.03	91.75±1.03	98±1.35	70.5±2.32	70±5.58
NF	-	-	91.25±1.49	92.75±0.94	85±2.73	94.5±0.95	65.12±3.26	74.5±1.75‡
Rab3A	71.7±3.33	73.42±7.31	71.16±3.34	74.12±4.62	43.25±6.32	48±10.44	39±5.81	19.75±2.56 *

Taula 4. Anàlisi immunohistoquímica del múscul Tibialis anterior de ratolins WT i SMA tipus 1 i SMAdelta7. Els resultats s'expressen amb el percentatge de plaques motores positives totals (mitjana±sem) Els nombres entre parèntesi indiquen el nombre d'animals estudiats. *p<0.05; †p<0.01; ‡p<0.001 *versus* WT (ANOVA seguida de Bonferroni o DMS).

CGRP, calcitonin gene-related peptide; NF, neurofilament; SyPhys, Synaptophysin; SMA, Spinal muscular Atrophy; WT, wild type.

El CGRP està significativament regulat a la baixa en les sinapsis neurousculars, per determinar el seu estat en la motoneurona, es va calcular la immunoreactivitat en les MNs de talls de criostat de la ME toràcica i lumbar (**Fig. 31**). S'observa una afectació en les MNs toràciques, que innerven els músculs proximals però no de la zona lumbar innervada pels músculs distals. La disminució dels nivells de CGRP no està associada a cap pèrdua de MNs, donat que el recompte de MNs toràciques es manté inalterat.

22.1 Els canals de calci

Jablonka *et al* (2007) van observar, per immunocitoquímica, que la subunitat formadora del porus (Ca_v2.2) dels canals de calci voltatge depenents de tipus N (VGCCs) en cultius de MNs amb deficiència d'SMN estava reduïda en els cons de creixement, fet que es correlacionava amb la reducció de la freqüència de les ones de Ca²⁺ intracel·lular. Nosaltres hem aplicat el mateix anticòs en talls de criostat del múscul IC en els dos models animals estudiats, a P0-1 i a E18. El percentatge de NMJs positives per Ca_v2.2 ens indica que els nounats del model animal d'AME tipus I pateixen una davallada significativa, fet que no succeeix en els embrions E18 SMAT1 ni als SMAΔ7 a P1 (**Figs. 32 i 33 A-D**).

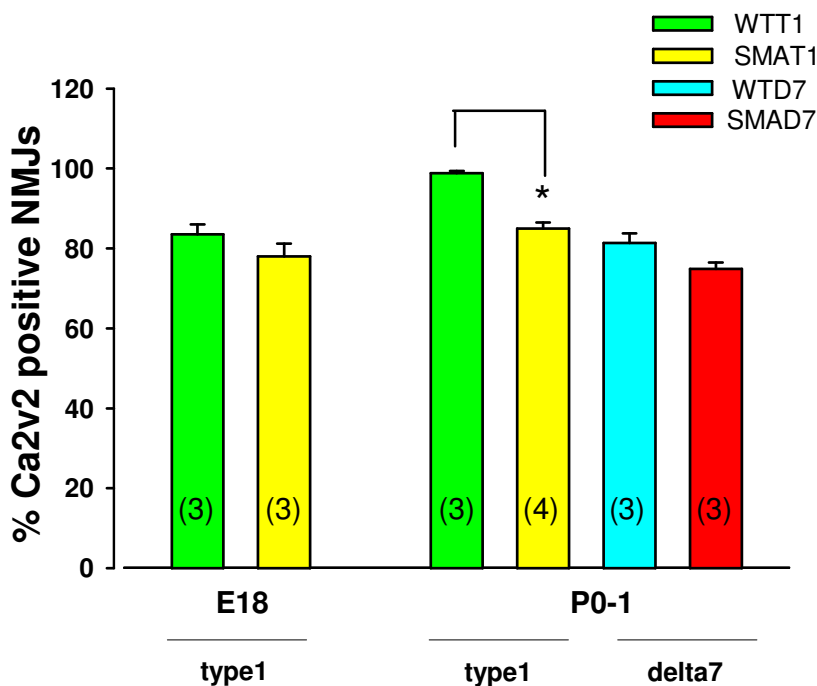
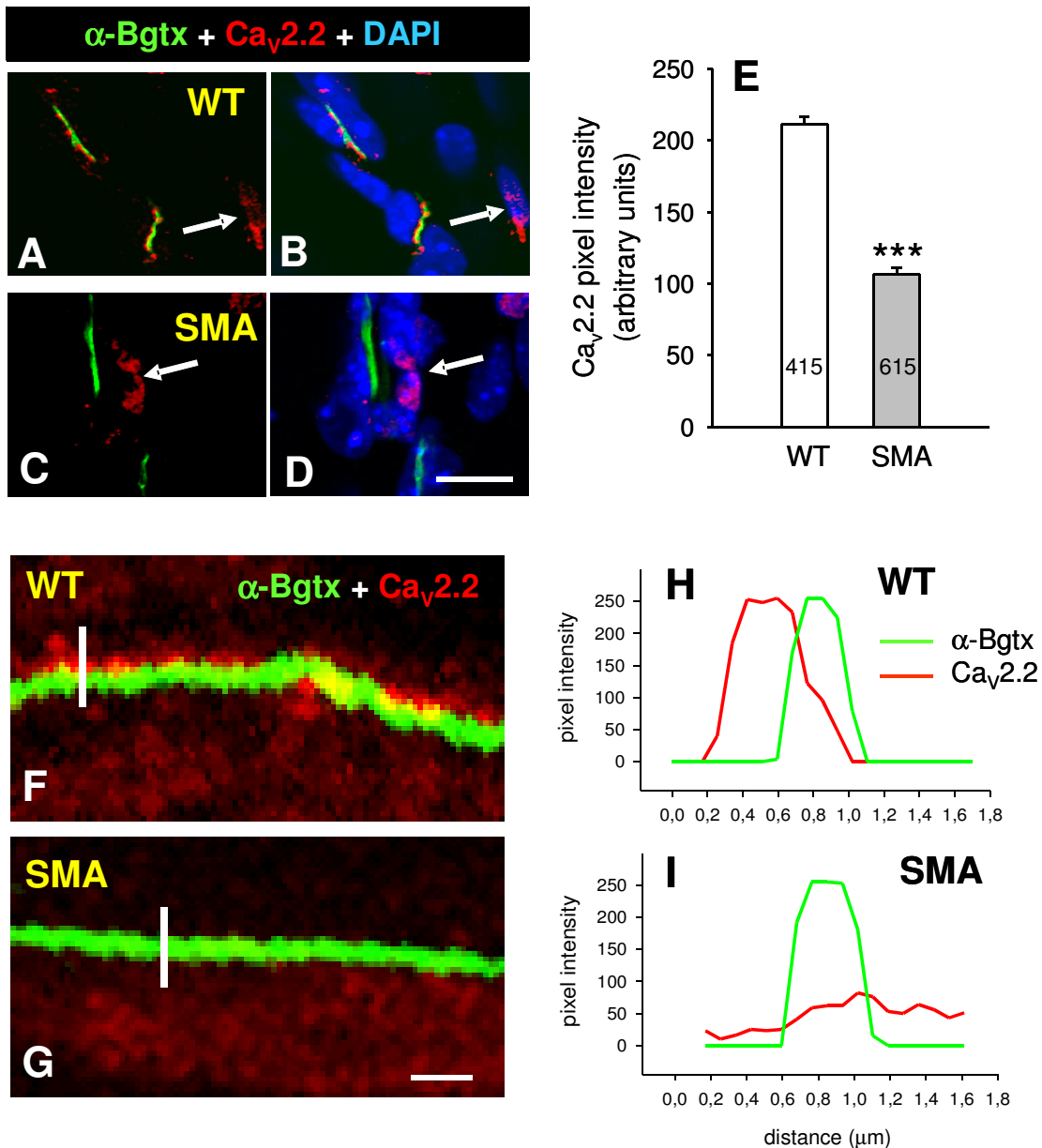


Figura 32. Percentatge de NMJs positives per la subunitat formadora de canals de calci (Ca_v2) del múscul IC. S'observa una reducció dels canals de calci en els SMAT1 (taronja) respecte els controls (WTT1 en verd fosc) a P1, però no a E18. No s'observen diferències entre els SMAΔ7 (vermell) i els seus controls (WTD7)(verd clar). Els números entre parèntesi indiquen el nombre de ratolins utilitzats. *p<0.05 t-Student.

Malgrat la immunoreactivitat inespecífica i el soroll de fons que dona l'anticòs, es va procedir a un examen més exhaustiu de les NMJs positives/negatives per aquest anticòs en animals P0/1 del model animal SMAT1, amb el microscopi confocal (**Fig. 33**). A la figura 33 podem observar la immunoreacció a baix augment (**Fig. 33A-D**) i en detall (**33. F-G**). Amb l'ús d'imatges molt amplificades es va procedir a l'anàlisi del "pixelatge", vàrem observar una forta davallada del marcatge en els $Ca_v2.2$ en els SMAT1 (**Fig. 33E**). L'anàlisi densitomètric al llarg d'una línia que creua la membrana pre- i postsinàptica (**Fig. 33F-G**) mostrant els valors de la intensitat dels píxels per $Ca_v2.2$ (vermell) α -Bgtx (verd; **Fig. 33 H-I**).



22.2 Expressió defectuosa de proteïnes associades al Rab3A en ratolins prenatals

El Rab3A forma part de la família de proteïnes Rab (veure introducció), és la proteïna Rab més abundant que hi ha al cervell i es troba en la majoria de vesícules sinàptiques. Els nostres resultats ens indiquen que hi ha una depleció del Rab3A i dels canals de Ca^{2+} a estadis on la malaltia encara no es manifesta fenotípicament, per això hem procedit a analitzar altres proteïnes pre-sinàptiques que estan lligades a elles. Les proteïnes analitzades són: a) la RIM, proteïna de les zones actives que regula l'alliberament de Ca^{2+} provocat pels NTs (es pensa que és l'efector putatiu del Rab3A); b) Munc-13, proteïna essencial en l'exocitosi; c) Munc18, proteïna perifèrica de membrana que participa en l'ancoratge i fusió de les vesícules; d) Rabphilin, proteïna que fa de sensor del Ca^{2+} i és dependent de Rab3A; i e) el Piccolo, proteïna estructural que intervé en l'endo- i exocitosi de les vesícules sinàptiques i que actua juntament amb el Bassoon. Els anticossos contra les proteïnes Munc13 i Rabphilin es van provar en talls de criostat del múscul IC a l'edat de P1; són anticossos que no van funcionar massa bé i es van descartar per posteriors estudis, no obstant la Rabphilin no va donar diferències entre WTT1 i SMAT1, mentre que amb l'anticòs anti-Munc13, hi havia una lleugera depleció de la immunoreactivitat en els SMAT1 (dades no mostrades). Les altres tres proteïnes, Munc18, Rim i Piccolo es van analitzar en els dos models animals i a les edats de E18 i P1 (**Fig. 34A-C**). Les tres estan significativament regulades a la baixa a l'edat de P1 en els dos models animals, però sorprenentment, RIM i Munc18 també estaven significativament disminuïdes en embrions d'E18 en els SMAT1, indicant que els ratolins SMA tenen les zones actives deficientes a nivell de la fusió vesicular i de regulació del Ca^{2+} . En els SMA Δ 7, Munc18 pateix una lleugera davallada, no significativa, i no hi ha diferències entre els SMA Δ 7 i els WT Δ 7 en el RIM i el Piccolo. No obstant, per descartar una davallada subtil de RIM i Piccolo, vàrem calcular el percentatge d'ocupació d'aquestes respecte l'àrea de l'aparell postsinàptic, indicat per l' α -Bgtx i no es van trobar diferències significatives (**Fig. 34D**).

Figura 33. Immunoreactivitat de la $Ca_{v}2$ en seccions de criostat del múscul IC, després d'una fixació curta, en animals SMAT1. Imatge representativa de les seccions d'IC de ratolins P0 WTT1 (A i B) i SMAT1 (C i D), en vermell l'anticòs $Ca_{v}2$ i en verd l' α -Bgtx que ens indica la zona postsinàptica, en blau els nuclis marcats amb DAPI, les fletxes indiquen el marcatge inespecífic de l'anticòs. (E) Intensitat del píxel avaluat en 3WTT1 i 4 SMAT1, els números dins les barres indiquen el nombre de sinapsis analitzades. (F i G) Magnificació d'una NMJ d'un WTT1 i SMAT1. (H i I) Anàlisi densitomètric al llarg d'una línia que creua la membrana pre-i postsinàptica. *** $p < 0,001$ t-Student. Escala D = 10 μ m (vàlid per A - C) i G = 1 μ m (vàlid per F).

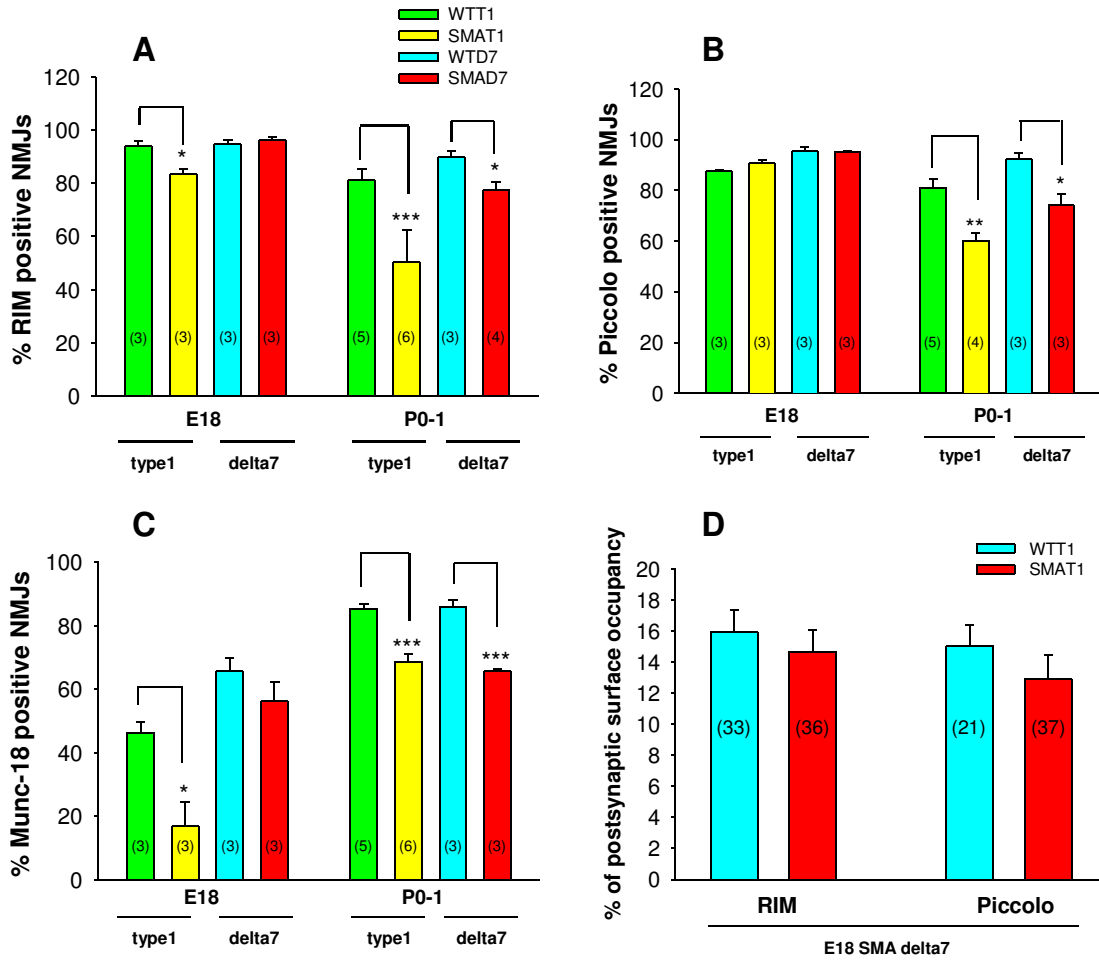


Figura 34. Anàlisi de l'aparell presinàptic dels ratolins SMAT1 i SMAΔ7 amb els marcadors RIM, Piccolo i Munc18, a E18 i P1. S'observen diferències significatives a P1 en tots els marcadors i en ambdós models (A - C). Els SMAT1, tenen diferències significatives a E18 amb els marcadors RIM (A) i Munc18 (C) però no en el Piccolo (B). (D) mostra el percentatge d'ocupació de RIM i Piccolo respecte l'aparell postsinàptic marcat amb α -Bgtx, en ratolins SMA delta7. Els números entre parèntesi de A - C indiquen el nombre de ratolins utilitzats i els números entre parèntesi en D indiquen el nombre de plaques motores analitzades d'una n = 3 ratolins per condició. *p<0,05; **p<0,01 i ***p<0,001 t-Student.

22.3 Estudi de la complexitat de l'aparell postsinàptic en el múscul *pl transversus abdominis*

L'anàlisi de la complexitat de l'aparell presinàptic i com aquest s'acobla a la membrana postsinàptica es va dur a terme en el múscul TVA de nounats, utilitzant els marcadors SV2 amb NF amb la tècnica del *whole mount* (**Fig. 35I-N**). El resultat mostren una clara simplificació de l'aparell presinàptic en els SMA tipus 1; els valors de les terminacions dels axons en l'arbre presinàptic són gairebé la meitat dels controls, i l'ocupació de la membrana postsinàptica disminueixen 3 vegades (**Fig. 35O**). S'observen també, acumulacions de NF en els terminals presinàptics (**Fig. 36A**), elongacions dels axons en els músculs *levator auris longus* (LAL) i Diaph (**Fig. 36B**) en SMAT1 i WTT1 (Kariya *et al*, 2009; Murray *et al*, 2010) i protuberàncies axonals al llarg dels nervis intra-musculars (**Fig. 36C**), resultats prèviament descrits (Cifuentes-Diaz *et al*, 2001; McGovern *et al*, 2008; Murray *et al*, 2010). Al múscul TVA de ratolins P5 es van quantificar el nombre de NMJs que contenien agregats de NF en els terminals presinàptics. En els ratolins AME, el percentatge va ser d'un 48%±5,4%, mentre que no es va trobar agregats en els WT (NMJs analitzades: n=97 de 4 ratolins WTT1, i n=235 de 6 ratolins SMAT1). Una característica del desenvolupament dels terminals sinàptics és la poli-innervació, que es va perdent a mesura que les NMJs van madurant (durant els primers 15 dies postnatsals; Lee *et al.*, 2011). Els resultats obtinguts del recompte del número d'axons per NMJ (**Fig. 36D-E**) en les preparacions de *whole mount* dels músculs LAL i Diaph a P5 en ratolins SMAT1, indiquen que el LAL té un increment de la poli-innervació mentre que el Diaph pràcticament no està afectat. Aquest resultat ens indica un retard en la maduració de les NMJs. Lee *et al.* (2011) van observar, al solí, un augment no significatiu de la poli-innervació en animals SMAΔ7 respecte els WT; aquesta divergència respecte els nostre resultats pot ser deguda al model animal i al tipus muscular escollit.

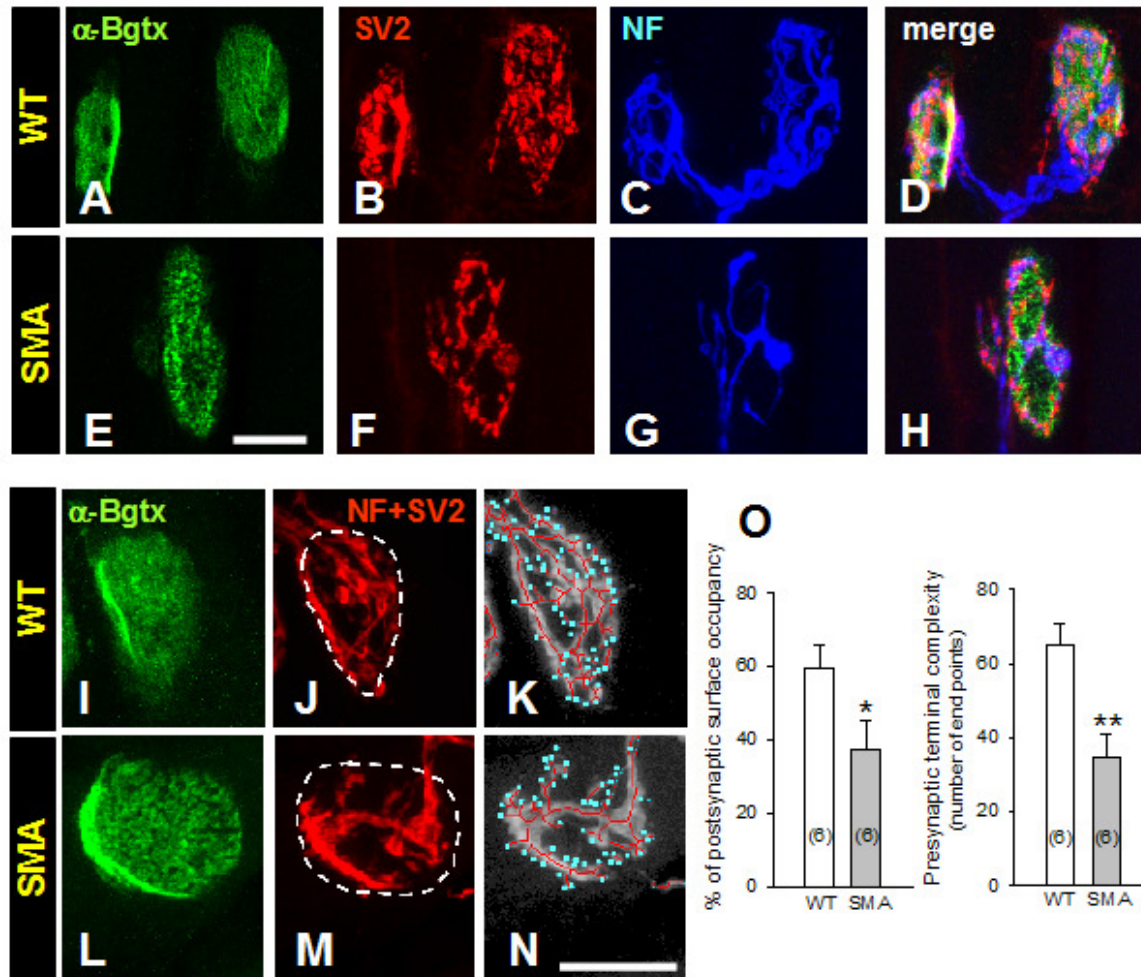


Figura 35. Patologia de les unions neuromusculars en el model animal d'AME tipus 1 (SMAT1). Imatges obtingudes amb el microscopi confocal de whole mounts amb triple marcatge fluorescent en el múscul TVA d'animals P6 WT (A - D) i SMA (E - H). L'estudi de l'estructura presinàptica amb marcatge en les vesícules presinàptiques amb SV2 (vermell), el citoesquelet amb el NF (blau) i l'aparell postsinàptic amb l'α-Bgtx (verd). S'observa una simplificació de les NMJs en els SMAT1. (I - O) En imatges d'estructures presinàptiques completes amb els marcadors SV2 i NF es va mesurar la complexitat de les NMJs. Un cop obtingut l'esquelet, es van comptar el nombre d'axons terminals (punts a (K i N)), que ens indiquen la complexitat de la sinapsi. Les mateixes imatges es van utilitzar per calcular l'ocupació del nervi en el terminal postsinàptic (O). Els números entre parèntesi es refereixen al nombre d'animals analitzats, *p<0,05 i **p<0,01 vs WTT1 (t-Student). Escala E = 10µm (vàlid per A - H); N = 10µm (vàlid per I - M)

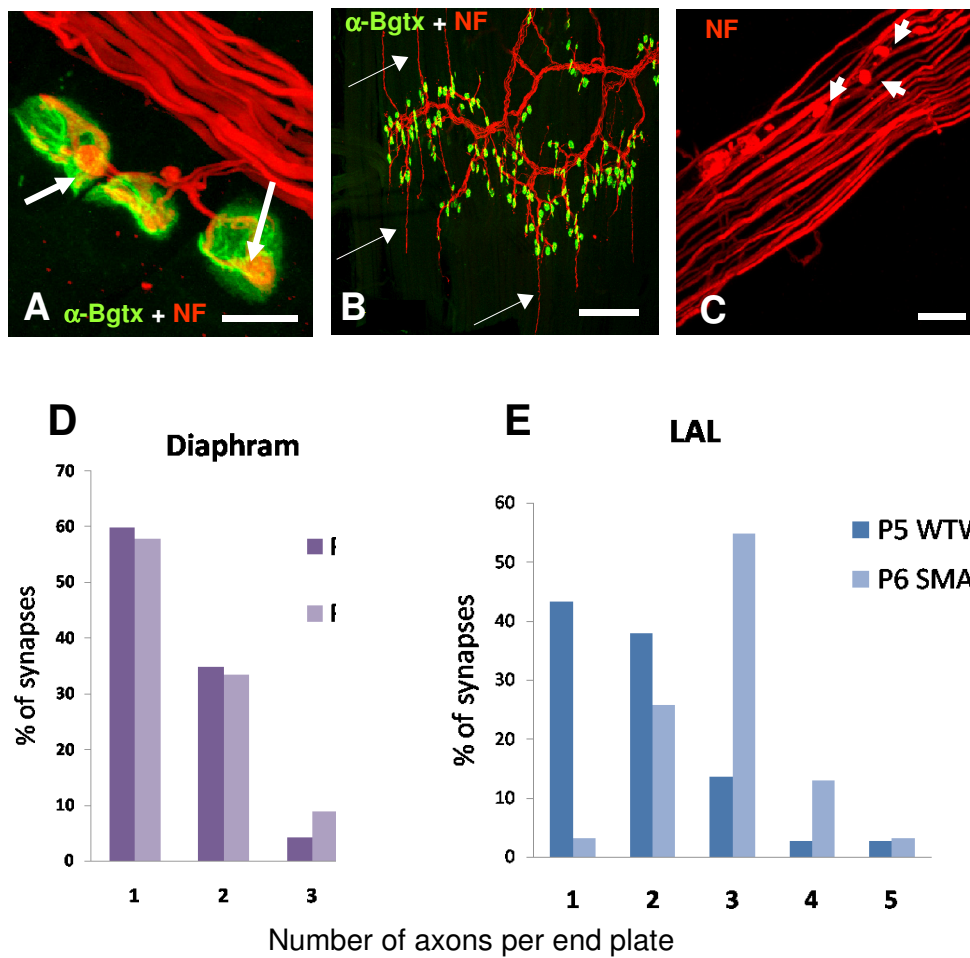


Figura 36. Imatges que mostren l'acumulació de NF als terminals motors (fletxes en [A]) en el Diaph de ratolins SMAT1 a P5. Creixements dels axons que sobrepassen la membrana postsinàptica en el múscul LAL de P5 (fletxes a [B]). El marcatge en A i B, en vermell el NF i en verd la α -Bgtx. (C) protuberàncies axonals (fletxes) que s'observen als nervis intra-musculars d'un Diaph a P5. (D) i (E) número d'axons per terminal sinàptic en el Diaph i LAL de ratolins SMAT1 i WTT1. Escala A = 10 μ m; B = 100 μ m; R = 10 μ m .

Objectiu

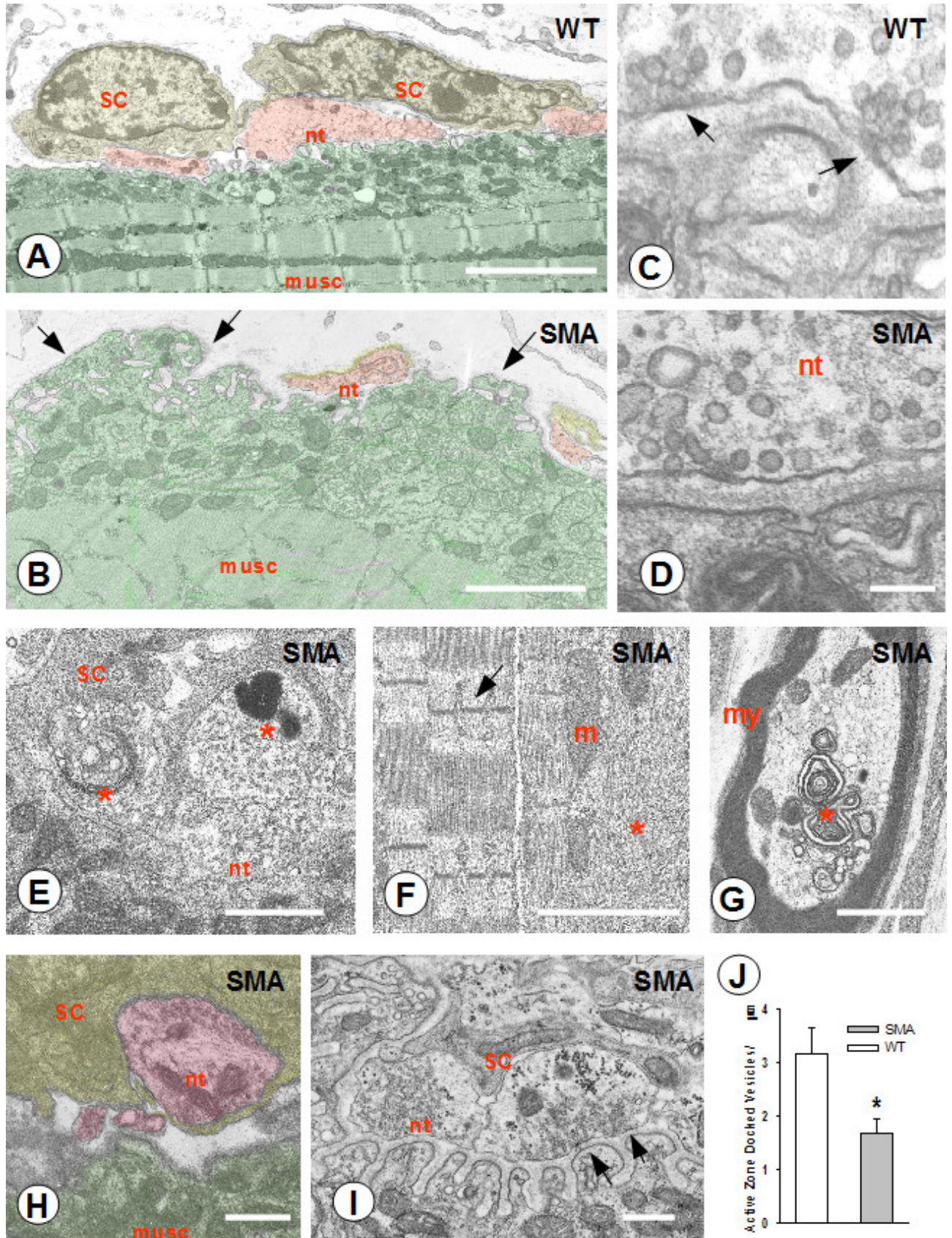
Caracterització dels canvis ultraestructurals, estudi de l'apoptosi i morfometria del múscul en el model murí agut d'atròfia muscular espinal (SMN^{-/-};hSMN2^{+/+}).

23 Canvis ultraestructurals en els ratolins SMAT1

Els músculs IC, TA, Diaph i TVA de ratolins SMAT1 i WTT1 nounats i terminals es van analitzar al microscopi electrònic (**Fig. 37A-J**). Es van observar alteracions en les NMJs, a les cèl·lules musculars i als nervis intramusculars en tot els músculs SMAT1 analitzats. Es va observar una gran variació en la mida dels botons sinàptics, fet normal en les sinapsis en procés de maduració (P5-6). No obstant, els terminals sinàptics dels SMAT1 respecte els controls eren mot més petits i sovint es trobaven separats de la membrana postsinàptica deixant àrees del terminal postsinàptic desocupades (**Fig. 37A-B**). En alguns casos, aquests terminals presinàptic desenganxats de la membrana postsinàptica estaven embolcallats per digitacions terminals de les cèl·lules de Schwann, suggerint la participació activa d' aquestes cèl·lules en l'eliminació de les terminacions nervioses dels llocs postsinàptics (**Fig. 37H**). La mida de les vesícules dels SMAT1, en el terminals presinàptics, no varia respecte la dels WTT1 (WTT1 = $51,7 \pm 0,3$ nm, SMAT1 = $53,4 \pm 0,3$ nm), però el nombre de zones actives i les seves vesícules associades estan reduïdes, evocant possibles deficiències en l'alliberació dels NTs causades per aquesta alteració (**Fig. 37C, D-J**). El nombre d'estructures d'autofagosomes / lisosomes-like es troba també incrementat en els terminals dels SMAT1 (**Fig. 37E**), així com acúmuls de NF als terminals presinàptics, prèviament descrits per Cifuentes-Diaz *et al.* (2002). La majoria d'axons dels nervis intramusculars tenen una aparença normal, de tant en tant, però es poden observar estructures semblants als autofagosomes, que ens indicarien axons en procés degeneratiu (**Fig. 37G**). Els músculs, en especial el TA i el TVA, dels ratolins SMAT1 terminals, mostren zones amb les miofibril·les i la banda Z desorganitzades (**Fig. 37F**), la desorganització de la banda Z s'havia identificat prèviament en un model de *Drosophila* (Rajendra *et al.*, 2007). Dins la làmina basal dels músculs IC i TA, de ratolins SMAT1, es troben amb freqüència cèl·lules apoptòtiques mononucleades (**Fig. 38A-B**), possiblement, són apoptòtiques de cèl·lules satèl·lit (Bischoff *et al.*, 2004). Aquestes cèl·lules apoptòtiques estan sovint embolcallades per cèl·lules d'aparença macrofàgica sovint amb cossos apoptòtics en el seu interior; aquestes cèl·lules, es troben a la zona interna de la làmina basal del múscul. Immunocitoquímica per la laminina (que ens dibuixa la làmina basal) i la reacció TUNEL (que ens indica l'apoptosi) en talls de criostat del múscul TA,

confirmen que un 46,3% ($\pm 5,5\%$ n = 3 SMAT1 a P5-6) de les apoptosis es troben a l'interior de la làmina basal (**Fig. 38C-C'**), indicatiu de cèl·lules satèl·lit (Hyatt *et al*, 2003). Per confirmar que es tractava de cèl·lules satèl·lit es va aplicar TUNEL combinat amb Pax7 (**Fig. 38D-D'**). Malauradament no hi va haver col·localització, possiblement degut als canvis que pateix una cèl·lula en apoptosi, que impliquen activitat proteolítica i canvis severes en l'estructura de la cromatina, es possible que Pax7 es destrueixi durant el procés apoptòtic, o bé que les cèl·lules satèl·lit morin al destruir-se Pax7 (Bernasconi, M 1996). El 53,7% de cèl·lules apoptòtiques restants corresponien a cèl·lules intersticials.

Figura 37. Microscòpia electrònica de les unions neuromusculars (NMJs) i de les cèl·lules musculars en l'atròfia muscular espinal (AME) tipus I. (A) Organització normal en el contacte entre els nervis terminals (nt, vermell) i les cèl·lules musculars (musc, verd) en les NMJs del múscul intercostal (IC) de ratolins WTT1 a P5. Els terminals sinàptics estan envoltats per les cèl·lules de Schwann (SC, groc). (B) NMJ del IC d'un ratolí SMA a P5, es veu una reducció en el nombre i la mida dels terminals sinàptics deixant gran part de la membrana postsinàptica (fletxes) desocupada. (C i D) Grups de vesícules propers a la membrana presinàptica formant les zones actives en el múscul d'un WTT1 (C); als SMAT1 no s'observa l'organització de les vesícules a les zones actives (D). (E) Als terminals presinàptics del TA en SMAT1 s'hi localitzen, sovint, vacuols amb aparença d'autofagosomes i inclusions lisosomals (*). (F) Ruptura de l'organització del miofilament amb la dissolució de la banda Z (*), al múscul TA d'un ratolí SMAT1 a P5, comparat amb una altra zona del mateix múscul amb les bandes Z intactes (fletxa). (G) Axó mielinitzat (my) en degeneració dins un nervi intramuscular amb un alt contingut d'acumulacions anormals d'òrgànuls multi-lamel·lars i membranes de vesícules, en un múscul TA d'un SMAT1 a P5. (H) Prolongació d'una cèl·lula de Schwann (SC, groc) embolcallant el terminal d'un axó (nt, vermell) que està desenganxat de la membrana postsinàptica, en el TA d'un SMAT1 a P5; la cèl·lula postsinàptica està marcada en verd; en vermell un nervi atròfic està en contacte amb la membrana postsinàptica. (I) Ultraestructura dels terminals nerviosos (nt) amb les zones actives ben organitzades (fletxes) i la membrana postsinàptica replegada d'una NMJ en el Diaph d'un SMAT1 a P5. (J) Quantificació del nombre de vesícules sinàptiques ancorades a les zones actives; el nombre de vesícules va en funció de la llargada de la membrana presinàptica; les dades s'han obtingut després d'analitzar 13 NMJs. * $p < 0,05$ versus WTT1 (t-Student). Escales A = 3,6 μm ; B = 2,3 μm ; C = 0,1 μm (vàlid per D); E = 1,16 μm ; F = 2,3 μm ; G = 1,8 μm ; H = 0,9 μm ; I = 0,5 μm . En algunes imatges les estructures estan pintades.



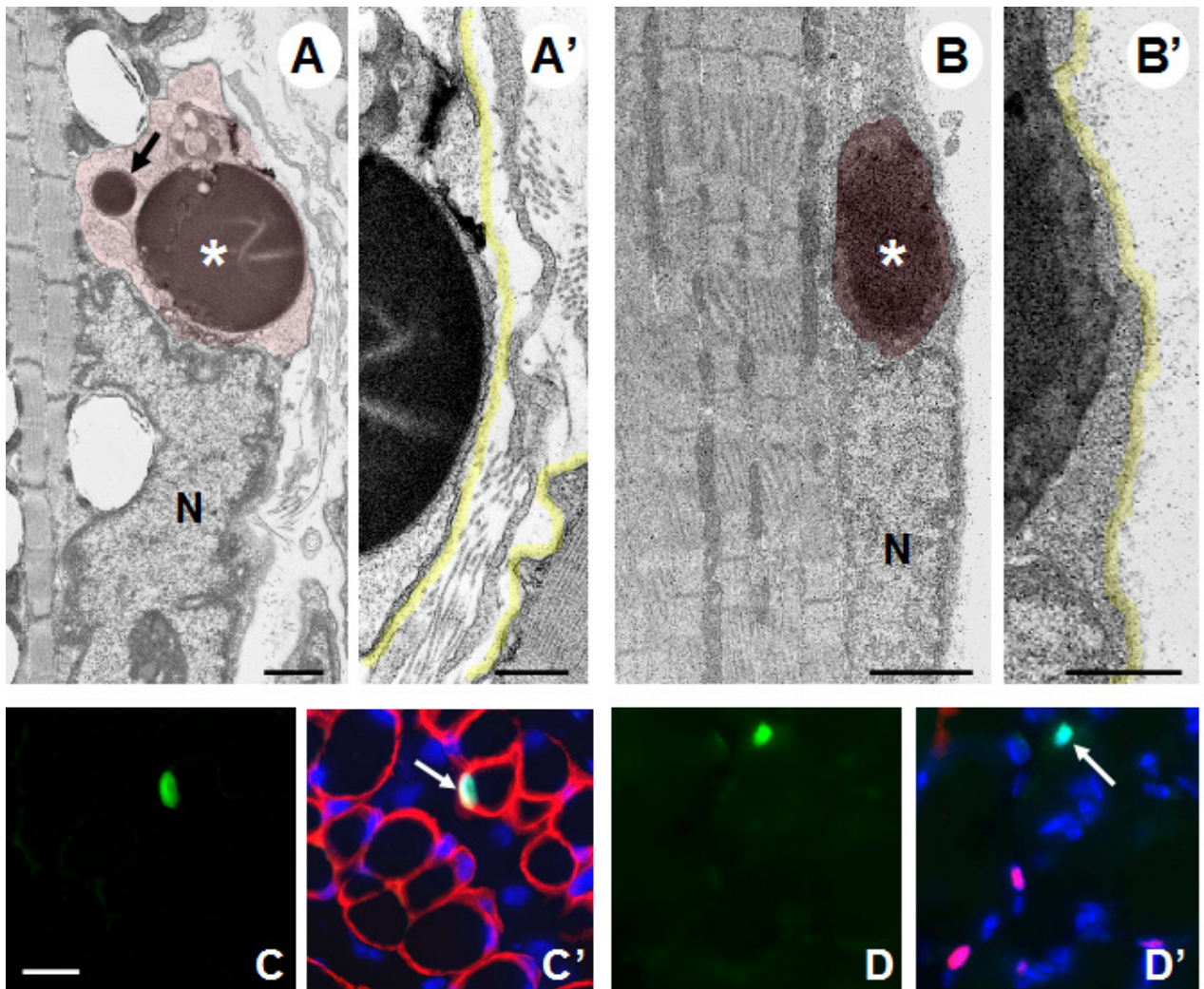


Figura 38. Apoptosi de les cèl·lules satèl·lit en ratolins SMAT1. (A - B'). Micrografies de microscopi electrònic d'una fibra de múscul esquelètic (IC) d'un SMAT1 a P5, mostrant en vermell dues cèl·lules satèl·lit apoptòtiques amb els nuclis altament condensats (*); a (A) la cèl·lula apoptòtica mostra un cos apoptòtic en formació (fletxa). (A' i B') Micrografies a grans augmentes per mostrar que els cossos apoptòtics estan per sota la membrana basal del múscul (pintat groc). (C - C') Secció del TA amb marcatge TUNEL (verd) combinat amb la laminina (vermell) i 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (blau). Les cèl·lules TUNEL positives estan dins la làmina basal, com és d'esperar en cèl·lules satèl·lit. (D - D') Secció, d'un múscul TA, processada amb marcatge TUNEL (verd) i l'anticòs Pax7 (vermell) i DAPI (blau). Els nuclis TUNEL positius no mostren immunoreactivitat per Pax7. Escala A = 1µm; A' = 0,5 µm; B = 2 µm; B' = 1 µm; C - D' 10 µm.

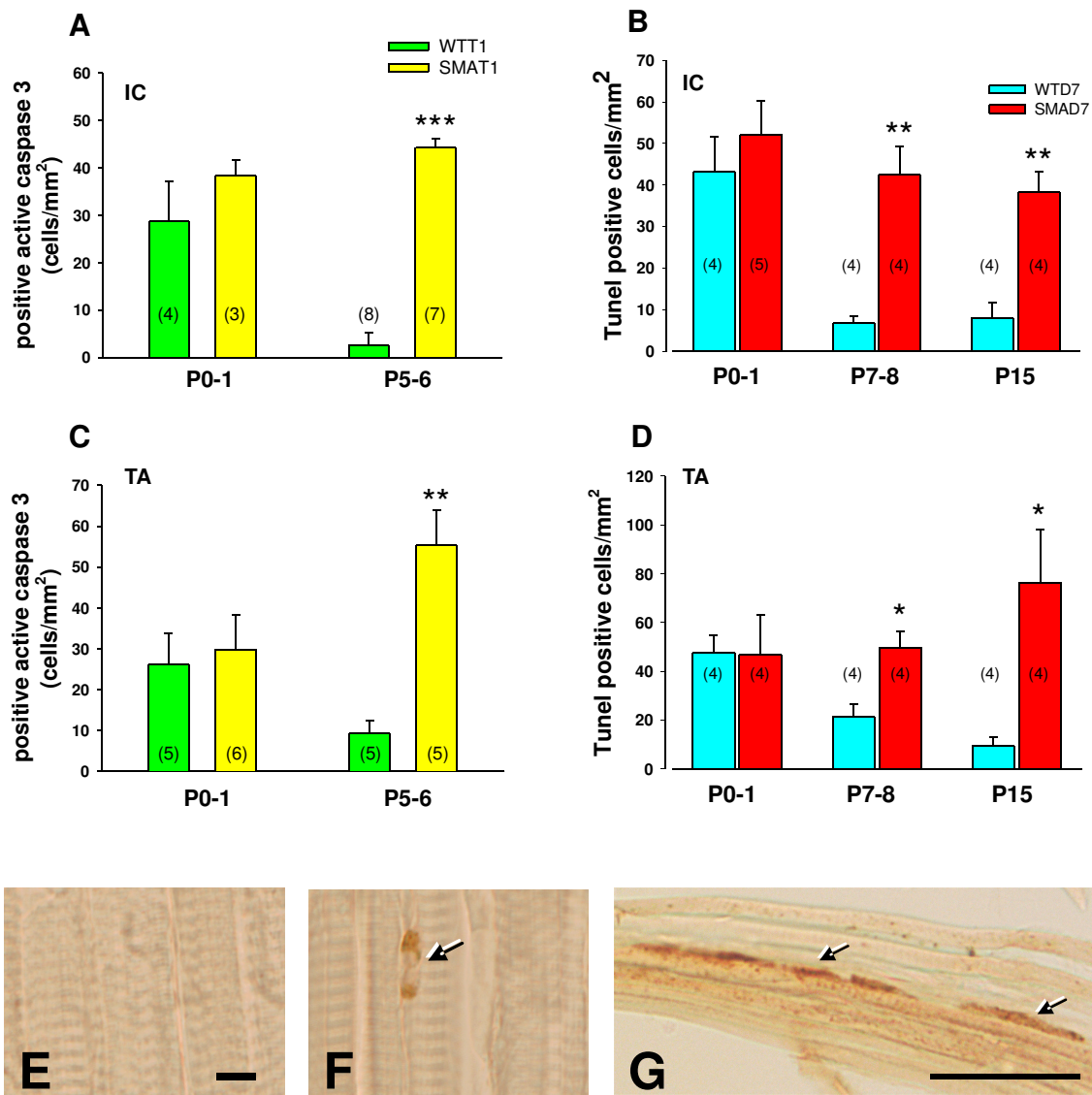


Figura 39. Apoptosi de les cèl·lules satèl·lit en dos models animals d'atròfia muscular espinal, SMA tipus 1 i SMA delta7. (A i B) Quantificació de les apoptosis en SMAT1 (A) amb la tècnica de immunocitoquímica (ICC) amb caspasa-3 i SMAD7 (B) amb la tècnica TUNEL en el múscul intercostal (IC). (C i D) Quantificació de les apoptosis en SMAT1 (C) amb la tècnica de ICC amb caspasa-3 i SMAD7 (D) amb la tècnica TUNEL en el múscul tibial anterior (TA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$ *versus* control, ANOVA seguida de Bonferroni (SMAT1) i t-Student (SMAD7). (E - G) Imatges representatives d'una ICC amb Caspasa-3 activa, (E) múscul TA d'un WTT1 a P5 mostrant l'absència d'apoptosi, (F) múscul TA d'un SMAT1 a P5 amb una cèl·lula apoptòtica (fletxa) a la fibra muscular, (G) múscul TA d'un WTT1 a P1 mostrant una fibra apoptòtica (fletxes). Escala E = 10 μ m (vàlid per F) i G = 50 μ m.

24 Increment de l'apoptosi en els músculs dels ratolins SMA tipus 1 i SMA delta 7

L'estudi de l'apoptosi muscular es va avaluar en els músculs IC i TA d'animals SMAT1 i SMA Δ 7 per immunotinció amb caspasa-3 (SMAT1) i reacció TUNEL (SMAT1 i SMA Δ 7). No s'observen diferències significatives en la densitat d'apoptosis en cap dels dos músculs estudiats en nounats dels dos models animals. En canvi, en edats terminals d'ambdós casos i a una fase intermèdia en els SMA Δ 7 (P7-8) s'observa un increment significatiu de l'apoptosi (**Fig. 39A-D**). En l'observació al microscopi òptic, les apoptosis es localitzen adjacents a les fibres musculars (**Fig. 39F**), i només en el cas de la caspasa-3 activa però tant a WTT1 com SMAT1, a P0-1, a part de cèl·lules mononucleades caspasa-3 positives hi ha la presència de fibres musculars apoptòtiques, indicant un procés de mort muscular natural en aquesta edat (**Fig. 39G**). Els resultats de TUNEL i caspasa-3 en els SMAT1 són similars, pel que fa a SMA Δ 7, s'expressen els resultats en TUNEL ja que les immunocitoquímiques amb la caspasa-3 donaven un patró erroni, amb molta positivitats inespecífica, i vàrem descartar els resultats.

Per discriminar si l'apoptosi és un procés intrínsec del múscul esquelètic dels animals amb AME o és una resposta secundària a la denervació, vàrem procedir a axotomitjar el nervi ciàtic d'animals WTT1 a P0-1. A les 48 i 72 hores posteriors a l'axotomitjació es van sacrificar els animals i es va procedir al recompte de cèl·lules caspasa 3 positives en els músculs TA, utilitzant el costat contralateral (costat innervat) com a control. Les diferències entre el costat ipsi- i contralateral no van resultar ser significatives en cap de les dues edats post-axotomia (48h després ipsilateral = $5,1 \pm 1,7$, contralateral $8,3 \pm 4,4$ n = 3; 72h després: ipsilateral $23,8 \pm 12,6$, contralateral $24,8 \pm 17,2$ n = 2, expressat com a apoptosis/mm²). És important mencionar que la majoria de les MNs de rates que han patit una axotomia del nervi ciàtic, després del naixement moren en les primeres 48h després de la secció nerviosa (Casanovas *et al*, 2001).

Una de les característiques de l'AME en humans, és la coexistència de 3 tipus de fibres musculars, fibres aparentment normals, fibres atrofiques i fibres hipertròfiques (**Fig. 40C**). En el model animal d'AME tipus 1, s'observa la presència de dues poblacions de fibres d'acord amb el seu tamany, les aparentment normals, i les atrofiques (**Fig. 40B**). L'anàlisi morfomètric del múscul TA en els animals SMAT1, denota un desenvolupament normal en el nou-nats, i una aturada en el desenvolupament muscular en els animals afectats a P5, que queda reflectit en l'histograma de la freqüència relativa de l'àrea de les fibres, on les poblacions de fibres WT es desplacen cap a la dreta (tendeixen a un creixement), mentre que l'àrea de les fibres dels animals amb AME es manté com a P1, denotant un retard/aturada del creixement (**Fig. 40E**).

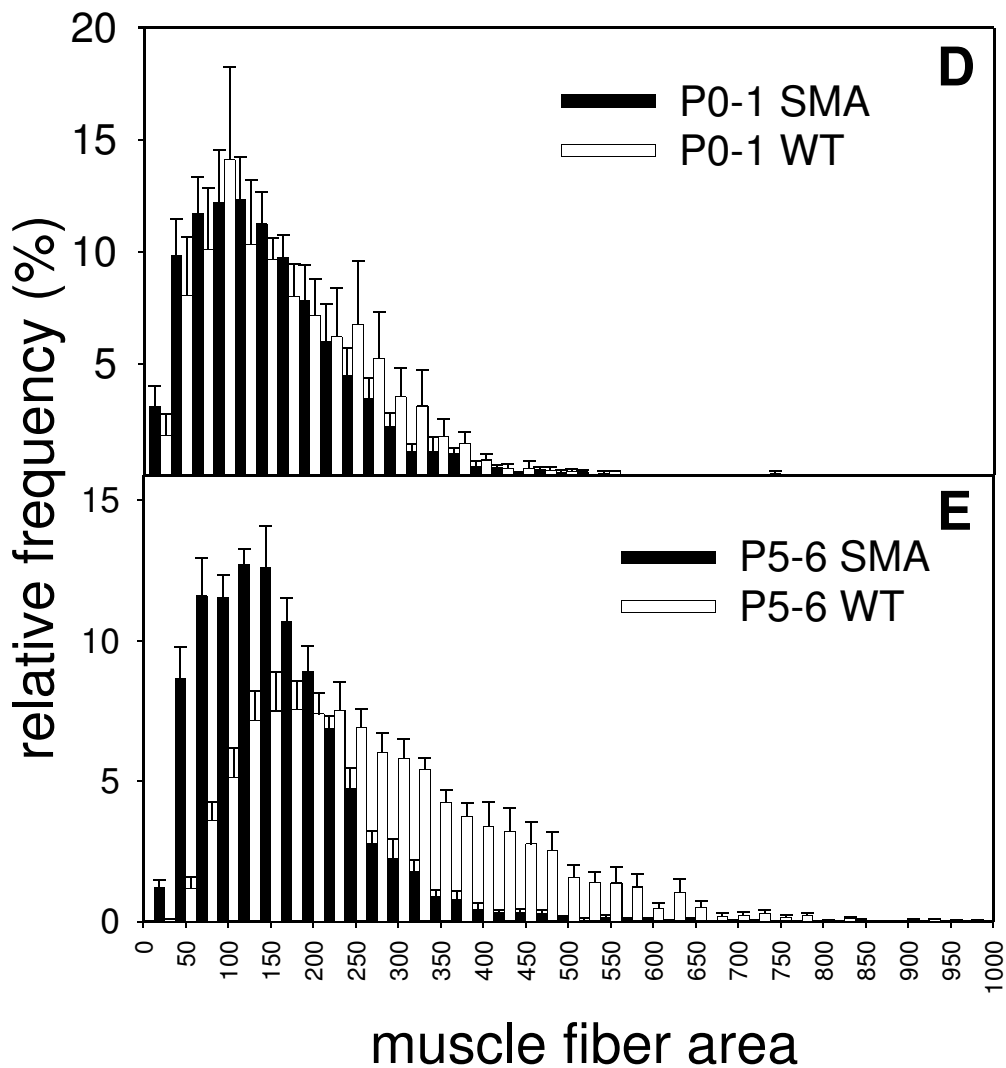
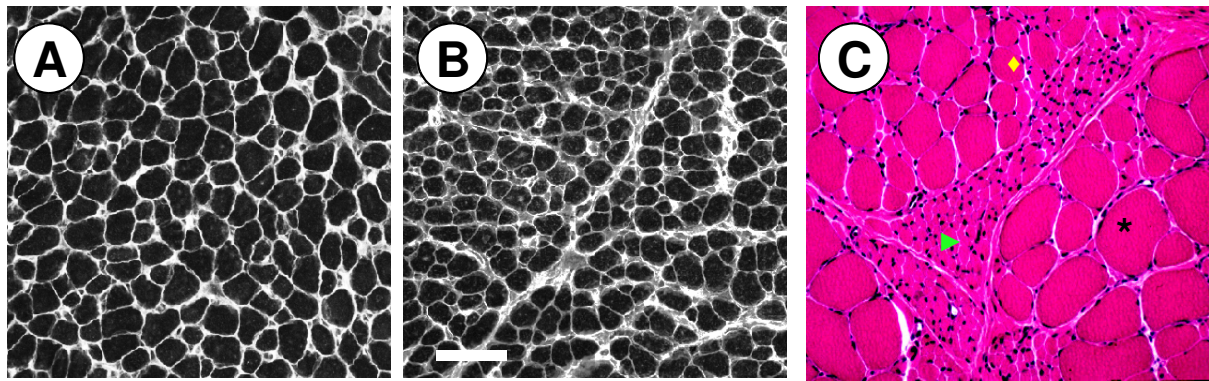


Figura 40. Histograma de la freqüència relativa de l'àrea de les fibres musculars del Tibial anterior (TA) en animals SMAT1 i els seus WTT1 control a l'edat de P0-1 i P5-6. (A i B) Imatges representatives d'una secció de múscul TA tallat transversalment i tenyit amb la lectina wheat germ agglutinin (WGA) d'un WTT1 a P5 (A) i d'un SMAT1 a P5 (B) usades per fer histometria. (C) Imatge histològica d'una biòpsia de múscul d'un pacient AME, [(*) fibra hipertròfica, (▶) fibres atròfiques, fibra (♦) aparentment normal] obtinguda del departament de Neuropathology de la Northeast Ohio University (<http://neuropathology-web.org>). (C i D) Histograma de la mida de la fibra muscular (\pm SEM) del TA de ratolins SMAT1 nous (P0-1) pràcticament no s'hi observen diferències, i ratolins terminals (P5-6) amb un desplaçament cap a la dreta dels WTT1, indicant la maduració muscular (n = 3-6). Escala a B = 60 μ m (vàlid per A).

Objectiu

Caracterització de l'estat dels macròfags i de dos òrgans del sistema immunitari en dos models d'atròfia muscular espinal.

25 Depleció dels macròfags intersticials en SMAT1

L'observació al microscopi electrònic va posar de manifest un augment, aparent, en l'apoptosis i el posterior reclutament de macròfags en músculs de ratolins afectats per l'AME tipus 1. Per determinar l'estat dels macròfags intersticials en els músculs IC, TA, Ling i StM es va procedir a tècniques immunohistològiques en talls de criostat amb l'anticòs Iba-1, per posteriorment calcular la densitat de macròfags (**Fig. 41E-H**). El resultat, en tots els músculs SMAT1 estudiats, va ser sorprenent, nosaltres esperàvem trobar més densitat de macròfags en els SMAT1 respecte dels WTT1, i les troballes van ser a l'inversa, hi havia una reducció de macròfags en els SMAT1 en la fase terminal de la malaltia (**Fig. 41A-B**). L'observació d'aquests en animals nounats no va mostrar diferències significatives. Vàrem analitzar l'expressió de la proteïna quimiotàctica 1 (MCP-1), un factor implicat en reclutar monòcits al teixit connectiu, als músculs de la pota de ratolins SMAT1 i WTT1. Com es pot observar a la figura **41C i D**, MCP-1 està significativament disminuït a l'edat de P5-6. Per determinar si la depleció de macròfags és teixit-específic, es va mesurar la densitat de macròfags al fetge i a la melsa d'animals WTT1 i SMAT1 a P5-6 i no es van observar diferències significatives (**Fig. 41I**). El mateix anàlisi en els músculs IC i TA de ratolins WT Δ 7 i SMA Δ 7 només va indicar diferències significatives en el múscul IC dels SMA Δ 7 nounats (**Fig. 41A-B**).

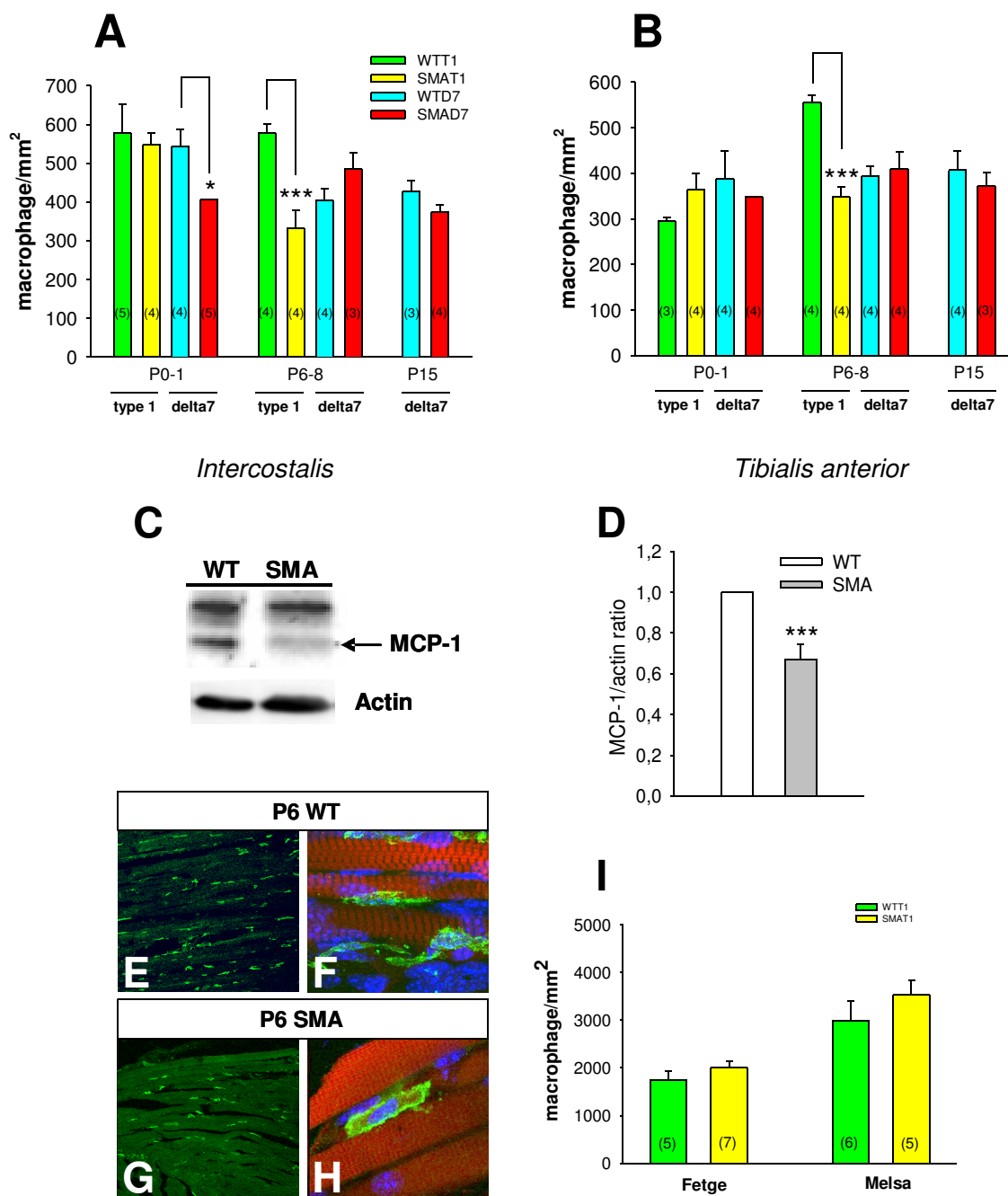


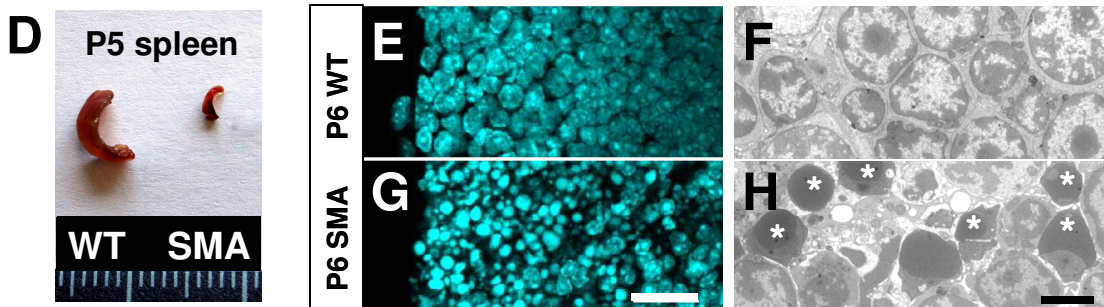
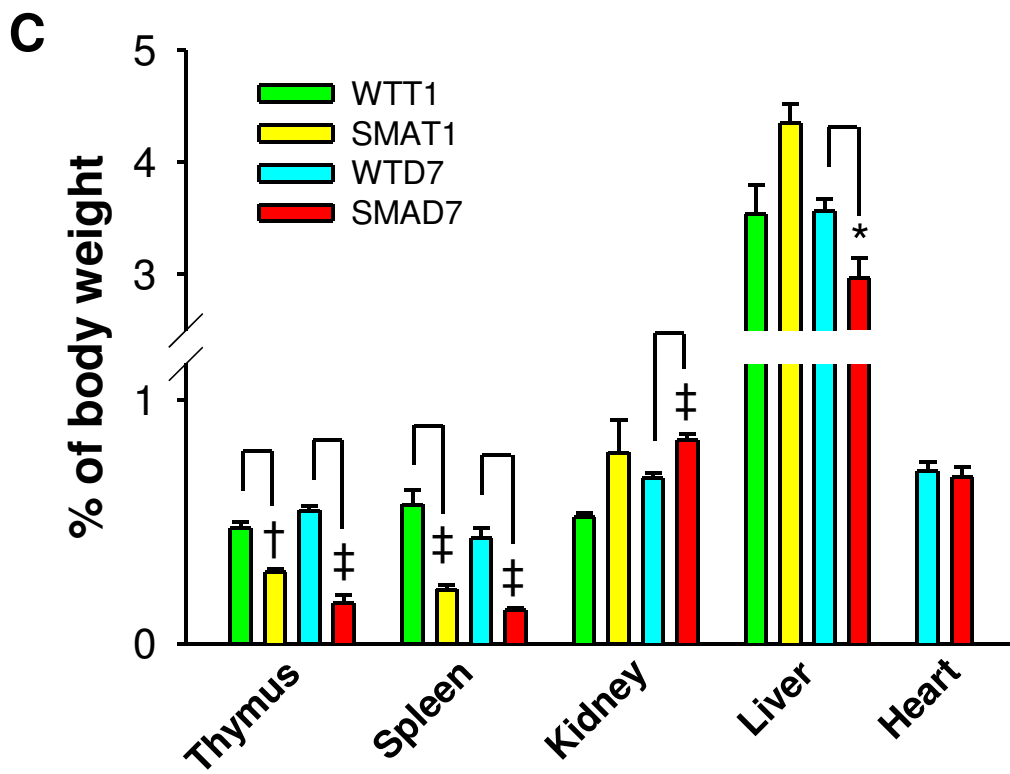
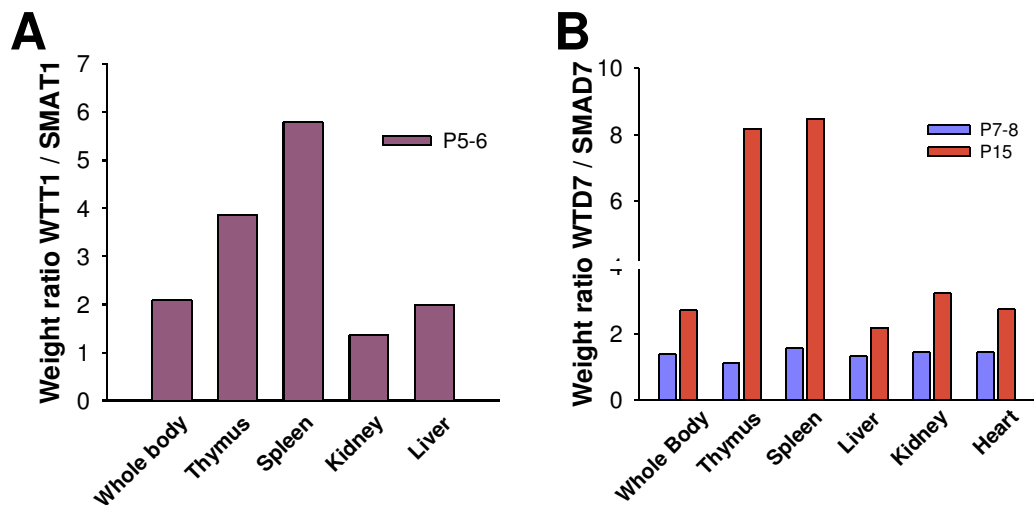
Figura 41. Depleció de la densitat de macròfags en ratolins AME tipus 1 i delta7. (A i B) Quantificació de la densitat dels macròfags intersticials en els músculs IC i TA de ratolins SMAT1 i SMAΔ7, s'observa una depleció de la densitat dels macròfags en els SMAT1 a l'edat de P5-6 en ambdós músculs, i una depleció a P0-1 al múscul IC dels SMAΔ7. (C) Western blot (WB) d'extractes de músculs de la pota d'animals SMAΔ7 i WTΔ7, s'observa una disminució de la proteïna quimiotàctica 1 (MCP-1) en els SMAT1 a P5-6. (D) Quantificació de les dades del WB. (E-H) Imatges de seccions de criostat del múscul TA de ratolins WTT1 (E i F) i SMAT1 (G i H), immuno-tenyides amb Iba-1 (verd) i contrastades amb Phalloidin, per detectar l'actina (vermell) i DAPI per detectar el DNA (blau). (I) quantificació de la densitat de macròfags al fetge i a la melsa d'animals SMAT1 i WTT1, no s'observen diferències significatives. * $p < 0.05$ i *** $p < 0.001$ t-Student. Escala E = 100μm (vàlid per G) i F = 10μm (vàlid per H); les llegendes en A val per B; les llegendes en I valen per D.

26 Afectació dels òrgans del sistema immunològic en ratolins SMA tipus 1 i SMA delta7

Els òrgans del sistema immunitari dels animals SMAT1 i SMA Δ 7 pateixen una aplàsia severa, els pesos de la melsa i del timus estan reduïts de 4 a 6 vegades en els AME tipus 1 i unes 8 vegades en els AME delta 7 respecte els respectius controls, WTT1 i WT Δ 7 (**Fig. 42A-B**). Pràcticament no s'observen diferències en la proporció òrgan/pes corporal d'altres òrgans com els ronyons, el fetge i el cor, indicant que els distints òrgans responen de manera diferent a la malaltia. En l'estudi del pes relatiu dels òrgans respecte el pes corporal, s'observen diferències significatives en el timus i la melsa dels dos models animals estudiats, pel que fa als SMA Δ 7 terminals, també s'observen diferències significatives en els ronyons i el fetge (**Fig. 42C**). Es va calcular la proporció i el percentatge del pes corporal dels òrgans en animals simptomàtics, però no terminals, dels SMA Δ 7 i no es van observar diferències significatives en cap d'ells (**Fig. 42B**).

Estudis histològics amb tinció d'hematoxilina-eosina en seccions de parafina, tinció amb DAPI en seccions de criostat, seccions semifines tenyides amb blau de toluïdina i microscopia electrònica, van mostrar que 8 dels 11 animals SMAT1 estudiats, patien una apoptosi massiva dels limfòcits de l'escorça del timus en l'estadi terminal de la malaltia.

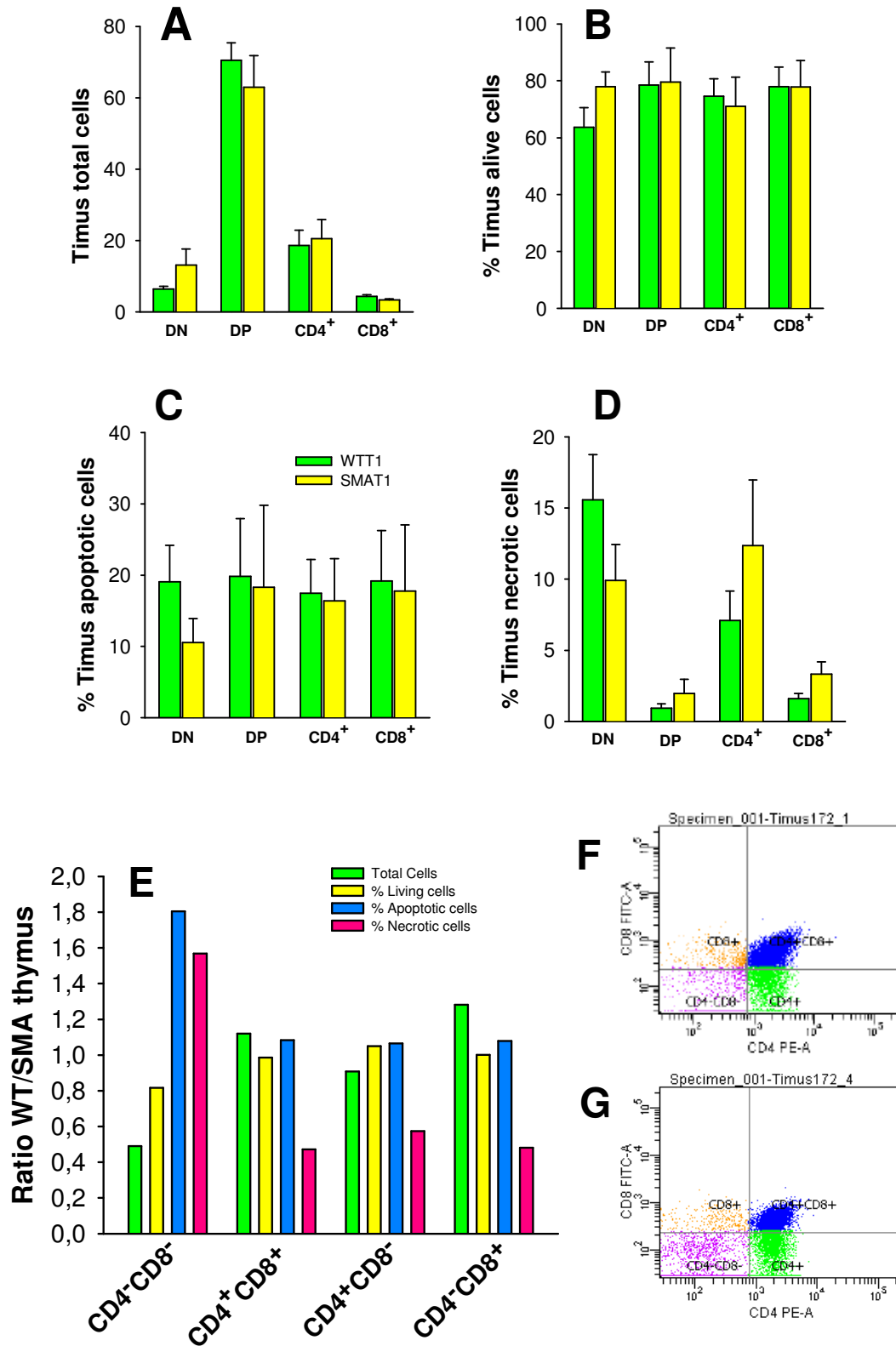
Figura 42. Atròfia dels òrgans del sistema immunològic en els models d'AME tipus 1 i delta 7. (A i B) Diagrames de la ratio del pes dels òrgans WT/SMA mostren una atròfia selectiva dels òrgans del sistema immunològic en les etapes terminals de la malaltia en SMAT1 (A) i SMA Δ 7 (B); no s'observen diferències en els SMA Δ 7 simptomàtics (P7). (C) Diagrames del pes relatiu dels òrgans, indiquen una atròfia selectiva de la melsa i del timus en els dos models animals. S'observa una afectació lleugera en el fetge dels SMA Δ 7 terminals. Els ronyons dels SMAT1 i SMA Δ 7 mostren un lleuger increment de pes en els animals afectats, que és significatiu en els delta7. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ i ‡ $p < 0.001$ vs control (*t*-Student). (D) Imatge representativa de la macro-morfologia de la melsa d'un ratolí terminal SMAT1 i WTT1 on es pot observar una atròfia severa en la melsa dels SMA vs els WT. (E-H) Imatges representatives de la histologia del timus de ratolins SMAT1 i WTT1 a P6. Els limfòcits corticals dels SMAT1 mostren una apoptosi massiva evidenciada amb una tinció amb DAPI (G) i per microscòpia electrònica (* a H). Escala G = 20 μ m (vàlid per E) i H = 5 μ m (vàlid per F). Les divisions petites a (D) corresponen a mil·límetres.



26.1 Estudi de les poblacions de limfòcits al timus amb citometria de flux

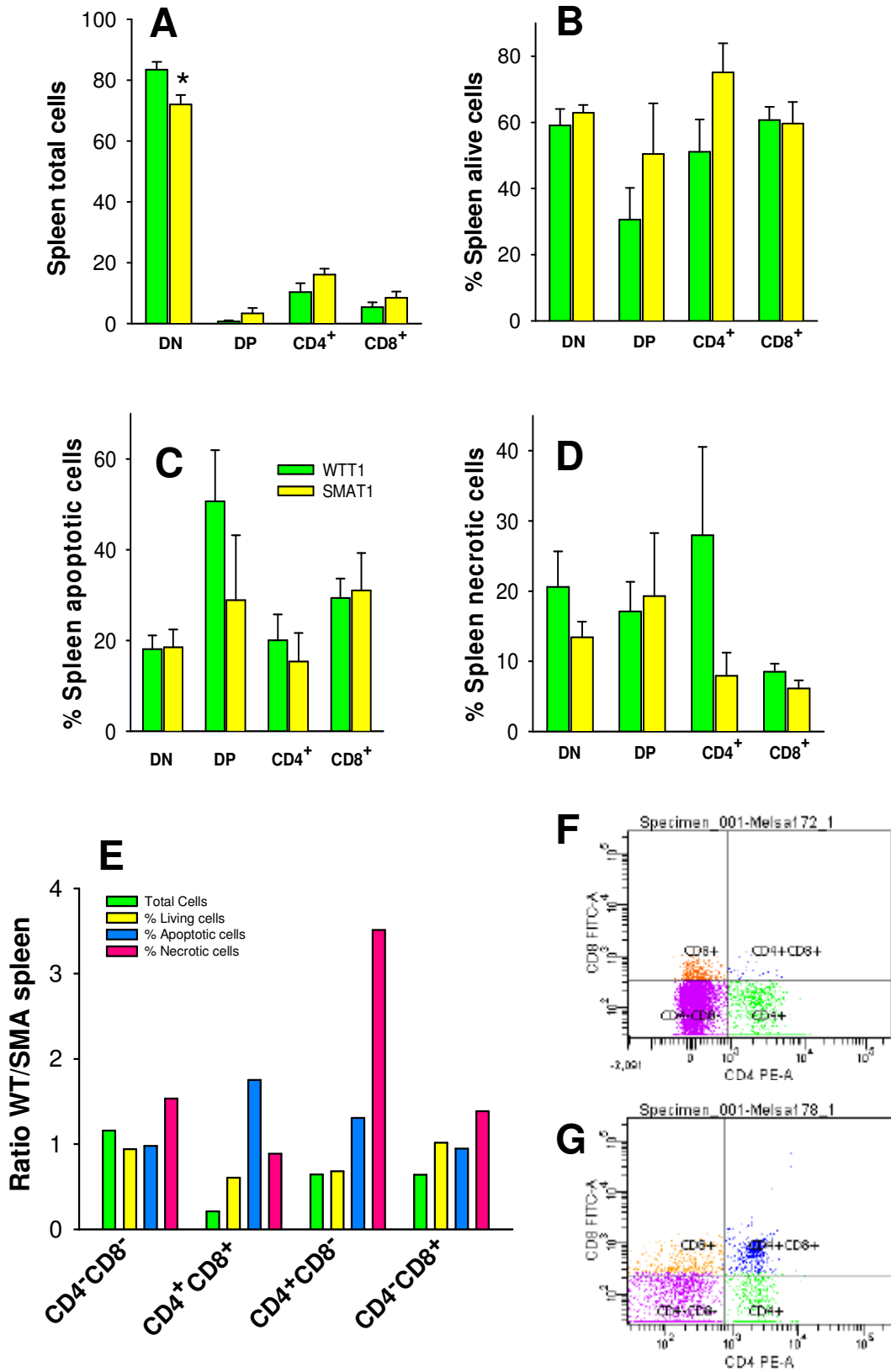
L'afectació macroscòpica de la melsa i del timus, i l'alt increment d'apoptosis al timus d'animals SMA, ens indica una possible afectació dels tipus cel·lulars que formen aquests dos òrgans, per exemple dels limfòcits. Per tal de determinar si hi ha alguna població de limfòcits afectada al timus i/o a la melsa de ratolins SMA tipus I a l'edat de P5-6 es va procedir a estudis de citometria de flux (**Figs. 43-44**). En un timus d'un ratolí adult se trobem una proporció del 80% cèl·lules doble positives (DP) (CD4⁺CD8⁺), un 5% de doble negatives (DN) (CD4⁻CD8⁻), un 12% de CD4⁺CD8⁻, i un 3% de CD4⁻CD8⁺ (Abbas). Els resultats de citometria de flux del timus dels nostres ratolins SMAT1 respecte dels WTT1 a l'edat de P6 (**Fig. 43**) no donen diferències significatives, no obstant, podríem destacar que les principals alteracions afecten a un increment de DN (el doble) en els SMAT1 respecte els WT en les cèl·lules totals (**Fig. 43A**), i que la mort de les CD4⁺, CD8⁺ i DP es produeix bàsicament per necrosi i no apoptosi (**Fig. 43C-D**).

Figura 43. Resultats en forma de gràfica de la citometria de flux aplicada al timus de ratolins SMAT1 i WTT1 a l'edat de P5-6. (A) En el recompte de limfòcits totals del timus s'observa una tendència a l'increment de doble negatiu (DN)(CD4⁻CD8⁻) i una disminució de doble positiu (DP)(CD4⁺CD8⁺), no significatiu, en els SMAT1 respecte dels WTT1. (B) S'observa una tendència, no significativa, a la disminució de DN en els SMAT1 respecte dels WT. (C) Tendència, no significativa a la disminució de les DN en el percentatge de cèl·lules apoptòtiques dels ratolins SMAT1 respecte dels WTT1. (D) Tendència, no significativa, a la disminució de cèl·lules DN necròtiques i tendència, a l'increment de cèl·lules necròtiques DP, CD4⁺ i CD8⁺ en els animals SMA. (E) Representació de la ratio WT/SMA en les diferents poblacions de limfòcits i marcadors estudiats. (F i G) Imatge representativa del resultat de la citometria de flux de dos ratolins un WT (F) i un SMA (G), no s'observen diferències evidents. (ANOVA seguida de Bonferroni).



Els resultats de citometria de flux a la melsa (**Fig. 44**) es destaca una disminució significativa en el nombre total de limfòcits doble negatius (DN) (gairebé 3 punts per sobre dels WT) i un increment, no significatiu, de la resta de poblacions de limfòcits estudiades dels SMA respecte dels WT (**Fig. 44A**). Increment, no significatiu, del percentatge de DP vius, és insòlit que es trobin altes proporcions de DP a la melsa, donat que la seva ubicació és al timus. S'observa també un increment, no significatiu, en el percentatge de cèl·lules vives de CD4⁺ (**Fig. 44B**) en els ratolins SMA respecte dels WT, i una disminució de l'apoptosi en les DP (**Fig. 44C**) i de la necrosi (**Fig. 44D**) en les DN i CD4⁺.

Figura 44. Resultats en forma de gràfica de la citometria de flux aplicada a la melsa de ratolins SMAT1 i WTT1 a l'edat de P5-6. (A) En el recompte de cèl·lules totals de la melsa s'observa una disminució significativa de la població de limfòcits doble negatius (DN) (CD4⁻CD8⁻), així com una tendència, no significativa, a l'increment dels doble positius (DP) (CD4⁺CD8⁺), CD4⁺ i CD8⁺, respecte dels WTT1. (B) S'observa una tendència, no significativa, a l'increment dels limfòcits DP i CD4⁺ en els SMAT1 respecte dels WTT1. (C) Tendència, no significativa a la disminució de les cèl·lules DP i CD4⁺ increment en el percentatge de cèl·lules apoptòtiques dels ratolins SMAT1 respecte dels WTT1. (D) Tendència, no significativa, a la disminució de la necrosi en els limfòcits DN, CD4⁺ i CD8⁺. S'observa també un lleuger augment del percentatge de necrosi en els limfòcits DP en els animals SMAT1. (E) Representació de la ratio WT/SMA en les diferents poblacions de limfòcits i marcadors estudiats. (F i G) Imatge representativa del resultat de la citometria de flux de dos ratolins un WTT1 (F) i un SMAT1 (G), s'observen diferències evidents en la població de DP pràcticament inexistent en els WTT1 i amb alta freqüència en els SMAT1, així com una distribució més espaiada en les poblacions de limfòcits DN i CD8⁺. * p<0,05, (ANOVA seguida de Bonferroni).



Objectiu

Determinar si el liti, un potent i efectiu catió en desordres psiquiàtrics com el trastorn bipolar. Implicat en la inhibició d'enzims multifuncionals com la GSK-3 β , i amb efectes neuroprotectors, produeix alguna millora en un model murí d'atròfia muscular espinal.

27 Estudi del tractament amb liti en animals SMAΔ7

Els ratolins utilitzats per a fer l'estudi terapèutic amb el liti han estat els *mSmn*^{+/-}; *hSMN2*^{+/+}; *SMNΔ7*^{+/+} (SMAΔ7), catalogats com a SMA tipus I o tipus II en funció de l'autor. Els ratolins SMAΔ7 comencen a patir els primers símptomes de la malaltia al voltant de P5 i moren a les dues setmanes (P15-P17) per tant, són animals ideals per veure l'eficàcia d'un tractament, donat que s'obtenen resultats molt ràpidament, de fet és el model més emprat en els estudis de tractament (**Taula 2**). Per a aquest experiment es van distribuir els animals en 6 grups: WTΔ7 i SMAΔ7 salí, WTΔ7 i SMAΔ7 1mEq liti i WTΔ7 i SMAΔ7 2mEq liti. L'estadística de les proves, a menys que estigui indicat, sempre fa referència a SMAΔ7 respecte el WTΔ7 de la mateixa condició.

27.1 Millor dosi estimada pel tractament

Ratolins albins de la soca CD1, no modificats genèticament, es van emprar per determinar la dosi de LiCl més adequada per al tractament, la intenció era de tenir al voltant de 1mEq/L en plasma, dosi que s'ajusta a les terapèutiques en humans (0,6-1,2mM o mEq/L (Quiroz, JA 2004)). El LiCl s'administrava diàriament, des de P1 i aproximadament a la mateixa hora, amb una punció sub-cutània en dosis de 1, 2 i 3mEq/Kg/dia (d). Vàrem recollir mostres de sang després d'haver injectat els ratolins a les 6h, 12h, 24h, 3d, 7d i 10d posteriors a la injecció, el nombre de ratolins utilitzats per aquest fi varia en funció de l'edat de sacrifici (n = 4-16 ratolins). La dosi de 3mEq/L va resultar ser tòxica pels animals, a partir dels 8-10 dies post-injecció els animals presentaven símptomes de letargia immediata, fet que no passava amb les altres dues dosis, i morien al voltant dels 11 dies, possiblement degut a la toxicitat del liti. De fet, tal i com es pot observar a la (**Fig. 45**), hi ha un efecte acumulatiu del liti. En un dels experiments, la mare es va menjar una de les cries i també va acabar morint, possiblement degut al mateix liti. La dosi de 1mEq/Kg va resultar ser insuficient donat que els valors en sang eren molt propers a 0. Després de l'administració de 2mEq/Kg, els ratolins presentaven un lleuger estat de tranquil·litat i els nivells de litèmia aconseguits estaven al voltant d'1mEq/L, no es va veure mortalitat (3 cries es van

injectar fins a P20, no es van mesurar les litèmies) i no s'observa efecte acumulatiu, indicant que aquesta dosi, a curt termini, no és tòxica pels ratolins CD1. Les dosis escollides per als experiments de comportament, van ser la de 2mEq/Kg/d per ser la més ajustada als valors terapèutics, i la de 1 mEq/Kg/d, dosis bastant inferiors a les donades en el BPD tenen efectes neuroprotectors (Chuang i Manji, 2007). Els estudis de comportament es van realitzar en ambdues dosis, mentre que els estudis de supervivència, MN i múscul es van fer només en la dosi més alta.

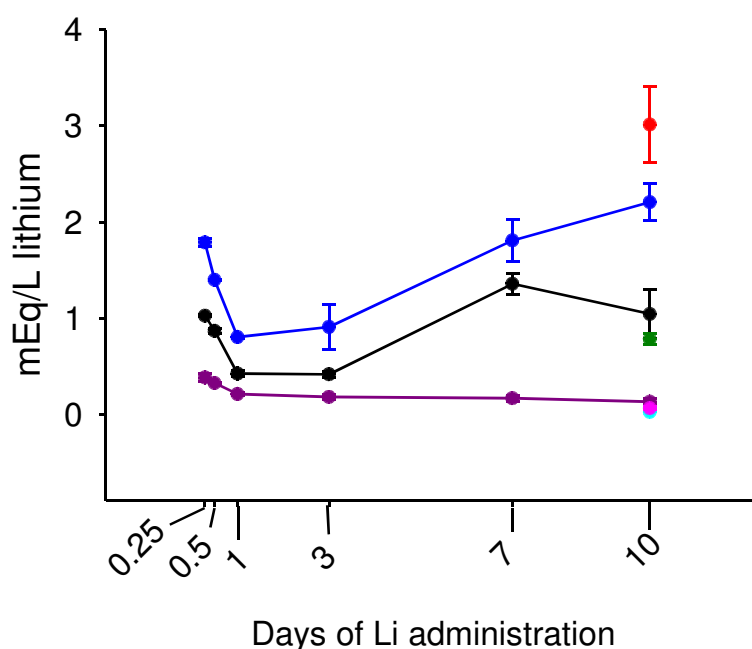


Figura 45. Corbes de litèmia en ratolins CD1 (n=4-6). Dosi de 1mEq/L (● lila), dosi de 2mEq/L (● negra) i dosi de 3mEq/L (● blau). Determinació de la litèmia 1mEq/L en WTΔ7 (● blau cel; 5 determinacions, n=8 ratolins) i SMAΔ7 (● rosa; 2 determinacions n=4 ratolins); determinació de la litèmia de 2mEq/L en WTΔ7 (● verd; 7 determinacions n=7 ratolins) i SMAΔ7 (● vermell; 5 determinacions n=5). Totes les dades s'expressen com a la mitjana de les determinacions±SEM.

Es va aplicar 1 o 2mEq/Kg/d als animals SMAΔ7 i als controls WTΔ7 (germans de ventrada) i es va determinar la litèmia després d'haver rebut 10 injeccions. Les determinacions de litèmia en ratolins tant SMAΔ7 com WTΔ7 que van rebre 1mEq/Kg/d es corresponien amb els CD1 de la corba de litèmia. Respecte la determinació en animals que van rebre 2mEq/Kg/d els resultats són sorprenents, els animals WTΔ7 tenien uns nivells de litèmia iguals o un pèl inferiors als CD1, mentre que els SMAΔ7 van obtenir valors superiors a 3mEq/L. Les possibles explicacions a

aquests valors són: (1) Els animals SMAΔ7 a P11 mostraven una afectació considerable, eren animals molt petits i la sang extreta era poca, fet que podria causar errors en la lectura del liti²⁰; (2) que aquests animals, puguin tenir dificultats per eliminar o metabolitzar el liti per problemes renals (Yoshioka *et al*, 2009) o hepàtics i/o un trastorn fisiològic general, inherent en la mateixa malaltia. Relacionat amb aquest darrer punt, es va procedir a la recollida de sang per a determinar l'ionograma dels animals i veure si el K⁺, el Na⁺ i el Cl⁻ també estaven afectats²¹. Les determinacions no van ser concloents i més estudis s'han de dur a terme.

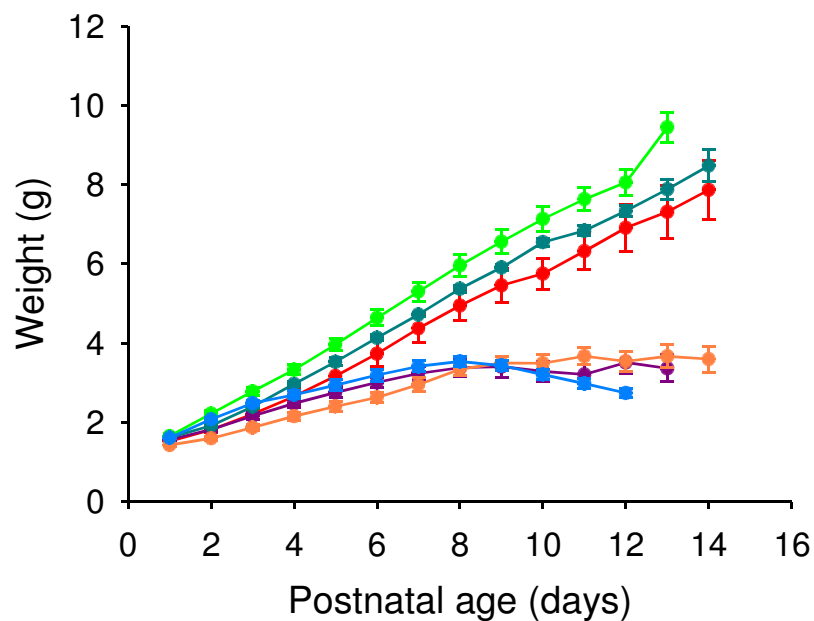


Figura 46. Pes corporal total en animals tractats amb 1mEq/L, 2mEq/L i no tractats. L'administració de liti en animals WTΔ7 provoca un increment de pes que és proporcional a la dosi aplicada, entre els animals que presenten la malaltia pràcticament no s'observen diferències. WTΔ7 salí (● vermell, n=8), SMAΔ7 salí (● lila, n=14), WTΔ7 1mEq (● verd fosc, n=8), SMAΔ7 1mEq (● taronja, n=11), WTΔ7 2mEq (● verd clar, n=5) i SMAΔ7 2mEq (● blau, n=5). Les dades representen la mitjana±SEM. La significació no està representada a la gràfica : *p<0,05 SMAΔ7 (P2) 1mEq vs WTΔ7 1mEq, SMAΔ7 (P4) vs WTΔ7 2mEq, SMAΔ7 (P6) SS vs WTΔ7; **p<0,01 SMAΔ7 (P3) 1mEq vs WTΔ7, SMAΔ7 (P5) 2mEq vs WTΔ7, SMAΔ7 (P7) SS vs WTΔ7; ***<p 0,001 SMAΔ7 (P4-P14) 1 mEq vs WTΔ7, SMAΔ7 P(6-12) 2mEq vs WTΔ7, SMAΔ7 (P8-13) vs WTΔ7; ANOVA, seguida de Bonferroni. Entre SMAΔ7 o WTΔ7 de diferents condicions no hi ha resultats significatius malgrat la tendència.

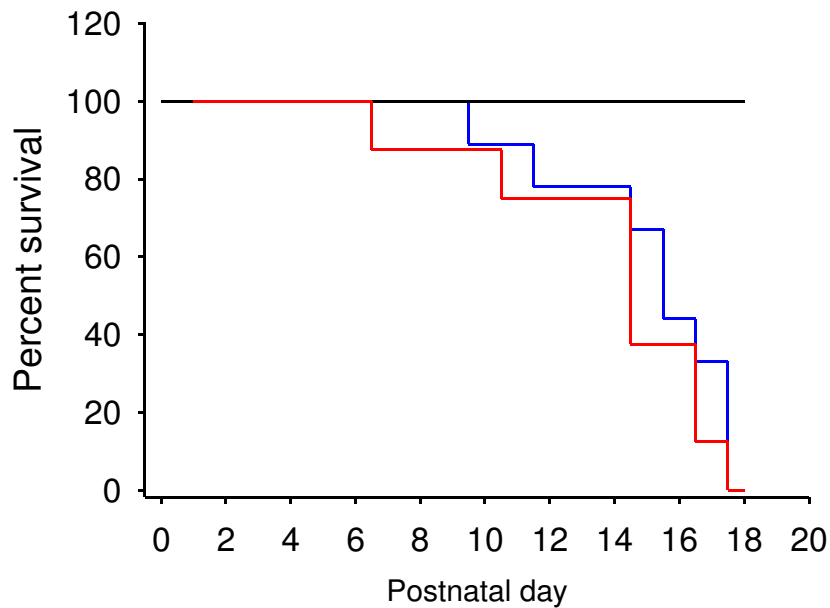
20 Els laboratoris on es va determinar la litèmia, van determinar cada mostra per separat, malgrat necessitessin un mínim de 100μL i no hi fossin.

21 Els laboratoris on va determinar la litèmia i es va fer l'ionograma, van ajuntar les mostres de SMAΔ7 i la litèmia no es va poder obtenir.

27.2 Efectes del liti en el fenotip AME en ratolins SMA Δ 7

Per caracteritzar la progressió i el desenvolupament dels animals AME sota els efectes del liti *versus* ratolins control i ratolins tractats a les diferents dosis, es pesaven els animals abans de l'administració del liti. L'efecte detectat en els ratolins control és un augment de pes depenent de la dosi, aquest augment, malgrat que més atenuat, també s'observa en els SMA Δ 7 fins a P8, edat a partir de la qual hi comença a haver un declivi notori, declivi, molt més acusat en els ratolins que reben la major dosi de liti (**Fig. 46**). Aquest efecte podria ser degut a l'acumulació de liti que es produeix al llarg de les administracions, causant un efecte tòxic a l'animal, efecte que no es produeix quan s'administra 1mEq/L. Seria interessant aplicar una dosi intermitja entre 1 i 2 mEq/L per tal de veure si, malgrat que esperem una acumulació de liti, aquesta es produís més tard i ens permetés veure si hi ha un lleuger increment de pes. A la literatura es troben resultats oposats pel que fa a l'efecte del LiCl en el pes, Yoshioka *et al.* (2009), troba que en ratolins tractats amb 2mmol/Kg, els ratolins tenen una pèrdua de pes a partir de P6, mentre que Levine i Saltzman (2006) detecten un increment de pes en rates joves. En el nostre cas, el grup control pateix un augment del pes (malgrat no sigui significatiu). Com s'ha vist anteriorment, l'increment de pes en les animals SMA es un objectiu encara no assolit per cap dels medicaments que hi ha en estudi, veient els nostres resultats, podríem formular la hipòtesi de que injectar liti juntament amb administracions de medicaments que ajudin a eliminar el liti evitant per tant la seva acumulació, podrien tenir un efecte beneficiós, si més no en el pes.

Figura 47. Corba de supervivència dels animals SMA Δ 7 tractats amb 2mEq/L LiCl, respecte els controls SMA Δ 7 no tractats i els WT Δ 7. El tractament amb 2mEq de LiCl no incrementa la supervivència dels animals SMA. Els WT Δ 7 salí (negre, n=8), SMA Δ 7 salí (blau, n=9) WT Δ 7 Li2mEq/L (negre, n=4) SMA Δ 7 Li2mEq/L (vermell, n=8).



27.3 Efectes del liti en la supervivència i les habilitats motores dels ratolins SMA Δ 7

Les malalties de la motoneurona, com és el cas de l'AME, tenen les capacitats motores disminuïdes, per tant qualsevol petit efecte del liti ja sigui positiu com negatiu, s'ha de veure reflectit en la supervivència i en les proves de comportament. La supervivència dels animals tractats (2 mEq/Kg/d) respecte dels no tractats no millora, de fet la mortlilitat en els animals tractats s'avança en el temps (**Fig. 47**). La dificultat de tractar malalties que afecten al SNC és la incapacitat que molts medicaments/drogues/molècules sintètiques tenen a l'hora de travessar la barrera hemato-encefàlica (BHE), en el nostre cas, donat que el liti és un ió hem donat per suposat que la BHE no seria un problema. Les proves de conducta es van fer a dies alterns i aplicades a partir de l'edat més idònia (veure materials i mètodes), i al igual que la mesura del pes es feien abans d'injectar el liti. A través del righting-reflex (RR), és a dir la capacitat de recuperar la postura correcta quan es deixa l'animal en postura supina, ens permet avaluar la força muscular general i la coordinació (**Fig. 48**).

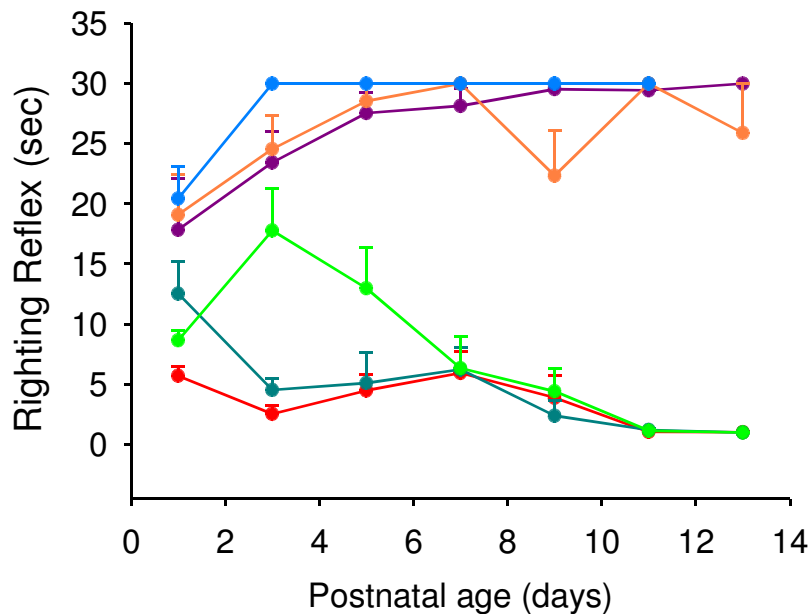


Figura 48. Gràfica de la capacitat dels ratolins en assolir el test del righting reflex (RR). La mesura del RR ens permet avaluar la força muscular general i la coordinació. WTΔ7 salí (● vermell, n=8), SMAΔ7 salí (● lila, n=14), WTΔ7 1mEq (● verd fosc, n=8), SMAΔ7 1mEq (● taronja, n=11), WTΔ7 2mEq (● verd clar, n=5) i SMAΔ7 2mEq (● blau, n=5). Les dades representen la mitjana±SEM. *p<math><0,05</math> SMAΔ7 (P1) SS vs WTΔ7 SS; ***p<math><0,001</math> SMAΔ7 (P3-P13) vs WTΔ7, SMAΔ7 (P3-P13) 1mEq/L vs WTΔ7, SMAΔ7 (P5-13) 2mEq vs WTΔ7; ANOVA seguida del test de Bonferroni.

Els animals SMAΔ7 tractats amb liti 2mEq/Kg/d demostren un clar empitjorament del seu estat al poc d'haver començat el tractament, de fet, observant els controls per la mateixa condició veiem que durant els primers dies la capacitat de superar la prova és més reduïda, a partir de P7 la capacitat s'equipara a les de la resta de controls, podria ser un indicatiu de la toxicitat del liti en aquestes edats tant primarenques. Els ratolins que han rebut una dosi menor (1mEq/Kg/d) es comporten igual que els salins excepte a partir de P9 on sembla que hi hagi una lleugera millora. La hipòtesi formulada a l'apartat anterior respecte a provar noves dosis és reforça.

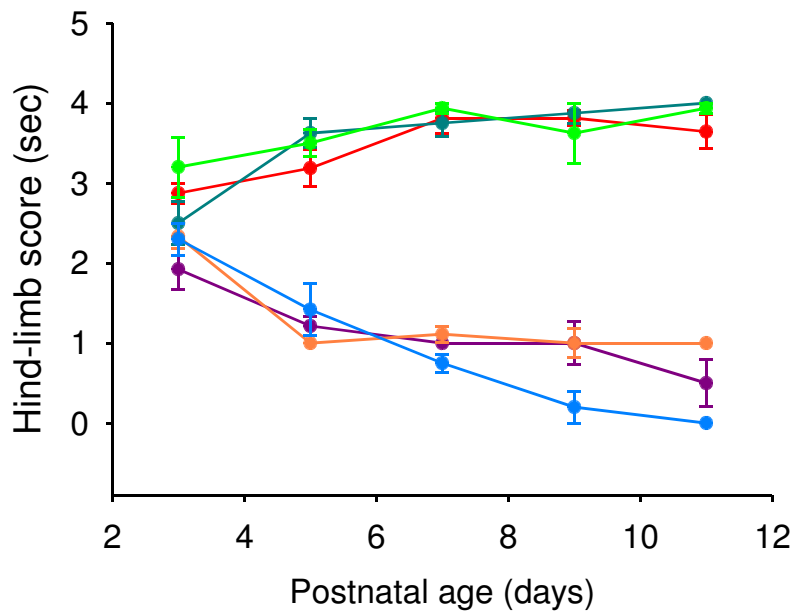


Figura 49. Avaluació de la posició de les potes i la cua. WTΔ7 salí (● vermell, n=8), SMAΔ7 salí (● lila, n=14), WTΔ7 1mEq (● verd fosc, n=8), SMAΔ7 1mEq (● taronja, n=11), WTΔ7 2mEq (● verd clar, n=5) i SMAΔ7 2mEq (● blau, n=5). Les dades representen la mitjana±SEM. * $p < 0,05$ SMAΔ7 (P3) SS vs WTΔ7; *** $p < 0,001$ SMAΔ7 (P5-P11) SS, 1mEq/L i 2mEq/L vs WTΔ7. ANOVA seguida del test de Bonferroni.

PsychoGenics Inc. va dissenyar un test específicament per a nounats, es tracta del Hind-Limb suspension test (HLST) o tube test (TT). A través d'aquest test podem evaluar la força, la debilitat i la fatiga muscular. Dels tres paràmetres que es poden evaluar nosaltres en vam avaluar dos, el temps que tardava l'animal a caure i la posició de les potes. La determinació en la posició de les potes i la cua (veure materials i mètodes apartat 7.3.2), ens indica clarament que no hi ha millora en els SMAΔ7 tractats amb 2mEq de liti i un lleuger estancament dels animals tractats amb 1mq (**Fig. 49**). El temps que tarda a caure dins el tub (LT) ens demostra que els animals tractats amb 2mEq pràcticament no aguanten, mentre que els injectats amb 1mEq tenen una petita millora en els primers 9 dies, igual com en el RR i el TT (**Fig. 49**). En el nostre cas, aquest prova ha estat caòtica, bàsicament perquè els animals a partir de P9 es posen molt nerviosos, i els que més tendència tenen a aguantar són els SMAΔ7, els WTΔ7 tendeixen a deixar-se caure, malgrat les proves es fessin en un espai específic per a la conducta.

Com a conclusió de les proves de conducta, podem dir que l'administració de liti no confereix cap millora en els ratolins SMA Δ 7.

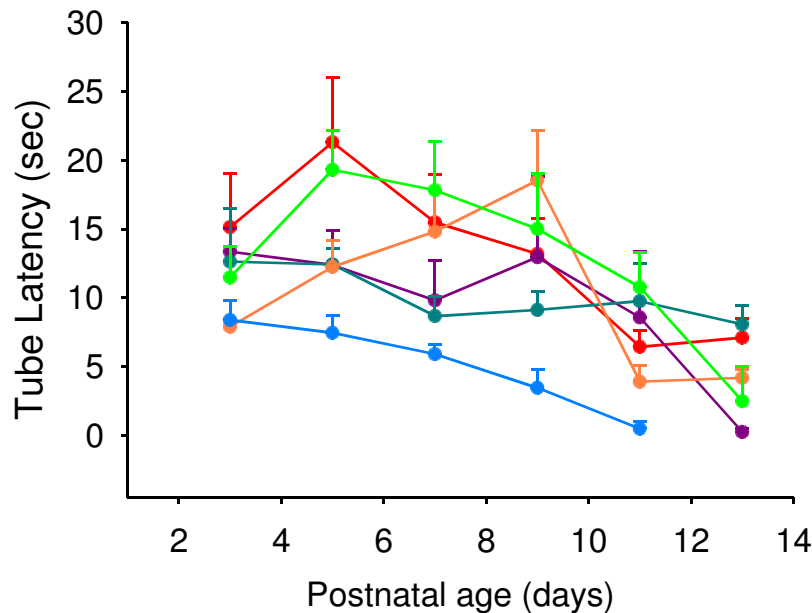


Figura 50. Gràfica de la capacitat que tenen els ratolins d'aguantar-se a l'extrem d'un tub. La mesura del temps que tarda a caure l'animal, ens permet avaluar la força, la debilitat i la fatiga muscular. WT Δ 7 salí (● vermell, n=8), SMA Δ 7 salí (● lila, n=14), WT Δ 7 1mEq (● verd fosc, n=8), SMA Δ 7 1mEq (● taronja, n=11), WT Δ 7 2mEq (● verd clar, n=5) i SMA Δ 7 2mEq (● blau, n=5). Les dades representen la mitjana \pm SEM. ANOVA seguida del test de Bonferroni.

27.4 Efectes del liti en la motoneurona

L'AME es caracteritza per una pèrdua progressiva d'un tipus de MN, les motoneurons α , gran part dels tractaments, excepte els que impliquen una substitució del gen *SMN*, no poden evitar aquesta pèrdua (**Taula 2**). El recompte de MNs en talls seriatos de ME de ratolins tractats i no tractats a l'edat de P12-14 demostren un efecte nul del liti sobre la supervivència de les MNs (**Fig. 51**).

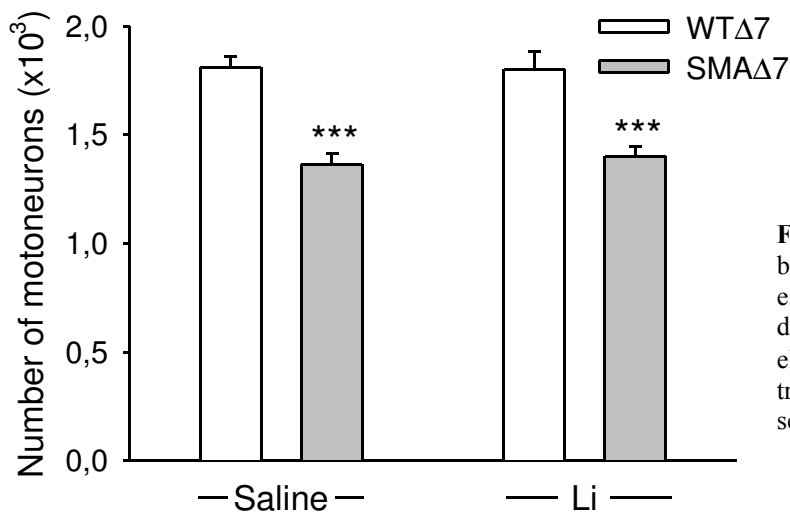


Figura 51. Nombre de MNs a la banya ventral de la medulla espinal. S'observa una clara disminució del nombre de MNs en els animals SMAΔ7, tractats i no tractats. *** $p < 0,001$ ANOVA seguida del test de Bonferroni.

27.5 Efectes del liti en les proteïnes SMN i GSK

La principal causa de l'AME és la manca del fl-SMN. La finalitat dels tractaments és incrementar SMN per tal de pal·liar els efectes de l'AME. El liti té efectes directes sobre la GSK-3, enzim implicat en la regulació de múltiples processos tals com la transcripció gènica, la plasticitat sinàptica i l'apoptosi (Quiroz, JA, 2004; Manji, HK 1999). Alhora, Makhortova *et al.* (2011), en un macro-estudi d'enfrontar dianes i llibreries químiques establertes que afectessin la proteïna SMN, van detectar la GSK3, via la cascada de senyalització RTK-PI3K-AKT-GSK3, com a principal enzim que augmentava l'SMN amb prèvia estabilització d'aquest.

Ja que l'afectació a nivell del SNC motor i del múscul, degut a la malaltia, és més acusada, i que són aquests llocs on sembla que el requeriment de la proteïna SMN és més necessari, s'ha procedit a estudiar l'efecte del liti sobre els nivells d'SMN a través d'extractes de proteïna total de la ME (**Fig. 52A,A'-C,C'**) i del múscul esquelètic (**Fig. 53A,A'-C,C'**). Prèviament, hem realitzat WBs que ens identifiquen la GSK no fosforilada i la GSK fosforilada a la serina-9 que ens indica la inhibició de la seva activitat enzimàtica. Malgrat s'ha vist un increment en la GSK fosforilada, aquest increment no es tradueix en un augment de la proteïna SMN. Hi ha tres possibles explicacions (1) que la via per la qual la transcripció d'*SMN* s'activa no és a través de la

GSK, (2) que la via d'activació de la transcripció sigui la GSK però que la inactivació de la GSK pel liti no sigui suficient per estabilitzar la SMN, o (3) nosaltres hem analitzat el contingut total d'SMN a la medul·la espinal. Malgrat els resultats negatius en la SMN, el fet que la pGSK-3 β estigui augmentada en la ME dels ratolins tractats, tant SMA Δ 7 com WT Δ 7, ens confirma que el liti pot travessar la BHE. Tot i que els nivells d'SMN determinats per WB no incrementen en els ratolins tractats, l'anàlisi immunohistoquímic de seccions de la ME amb l'anticòs contra SMN, demostren un augment de l'expressió d'SMN a les MNs (**Fig. 55**).

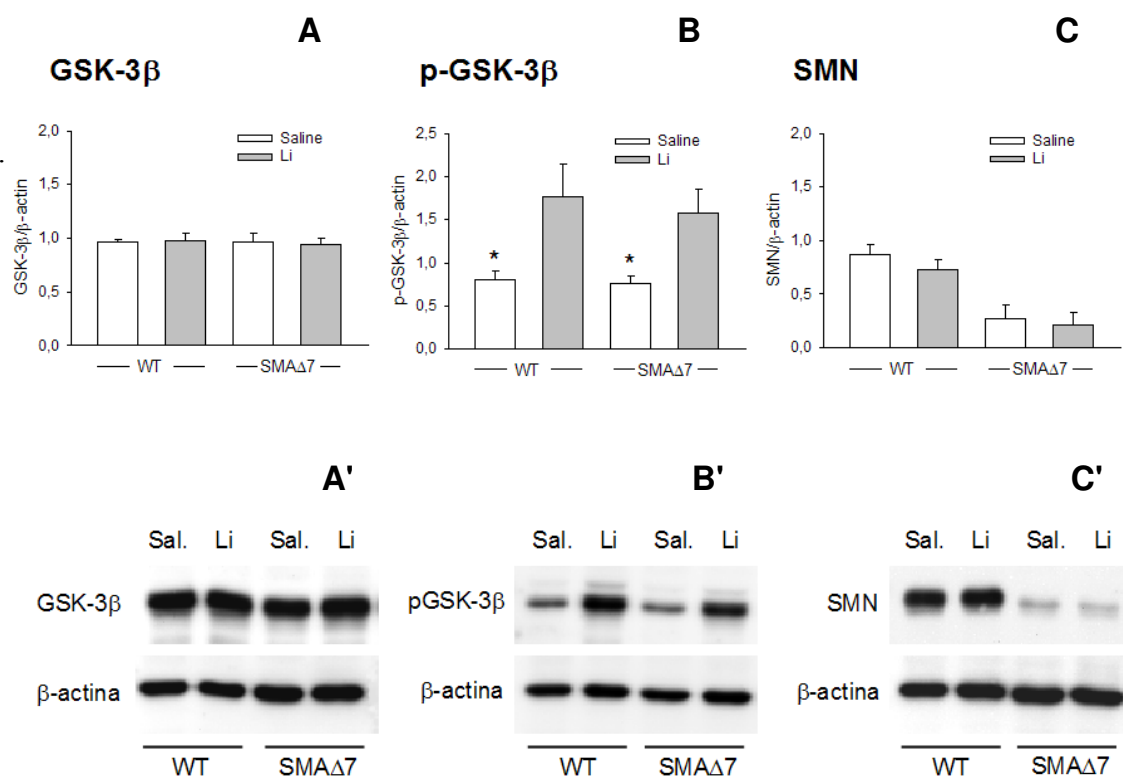


Figura 52. *Western blot* de la GSK-3 i p-GSK-3 i de la SMN, en extractes de ME total. (A-A') No s'observen diferències entre la GSK-3 d'animals tractats i no tractats amb Li 2mEq, si que hi ha un increment significatiu en la p-GSK-3 dels animals tractats (B-B'), confirmant-nos que el liti ha penetrat correctament al SNC. (C-C') l'increment de la p-GSK3- β no es veu reflectit en un increment de la SMN. * $p < 0,05$ Students t-test; (n= 5; 3WBs).

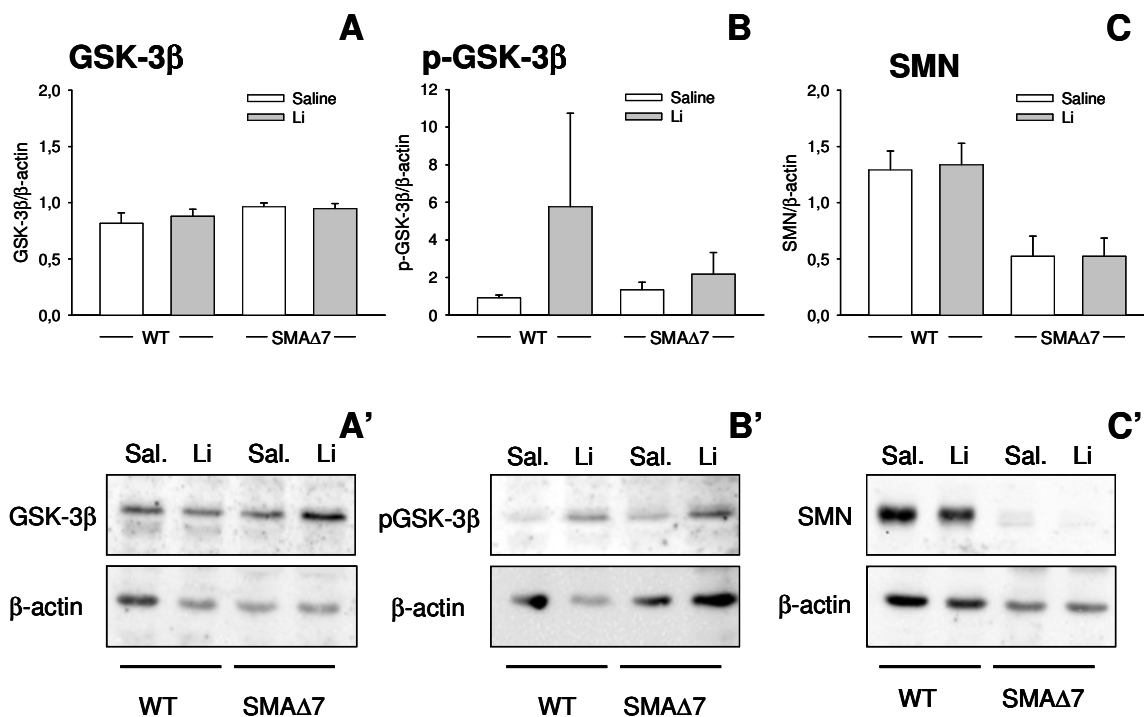


Figura 53. *Western blot* de la GSK-3 i p-GSK-3 i de la SMN, en extractes de múscul total. (A-A') No s'observen diferències entre la GSK-3 d'animals tractats i no tractats amb Li 2mEq, si que hi ha un increment significatiu en la p-GSK-3 dels animals tractats (B-B'), confirmant-nos que el liti ha penetrat correctament al SNC. (C-C') l'increment de la p-GSK3-β no es veu reflectit en un increment de la SMN. *p<0,05 Students t-test; (n= 3-4 , 2 WBs).

Donat que l'augment dels nivells de la proteïna SMN es produeix via AKT, que intervé en múltiples processos cel·lulars relacionats amb la supervivència cel·lular, el cicle cel·lular, el metabolisme i l'angiogènesi (RTK-PI3K-AKT-GSK3; Makhortova *et al.*, 2011), hem procedit a l'anàlisi de l'AKT per tal d'observar si el tractament amb 2mEq/Kg/dia produïa canvis en els seus nivells. Els resultats obtinguts indiquen que el liti no té cap efecte en aquesta via (Fig. 54).

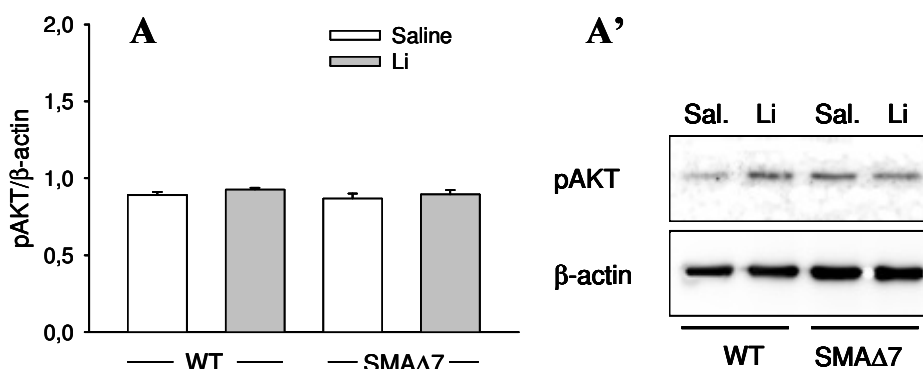


Figura 54. *Western blot* de l'AKT en extractes de medul·la espinal. (A-A') No s'observen diferències entre l'AKT d'animals tractats i no tractats amb Li 2mEq, indicant per tant, que el liti no té efectes sobre la via de senyalització PI3K-AKT (n= 7-8, 2 WBs).

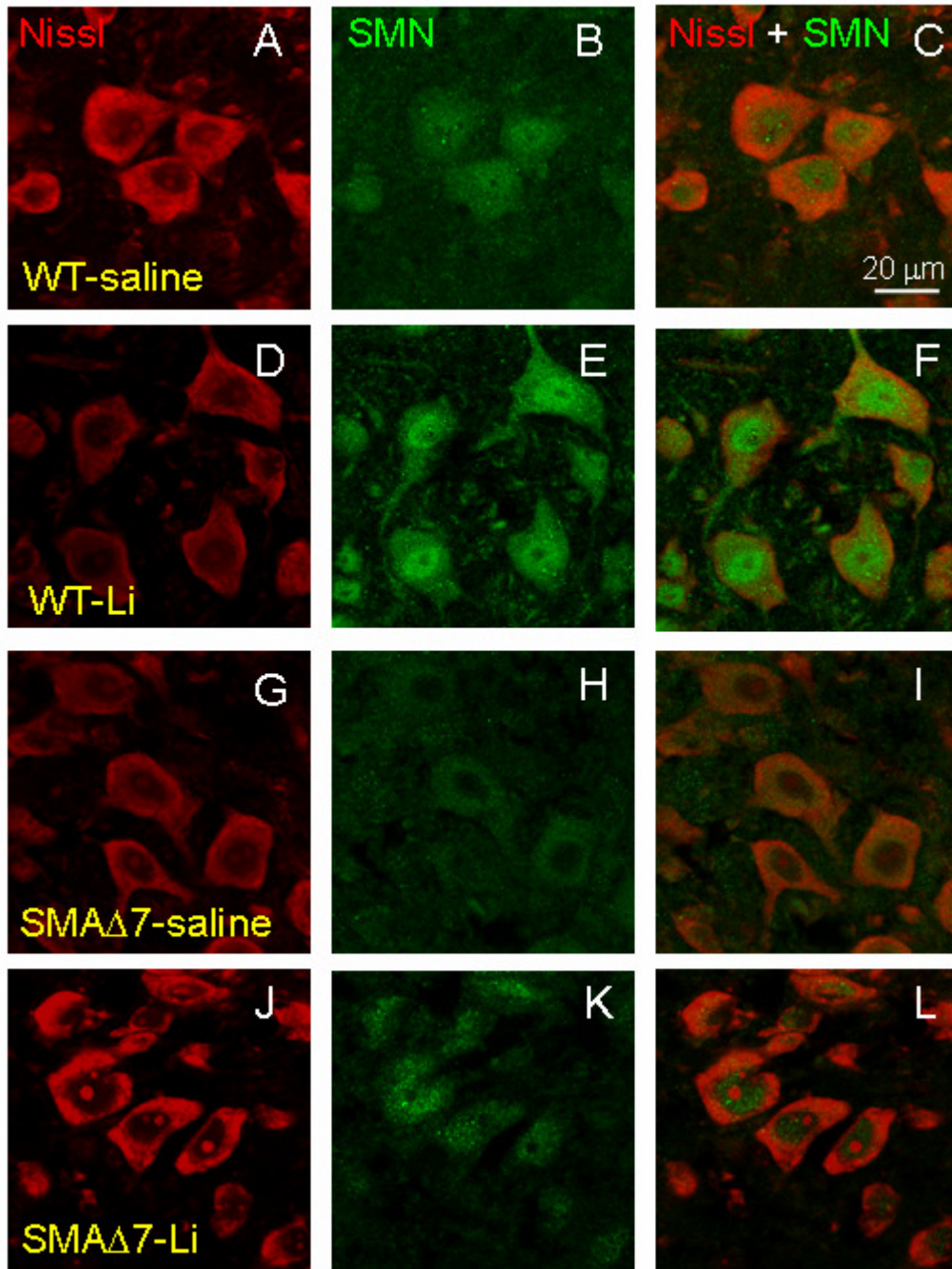
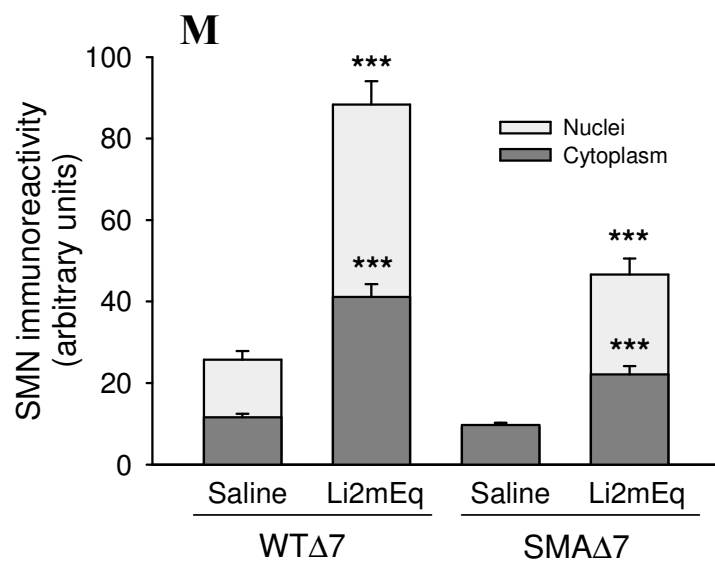


Figura 55. Imatges representatives de l'increment de l'expressió de l'SMN en les motoneurons (MNs). (A-C) Imatges obtingudes en animals WTΔ7 no tractats. (D-F) Imatges obtingudes en animals WTΔ7 tractats amb liti. (G-I) Imatges obtingudes en animals SMAΔ7 no tractats. (J-L) Imatges obtingudes en animals SMAΔ7 tractats amb liti (en vermell identificació de les MNs amb Nissl; en verd identificació de l'SMN). (M) Quantificació de la intensitat de l'SMN en el citoplasma i en el nucli d les MNs. S'observa un increment significatiu en l'expressió d'SMN, tant al nucli com al citoplasma. *** $p < 0,001$ ANOVA seguida del test de Bonferroni.



27.6 Efectes del liti en el múscul

Una altra característica dels ratolins AME, és la distròfia muscular que pateixen i el retard en el desenvolupament de les plaques motores. Es van dur a terme, estudis en paral·lel a la conducta per tal de determinar si el liti tenia algun efecte sobre el múscul i les unions neuromusculars. Una evidència de si hi ha millores en el múscul esquelètic és la normalitat de les seves fibres musculars, nosaltres, prèviament a veure la morfologia d'aquestes fibres en el TA, es van pesar els músculs i donat que no hi havia diferència entre els animals tractats dels no tractats (**Fig. 56A**) vam acabar descartant posteriors estudis. És lògic pensar que si hi ha un increment en el pes del múscul, aquest increment serà degut a: o bé un increment de fibres musculars o bé a una hipertròfia de les mateixes. No obstant, vàrem procedir a analitzar la placa motora en detall utilitzant dos marcadors, el NF per veure si hi havia un guany en el desenvolupament de la placa (**Fig. 56C**), i el CGRP, neuropèptid afectat en estadis primerencs de la malaltia (**Fig. 56B**)

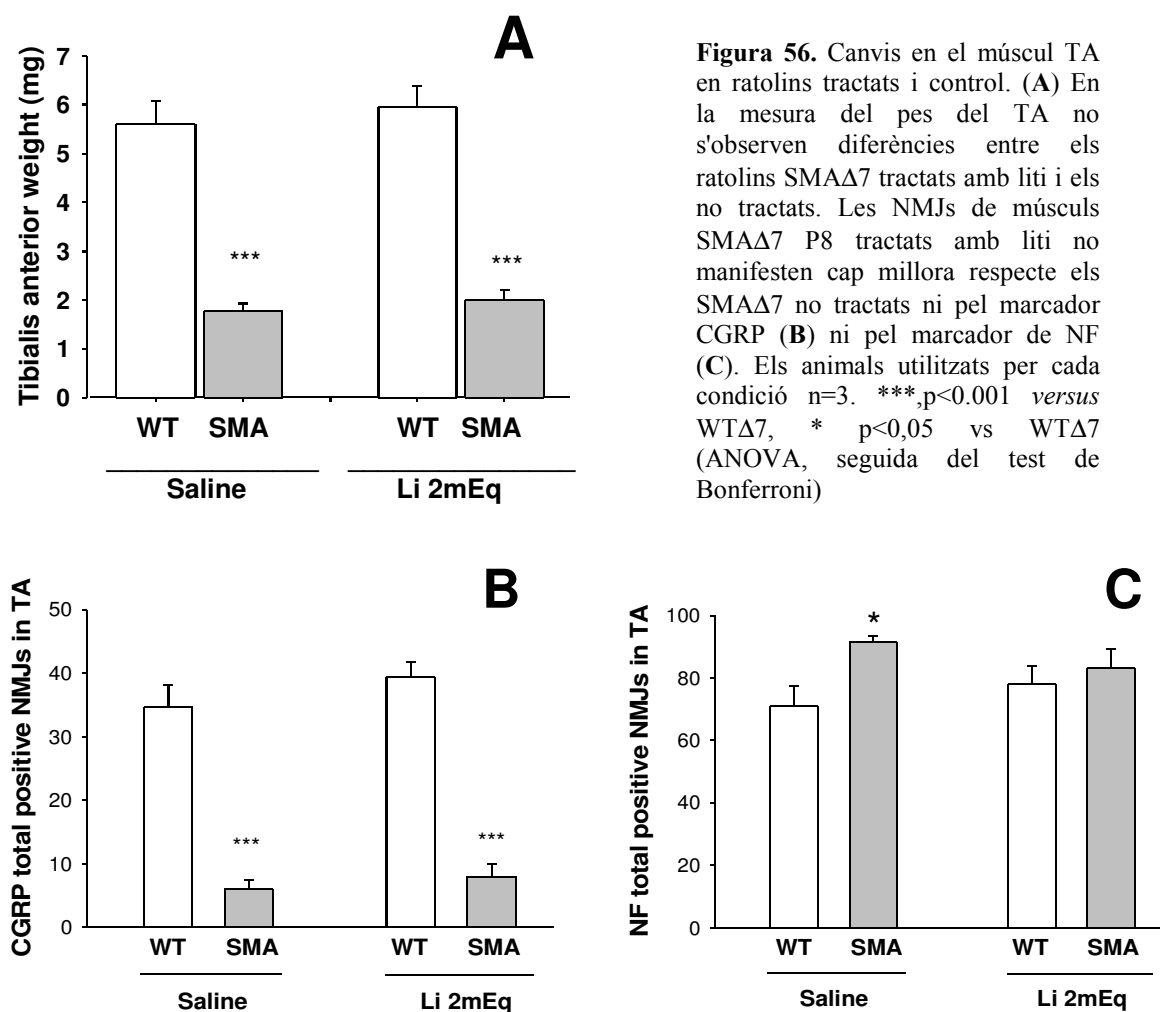


Figura 56. Canvis en el múscul TA en ratolins tractats i control. (A) En la mesura del pes del TA no s'observen diferències entre els ratolins SMAΔ7 tractats amb liti i els no tractats. Les NMJs de músculs SMAΔ7 P8 tractats amb liti no manifesten cap millora respecte els SMAΔ7 no tractats ni pel marcador CGRP (B) ni pel marcador de NF (C). Els animals utilitzats per cada condició n=3. ***,p<0.001 versus WTΔ7, * p<0,05 vs WTΔ7 (ANOVA, seguida del test de Bonferroni)

Tal i com podem observar a les figures **56B** i **56C**, en cap dels dos casos s'observa una millora a nivell de la NMJ en els animals tractats respecte dels no tractats.

27.7 Toxicitat del liti en els ratolins SMA Δ 7

Una manera d'observar la possible toxicitat és a través de l'anàlisi de diferents teixits. Està descrit que les rates de 7-8 setmanes que reben tractaments amb liti tenen un increment en el pes total i una pèrdua de pes de la melsa, del ronyó i significativament del timus; aquest increment (cos) i pèrdua (timus) de pes és pot atribuir a l'estrès causat pel liti (Levine i Saltzman, 2006). Nosaltres ens hem trobat que la melsa està molt més afectada que el timus, fet també indicatiu de la toxicitat (**Fig. 57**).

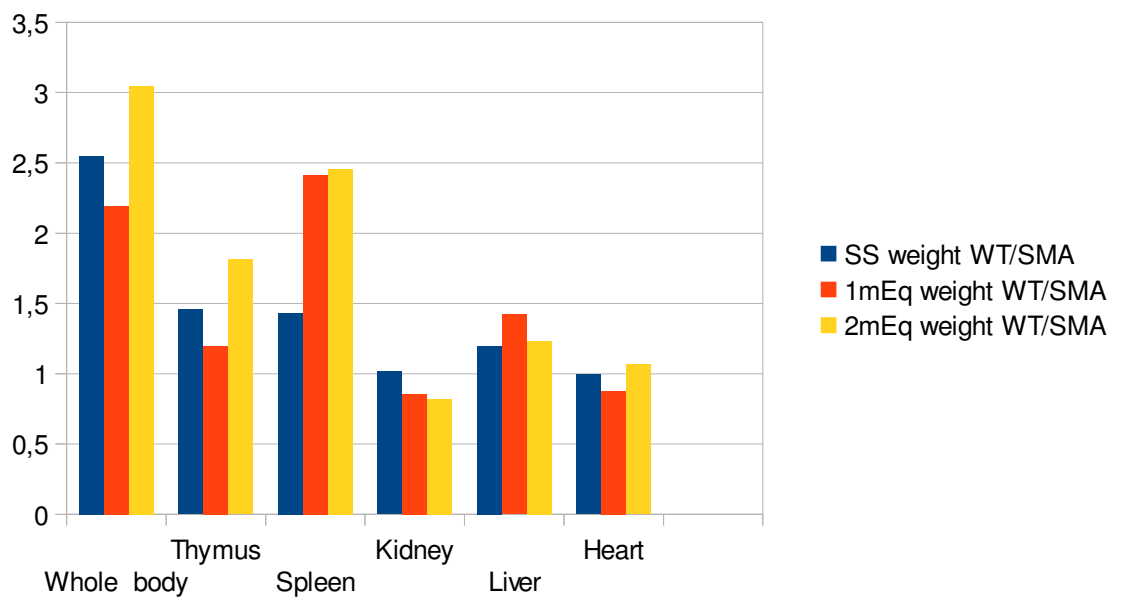


Figura 57. Ratio de la mitjana dels pesos dels ratolins i dels seus òrgans d'animals WT Δ 7 respecte dels SMA Δ 7 (n=3-8), en animals no tractats, i tractats amb 1 o 2 mEq/L de liti. El timus i la melsa són dos òrgans que s'afecten ràpidament en processos d'estrès i toxicitat, s'observa a la figura com la melsa està significativament afectada en ambdues concentracions de liti.

Yoshioka *et al.* (2009), van trobar algunes alteracions en els ronyons de ratolins tractats amb liti (2mmol/Kg). Les nostres observacions indiquen que els animals amb AME tractats amb liti tenen aproximadament un 50% més de quists que els ratolins amb AME no tractats, o els WT, tant tractats com salins (**Fig. 58**).

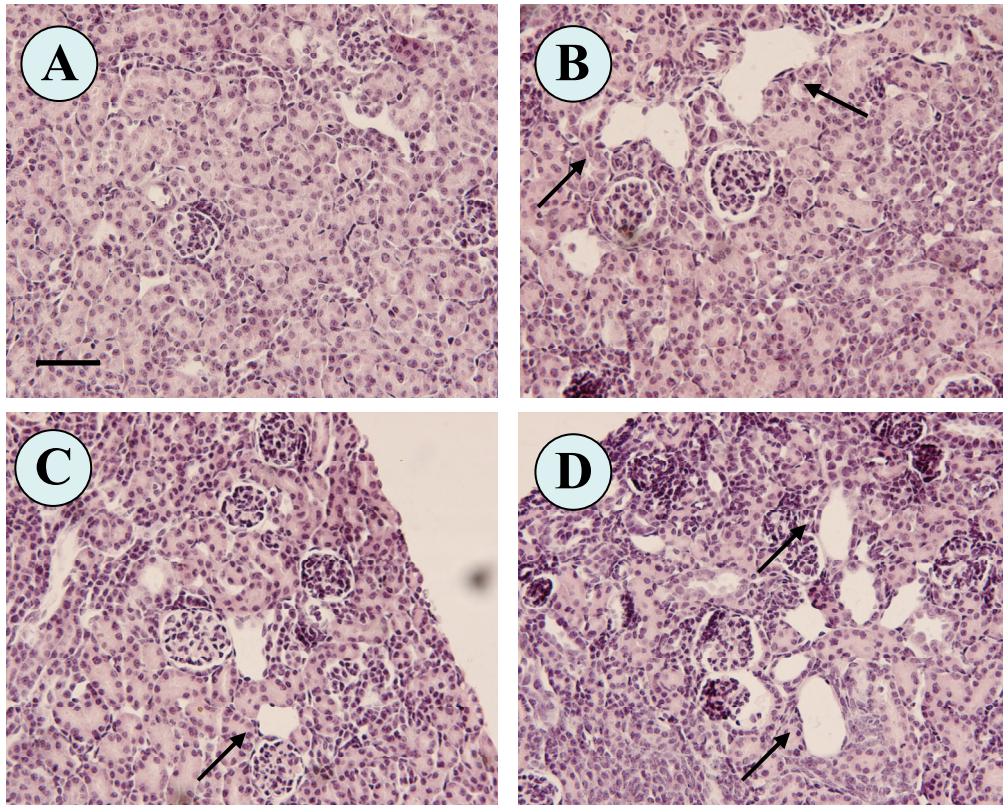


Figura 58. Imatges representatives de l'escorça renal, tenyides amb hematoxilina-eosina (H-E), on s'hi pot observar la presència d'estructures quístiques (fletxes a B-D). (A) Imatge que correspon a un ratolí WT Δ 7 no tractat, malgrat aquesta imatge no contingui estructures quístiques, si que se'n poden trobar eventualment. (B) Imatge que correspon a un ratolí WT Δ 7 tractat amb 2mEq/L de liti. (C) Imatge que correspon a un animal SMA Δ 7 no tractat; i (D) imatges corresponents a uns SMA Δ 7 tractat amb 2mEq/Kg de liti, es pot observar un incrementen la quantitat d'estructures quístiques (n= 3-4; les fletxes negres a [B-D] senyalen els quists). Escala en A = 50 μ m, vàlid de B-D.

Donada l'alteració quística dels ronyons després del tractament amb liti, vàrem procedir també l'anàlisi dels glomèruls. Els glomèruls estan situats a la part més proximal de les nefrones i tenen la funció de filtrar les molècules petites, com l'aigua, electròlits, sucres i proteïnes petites, i retenir les proteïnes amb alt pes molecular. Des del punt de vista estructural, els glomèruls estan constituïts per una part central on hi trobem, el capilar sanguini amb la làmina basal, podòcits, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules mesangials, i la càpsula de Bowman, formada per un epiteli pla de cèl·lules parietals i també la seva membrana basal. Entre la càpsula de Bowman i la part central s'hi troba l'espai de Bowman; la retracció dels capil·lars en preparacions histològiques provoca que aquest espai sigui més gran. Els components principals d'un glomèrul primerenc, són una capa primitiva de podòcits, una fina capa de la càpsula de Bowman i una nansa capil·lar. Al principi, els podòcits i les cèl·lules endotelials tenen les seves pròpies làmines basals, aquestes, però, a mesura que el glomèrul madura, es fusionaran

per formar una membrana basal més gruixuda. Durant el procés de maduració, els podòcits es transformen de manera que quedaran aïllats els uns dels altres i formaran una complicada xarxa de projeccions (Quaggin i Kreidberg, 2008).

Donat que els ratolins utilitzats en aquest estudi eren recent nascuts, la presència de les dues poblacions de glomèruls, la madura i la immadura era freqüent; per aquest motiu, en primer lloc vàrem determinar el diàmetre i l'àrea de diversos glomèruls (de 9 a 15 glomèruls per animal n=3-4 ratolins per condició). En funció del diàmetre obtingut vàrem dividir els glomèruls, en dos grups; el grup amb glomèruls immadurs (0-60 μm de diàmetre) i el grup de glomèruls madurs (de >60 μm de diàmetre). No vàrem observar diferències entre les distribucions de les 4 condicions (dades no mostrades). Seguidament, vàrem correlacionar el nombre de nuclis per glomèrul en cada grup. Vàrem observar diferències significatives entre els SMA Δ 7 salins i els WT Δ 7 salins, tant en els glomèruls que pertanyen al grup A com en els del grup B; indicant que hi ha una anomalia congènita en el desenvolupament i maduració dels glomèruls (**Fig. 59**). De fet, els SMA Δ 7 no tractats mostren cossos apoptòtics (**Fig. 59E**), que estan pendents de ser confirmats per la tècnica del TUNEL. Vàrem observar, també, diferències significatives entre els SMA Δ 7 tractats i els SMA Δ 7 no tractats. Sorprenentment, el nombre de nuclis per glomèrul en els animals no tractats era molt inferior al dels animals tractats amb liti; indicant, per tant, que el liti té un efecte positiu en el desenvolupament dels glomèruls (**Fig. 59G**). Una possible explicació d'aquest efecte positiu del liti, seria l'efecte que té el liti en la inhibició de la GSK3- β . Quan la GSK3- β està inhibida, hi ha un increment de l'expressió de proteïnes anti-apoptòtiques, com la Bcl-2, aquest increment podria evitar l'apoptosi que s'observa en els SMA Δ 7 no tractats.

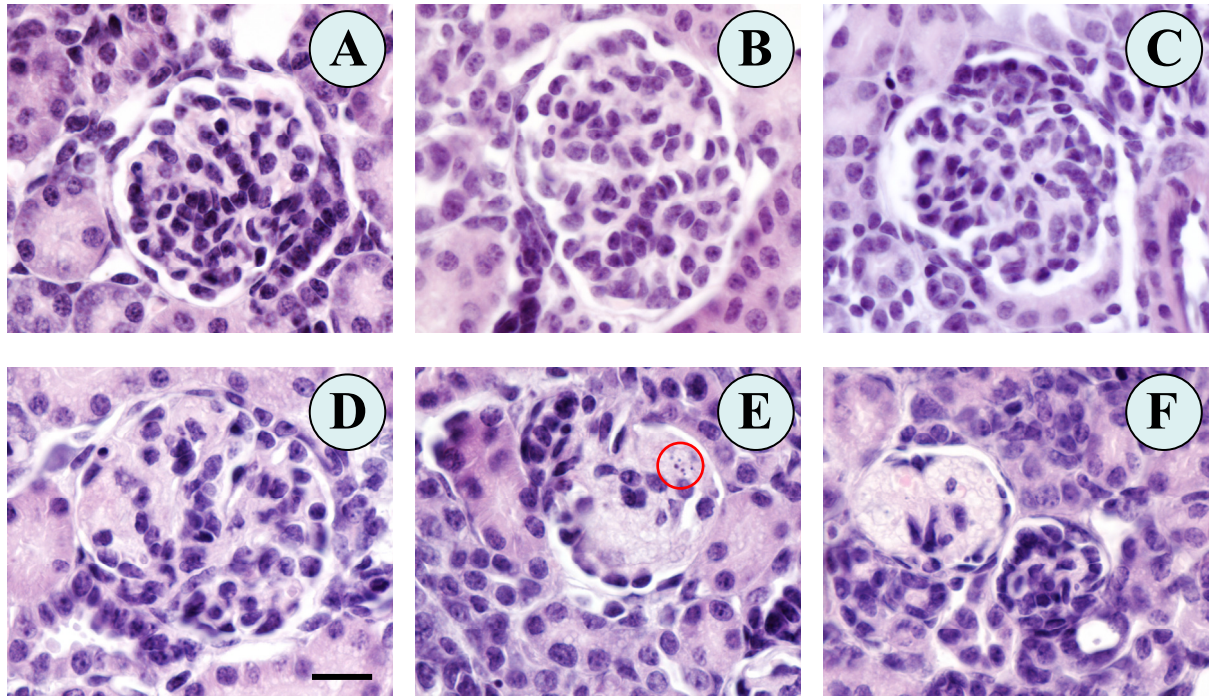
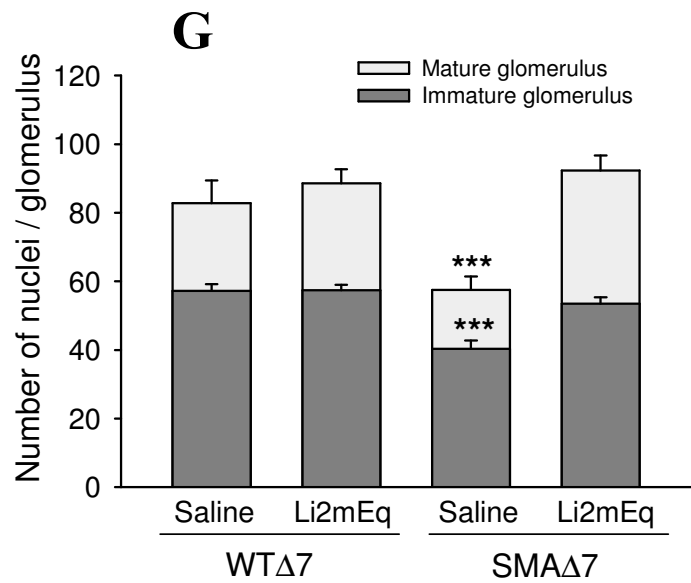


Figura 59. Imatges histopatològiques del glomèrul i quantificació del nombre de nuclis per glomèrul. En l'anàlisi de preparacions de ronyó tenyides amb hematoxilín-eosina, en el glomèrul, s'observa una alta densitat de nuclis en els animals WTΔ7 no tractats (A), WTΔ7 tractats amb 2mEq de LiCl (B) i en animals SMAΔ7 tractats amb 2mEq de LiCl (C); per contra, en els animals SMAΔ7 no tractats (D-F) s'observen uns glomèruls d'aparença fibrosa i amb una severa disminució de nuclis (E i D); en alguns d'ells es poden observar cossos apoptòtics (cercle vermell en E). (G) Quantificació del nombre de nuclis per glomèrul (G) (n= 3-4). ***, $p < 0.001$ versus WTΔ7 tractat i no tractat, i SMAΔ7 tractat, (ANOVA, seguida del test de Bonferroni) Escala a D = 20μm, vàlid de A-F.



Un altre efecte de la inhibició de la GSK3- β és l'increment de l'activitat glicogen sintasa, que repercutirà en una acumulació de glicogen, cel·lular, en els animals tractats amb liti (**Fig. 60**). Ge *et al.* (2011), en ratolins KO condicionals per la GSK3- β a l'epiteli tubular renal cortical de ratolins postnatsals madurs, observen una acumulació de glicogen a les cèl·lules epitelials dels túbuls comparats amb animals controls; no obstant, la histologia i la fisiologia del ronyó estan preservades. Els nostres resultats mostren vacúols glicogen positius en les cèl·lules dels túbuls dels animals tractats amb liti, indicant un increment de glicogen (**Fig. 60**).

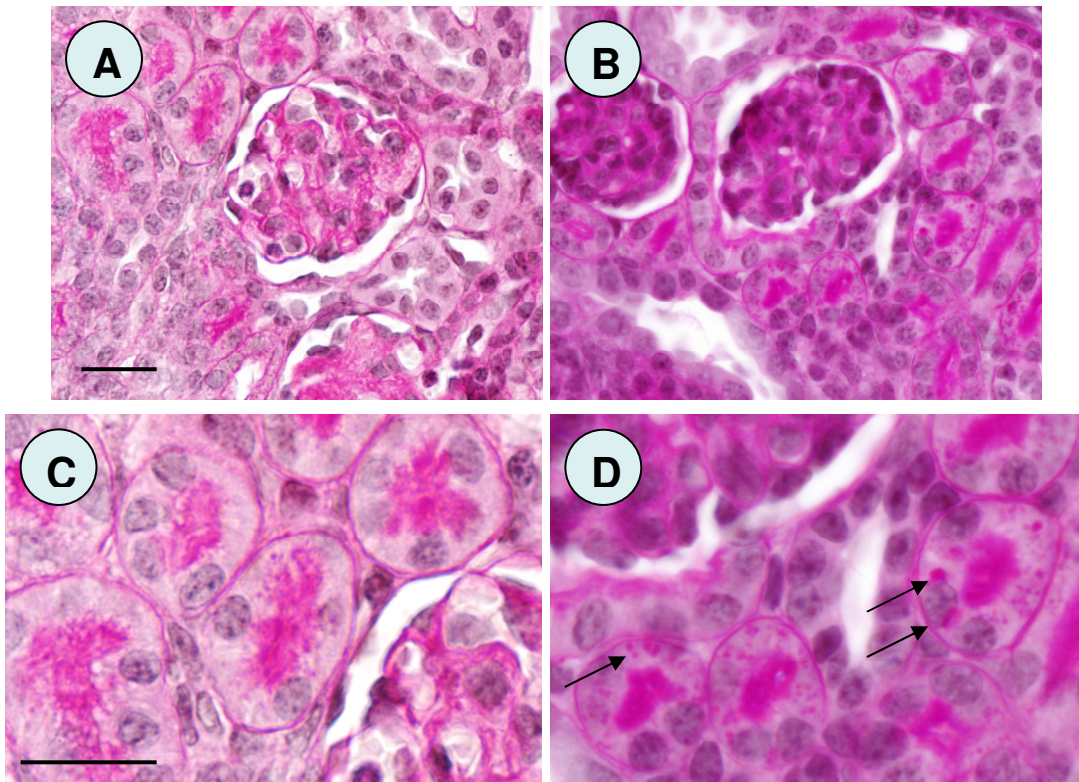


Figura 60. Imatges representatives de talls histològics del ronyó tenyides amb la tinció PAS. (A) Imatge que correspon a un ratolí amb SMAD7 no tractat, s'observa PAS positiu a la llum dels túbuls. (B) Imatge corresponent a un ratolí SMAD7 tractat amb 2mEq/Kg de LiCl; es pot observar més senyal PAS positiu a l'interior del glomèrul, a la llum dels túbuls i una acumulació de grànuls de glicogen a les cèl·lules cúbiques i intercalars (imatge magnificada de B). Escala en A = 20 μ m, vàlid per B; escala en C = 20 μ m, vàlid per D (n= 3-4).

VIII DISCUSSIÓ

Afectació del sistema neuromuscular

L'anàlisi fenotípic, tant del model de ratolí $Smn^{-/-};hSMN2^{+/+}$ (o AME tipus 1) com del $Smn^{-/-};hSMN2^{+/+};SMN\Delta 7^{+/+}$ (o SMA Δ 7), mostra que els primers defectes visibles en l'AME es manifesten en forma d'alteracions en les NMJs en comptes de la mort neuronal, resultats que es corroboren amb altres estudis prèviament publicats en el ratolí (Kariya *et al.*, 2008; McGovern *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Mutsaers *et al.*, 2011). Hem observat que el nombre de MNs lumbaris en ratolins AME acabats de néixer no està significativament reduït en cap dels dos models (dades dels SMA Δ 7 no mostrades) i només hem observat una pèrdua moderada (~20%) en l'etapa final de la malaltia; de totes maneres el comportament de les MNs en l'AME és diferent al llarg de la ME, essent les MNs cervicals i toràciques les més afectades (Dale *et al.*, 2011). No obstant, alguna alteració primerenca deu ocórrer a la ME dels ratolins AME tipus 1, perquè prèviament a la mort de la MN, hem detectat activació astrocítica a la banya ventral de la ME. L'activació astrogliàl està, freqüentment, associada a la patologia de la MN en l'ELA i després de l'axotomia, i pot tenir efectes neuroprotectors i efectes neurotòxics (Moran, *et al.* 2004; Nagai, *et al.* 2007). S'ha d'investigar més de quina manera els astròcits reactius afecten la funció de les MNs i la connexió sinàptica en l'AME. És interessant observar que el nombre de terminals glutamatèrgics en els cossos cel·lulars de les MNs està reduït en ratolins amb AME (Ling *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2010). L'absència notable de microgliosi a la medul·la espinal, en ratolins AME tipus 1, suggereix que, en contrast amb els SMA Δ 7, la neuroinflamació no és un mecanisme rellevant en els ratolins que expressen formes més severes de l'AME (Ling *et al.*, 2010). Malgrat això, hem observat diverses alteracions en les NMJs que es correlacionen amb la progressió de la malaltia. Algunes d'aquestes dades estan en consonància amb altres estudis sobre el model animal murí de l'AME en els que l'acumulació de NF i la simplificació dels terminals presinàptics es descriuen com els primers trets patològics detectables (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2002; McGovern *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2009). Altres dades que concorden amb la literatura són les observacions en l'aturada de la maduració dels terminals amb un increment del nombre d'axons per placa, sobretot en els músculs proximals (Lee *et al.*, 2011) i un retard en la regulació a la baixa del NF, com succeeix en els animals controls (Torres-

Benito *et al.*, 2011). Nosaltres aportem noves evidències sobre alguns dels components moleculars dels terminals presinàptics que es trobaven disminuïts, de forma primerenca, en les NMJs, dels músculs proximals més afectats (IC, TVA i StM). Mentre que el CGRP i el Rab3A estan molt disminuïts, en aquests músculs, altres marcadors com la SyPhys i la SV2 es mantenen igual que els controls o bé disminuïen lleugerament, indicant, per tant, que la innervació no estava afectada. Hem observat un decrement precoç del contingut en CGRP en els terminals presinàptics en sinapsis aparentment ben conformades. Donat que el CGRP no s'expressava per igual en els músculs i edats (Csillik *et al.*, 1993), la seva implicació en l'AME només es pot avaluar si es compara amb els corresponents controls de la mateixa edat. Per exemple, el CGRP està disminuït en els terminals nerviosos que innerven els músculs proximals IC i TVA d'animals afectats per l'AME tipus 1, mentre que s'expressa de forma normal en els terminals nerviosos que innerven els músculs distals, els quals estan menys afectats per la malaltia. En el cas concret del Soli, múscul de contracció lenta, el CGRP està absent tant en els AME com en els controls, per tant, no és avaluable. Per contra, en els SMAΔ7 sí que podem observar una disminució significativa del CGRP en el TA. És probable que l'afectació de músculs distals com el TA en el model d'SMAΔ7 sigui deguda al fet que aquests animals tinguin una supervivència més elevada i donat que la progressió de la malaltia és més lenta pugui afectar a més músculs. El CGRP, està normalment present al SNC, en particular, en els cossos cel·lulars d'una part de MNs cranials i espinals (Kawai *et al.*, 1985; Skofitsch i Jacobowitz, 1985; Gibson *et al.*, 1988; Calderó *et al.*, 1992). Aquest pèptid es regula durant el desenvolupament, la plasticitat i la regeneració de nervis i NMJs (Matteoli *et al.*, 1990; Sala *et al.*, 1995; Tarabal *et al.*, 1996a i b; New *et al.*, 1986; Toth *et al.*, 2009). Està descrit que el CGRP augmenta la resposta postsinàptica en les NMJs en desenvolupament a través de la unió amb el seu receptor i la senyalització mitjançada per l'AMPc (Lu *et al.*, 1993). També s'ha proposat que el CGRP és un activador, derivat del nervi, de la transcripció dels receptors postsinàptics d'acetilcolina (Duclert *et al.*, 1995). Cal esbrinar si la reducció del CGRP en l'AME contribueix en el dèficit de la NMJ. Sembla ser que la depleció de les vesícules que contenen CGRP en les NMJs dels ratolins amb AME no és una conseqüència directa de les deficiències en el transport axonal donat que els cossos de les MNs toràciques de la ME, que innerven músculs proximals, també demostren una reducció en els nivells de CGRP. Cal investigar també la possibilitat que una deficiència en el transport axonal dels mRNAs expliqui una reducció del CGRP en l'AME, ja que

durant la regeneració perifèrica del nervi hi ha un procés de síntesi intra-axonal de CGRP (Toth *et al.*, 2009). S'ha de tenir en consideració l'especificitat de la regulació a la baixa del CGRP en el sistema motor de l'AME, ja que l'expressió d'aquest pèptid en el sistema nerviós autònom i sensorial es va mantenir sense canvis. El fet que el CGRP no estigui disminuït en la llengua dels ratolins amb AME tipus 1, suggereix que aquest múscul no està afectat en aquets model; per contra es va observar un lleuger, però significatiu, increment del CGRP. Cal assenyalar que en condicions normals, tot i que aquest neuropèptid disminueix durant el desenvolupament postnatal en la majoria dels músculs d'animals adults, en les NMJs de la llengua roman altament expressat (Sala *et al.*, 1995; Tarabal *et al.* 1996a; Csillik *et al.*, 1993). Donat que el CGRP també està elevat en nervis i sinapsis en regeneració (Tarabal *et al.* 1996b), és possible que l'augment que s'observa del CGRP a la llengua dels AME sigui el reflex de la plasticitat (reparació) que té lloc en els terminals nerviosos.

El Rab3A és una proteïna d'unió al GTP implicada en el reclutament de les vesícules sinàptiques a les zones actives i en l'alliberació dels neurotransmissors en les terminacions nervioses (Takai *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 2007). En mutants nuls de Rab3A, el reclutament dependent de l'activitat de les vesícules sinàptiques a les zones actives i la recuperació de la transmissió sinàptica després d'una estimulació exhaustiva estaven deteriorades (Leenders *et al.*, 2001). Per tant, es concebible que la depleció del Rab3A en l'AME tingui defectes similars en la transmissió de les sinapsis neuromusculars. De fet, l'alliberació dels NTs evocats està disminuïda en ratolins amb AME abans que apareguin signes de denervació severa (Kong *et al.*, 2009; Ruiz *et al.*, 2010). Les nostres dades sobre reducció de la zona activa en els terminals presinàptics en els ratolins amb AME tipus 1 i SMAΔ7 són consistents amb les alteracions moleculars i funcionals observades i estan d'acord amb les dades publicades en el model d'SMAΔ7 (Kong *et al.*, 2008).

L'organització de les zones actives presinàptiques està estretament vinculat als canals de calci voltatge dependents (VGCCs), que tenen un paper important com a proteïnes estructurals a través de la seva interacció amb la laminina β2 (Chen *et al.*, 2011). Per tant, la regulació a la baixa dels VGCCs que trobem en l'AME està en concordança amb la reducció de les zones actives. Una possible causa del perquè els VGCCs estan disminuïts en l'AME podria ser que el gen que codifica pels canals de Ca²⁺ tingui diversos introns menors i per tant que estigui preferentment mal regulat.

Coady i Lorson (2011), en una revisió extensa sobre la biogènesi de les snRNPs presenten l'existència de dos tipus d'*spliceosome*, el major i el menor, de manera que aquest darrer està més afectat en l'AME. Els canals iònics voltatge dependents estan dins el grup dels introns menors; per tant, no seria d'estranyar que els canals de calci formessin part d'aquest grup de canals afectats; seria interessant aprofundir en l'estructura del gen dels canals de calci per tal de comprovar l'existència o no, d'aquests introns menors.

El nostre treball presenta resultats innovadors sobre les ZAs en estadis embrionaris, fins ara no descrits. Els defectes que han posat de manifest la majoria de grups fan referència a animals postnats, només Ling *et al.* (2011) havien observat defectes parcials en la innervació en edats embrionàries properes al naixement (E19,5) en el múscul serratus posterior inferior d'animals SMA Δ 7; no obstant, la detecció de defectes en embrions E17,5 era pràcticament nul·la. Els nostres resultats indiquen que els animals amb AME tipus I tenen defectes, significatius, en les NMJs a nivell embrionari; mentre que en els ratolins amb SMA Δ 7, s'observa una tendència a patir aquests defectes. Proteïnes de les ZAs com Munc18 que participa en la translocació, ancoratge i exocitosi de les vesícules (Barclay, 2008) i RIM que és una proteïna efectora de Rab3A i que intervé en la plasticitat sinàptica (Pernía-Andrade i Jonas, 2011), ambdues es troben disminuïdes en els ratolins amb AME tipus 1 a E18, indicant per tant defectes primerencs en les NMJs. Aquestes proteïnes, juntament amb altres com el Piccolo/Bassoon i Munc13, entre d'altres, es transporten a les futures ZAs dins de les PTVs a través d'un transport axonal molt eficient (Shapira *et al.*, 2003; Ziv i Garner, 2004). A partir dels nostres resultats es poden plantejar tres possibles hipòtesis. La primera implicaria un dèficit, ja conegut, en el transport axonal, però en el supòsit que aquesta fos la hipòtesi correcta hauríem d'haver detectat anomalies en totes les proteïnes que formen les ZAs, com el Piccolo, i segons els nostres resultats aquest no està alterat. La segona seria que les PTVs són vesícules deficientes en Munc18 i RIM en ratolins que pateixen l'AME tipus 1; hi ha dos o tres tipus diferents de PTVs, per tant, podria ser que alguna d'aquestes PTVs sigui l'encarregada de transportar més quantitats de RIM i Munc18 i que precisament aquesta PTV, per raons del tot desconegudes, fos deficient en l'AME. I la tercera hipòtesi podria ser que l'expressió, transcripció o traducció de RIM i Munc18 estigués disminuïda, degut a les característiques del mateix gen, p.e que els seus gens tinguessin un alt contingut d'introns menors i que l'*splicing* es produís a través de l'*spliceosome* menor, conegut per estar severament afectat en l'AME. Per altra

banda, el fet que RIM estigui disminuït en l'AME implica que els canals de Ca^{2+} no es lligaran a les ZAs, creant per tant una deficiència d'aquestes, sumat a que els canals de Ca^{2+} podrien estar alterats per defectes en la seva síntesi. Ensenms, l'acostament dels canals de Ca^{2+} a les proteïnes sensores del Ca^{2+} estaran també impeditos (Südhof, 2004; Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011; Kaeser, 2011). En resum, tant la disminució de RIM com la de Munc18 comprometen el correcte establiment i funcionament de les ZAs. Aquests resultats concorden amb les nostres troballes i les d'altres grups a nivell ultraestructural en què hi ha menys densitat de vesícules sinàptiques a les ZAs (Kong *et al.*, 2009; Dachs *et al.*, 2011; Eggermann *et al.*, 2012) i en els defectes en la transmissió dels senyals (Kong *et al.*, 2009; Ling *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2010). Pel que fa als SMAA7, van un pas enrere a l'hora de patir els defectes tan a les NMJs com a les MNs i no s'observa una disminució significativa ni de RIM ni de Munc18 a E18, tot i que si que es pot observar una lleugera disminució de Munc18 implicant per tant Munc18 com a una de les proteïnes més afectades en l'AME. Així doncs, seria molt interessant aprofundir en el transport de les PTVs, i realitzar una anàlisi exhaustiva, almenys, de Munc18 i RIM, les dues proteïnes fins al moment més afectades en estadis aparentment asimptomàtics.

Afectació muscular: Increment de l'apoptosi i disminució dels macròfags al múscul

L'augment de l'apoptosi de les cèl·lules satèl·lit musculars en els músculs d'animals AME tipus 1 a l'edat de P5-6 està relacionada amb la progressió de la malaltia. Després d'un cribratge ultraestructural extensiu, no hem vist apoptosi en altres tipus de cèl·lules musculars. Per tant, les cèl·lules mononucleades positives per la caspasa-3 activa i TUNEL observades amb el microscopi òptic és probable que, majoritàriament, siguin cèl·lules satèl·lit. Per tal de determinar si aquest increment de l'apoptosi muscular és degut a una deficiència d'SMN i/o una resposta secundària a la denervació muscular, hem seccionat el nervi ciàtic de ratolins WTT1 nounats i a les 48 i 72 hores posteriors a l'axotomia, hem recomptat les apoptosis. No hem observat diferències entre el costat ipsi- i el contra-lateral, per tant, podem concloure que la causa de la mort per apoptosi de les cèl·lules satèl·lit no és una resposta secundària a la denervació muscular. Està establert que les cèl·lules satèl·lit són la font dels precursors

miogènics pel creixement postnatal del múscul (Bischoff *et al.*, 1989) i que això es deu principalment a la formació de miotubs secundaris (Ross *et al.*, 1987a). Durant el desenvolupament embrionari de rates, els miotubs primaris es desenvolupen de manera autònoma, fins i tot en absència d'innervació, però la generació de miotubs secundaris és regula sota influència nerviosa (Ross *et al.*, 1987b). Els nostres histogrames denoten una aturada en el creixement de les fibres musculars en els ratolins AME tipus 1, suggerint una afectació en la formació de miotubs secundaris, afectació que es podria explicar per l'apoptosi de les cèl·lules satèl·lit i per dèficits en la innervació muscular. D'altra banda, la supressió de l'exó 7 del gen *SMN* adreçat a les cèl·lules satèl·lit musculars és suficient per induir una miopatia greu, indicant que el múscul, en si mateix, és un factor important en la patologia de l'AME (Nicole *et al.*, 2003). La deleció del gen *Smn*, a través del sistema Cre-loxP, restringida al múscul esquelètic determina un procés de degeneració miopàtica (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2001), aquest sistema, permet mantenir, intacte, l'expressió del gen *Smn* a les cèl·lules satèl·lit, fet que repercuteix en una millora en el fenotip muscular (Nicole *et al.*, 2003). Les nostres dades sobre l'apoptosi en les cèl·lules satèl·lit en ratolins AME, van en paral·lel amb les observacions d'un gran nombre de nuclis apoptòtics trobats en les biòpsies de músculs de nens amb AME (Fidzianska *et al.*, 1990; Tews *et al.*, 1996). L'estudi de l'apoptosi en ratolins SMA Δ 7 ens indica que el procés apoptòtic comença al principi de l'aparició dels símptomes, per tant, no és exclusiu de les etapes terminals de la malaltia.

En contrast amb els ratolins P5-6, es va observar que tant els ratolins WT com els AME recent nascuts (P0-1) tenien apoptosi en el múscul. Això probablement reflecteix els processos de remodelació que succeeixen de forma natural en el múscul en desenvolupament, on els macròfags juguen un paper important en l'eliminació fisiològica de les fibres mortes (Abood i Jones, 1991). Encara que, pel que sabem, no hi ha estudis sistemàtics de la regulació de la mort cel·lular programada en el múscul de mamífers, hi ha però, evidències que la mort de cèl·lules musculars passa en el desenvolupament normal de l'embrió de pollastre (McClearn *et al.*, 1995).

Pel que fa a la suposada funció específica de la proteïna SMN en les cèl·lules musculars, Walker *et al.* (2008), en estudis amb *Drosophila*, han demostrat que SMN participa en l'organització estructural de la banda Z. Les nostres observacions en què determinades àrees del múscul patien una desorganització miofibril·lar focal, exclusiva a la banda Z, mentre que la miosina i els filaments d'actina adjacents no estaven

afectats, en el múscul de ratolins amb AME, podrien concordar amb els resultats previs de Walker *et al.* (2008).

Donada l'elevada quantitat d'apoptosis trobades en els músculs de ratolins amb AME tipus 1, esperàvem trobar un increment de la densitat de macròfags dins el teixit connectiu del múscul; macròfags, que serien reclutats per eliminar les cèl·lules mortes. No obstant, vam observar el contrari, la densitat de macròfags, en els músculs dels ratolins malalts, era d'entre un 25-50% menor comparada amb els controls. Se sap que els macròfags en el múscul esquelètic són cèl·lules altament versàtils amb funcions oposades, és a dir, poden augmentar el dany tissular o promoure el creixement i la reparació del teixit (Arnold *et al.*, 2007); de fet, els macròfags són crítics en la reparació del múscul esquelètic, perquè alliberen citoquines i factors de creixement que controlen l'activació i proliferació de les cèl·lules satèl·lit (Jejurikar i Kuzon, 2003). A més a més els macròfags tenen una funció anti-apoptòtica, com està demostrat *in vitro*, en les cèl·lules satèl·lit del múscul; també està demostrat que MCP-1, alliberat per les cèl·lules precursors de múscul, és un dels principals factors que influeix en la quimiotaxi dels monòcits (Chazaud *et al.*, 2003). Tot i que vàrem trobar una reducció d'MCP-1 en els extractes de múscul de ratolins AME tipus 1, cal investigar amb més profunditat, si la disminució dels macròfags està relacionada amb un increment de l'apoptosi al múscul i amb una deficiència en la miogènesi postnatal. En qualsevol cas, la disminució dels macròfags és específica de teixit, ja que no s'ha observat ni a la melsa ni al fetge. Curiosament, les alteracions dels macròfags en animals SMA Δ 7 només es van observar al múscul IC de ratolins nounats, indicant que com passa en els humans, la malaltia s'expressa diferent en els ratolins en funció del seu genotip.

La implicació directa del múscul en la malaltia de l'AME cada vegada està més clara. El nostre treball demostra les anomalies a nivell de la unió neuromuscular, els defectes en el desenvolupament i la maduració del múscul, així com l'increment de l'apoptosi. Altres estudis recents impliquen, també, el múscul com a diana principal en l'AME. Per una banda, Mutsaers *et al.* (2011) han utilitzat la part rostral del múscul LAL, coneguda per no estar afectada en l'AME, per a estudis moleculars en el múscul esquelètic de ratolins, pre-sintomàtics, amb AME tipus I. Detecten anomalies en l'expressió de diverses proteïnes, moltes d'elles relacionades amb la regulació de la funció muscular, en vies de senyalització implicades en la mort cel·lular i el desenvolupament morfològic. Atribuïnt, directament, la deficiència d'SMN com a causa principal de la patologia muscular de l'AME, que s'ha considerat des dels inicis dels

estudis de la malaltia com a una patologia secundària; aquest fet ve corroborat per la detecció de proteïnes alterades en l'AME que són diferents a les proteïnes que s'alteren en processos de denervació, tant aguda, com crònica; per exemple, una proteïna regulada a l'alta en els ratolins amb AME és la Vdac2, proteïna mitocondrial associada amb la formació de canals a la membrana externa del mitocondri i responsable de la regulació de les vies implicades en la mort cel·lular i de la senyalització del calci. Aquestes proteïnes alterades en els ratolins amb AME també ho estan en pacients amb AME tipus II i III. Per altra banda, Lee *et al.* (2011), estudiant els músculs distals soli i EDL i el múscul proximal StM, detecten que en recomptes de les unitats motores i els axons no troben mort neuronal; a més a més, l'estudi del diàmetre de totes les fibres és inferior en els músculs afectats indicant, per tant, que no hi ha cap subpoblació de MNs que moren deixant fibres denervades. Així com nosaltres, indiquen defectes en el creixement, maduració i reparació muscular en tots els músculs analitzats.

Afectació dels òrgans del sistema immunològic

Hem trobat una apoptosi massiva a l'escorça del timus de ratolins AME. Un fenotip similar de mort massiva dels limfòcits corticals s'ha publicat en ratolins deficientes en TrkB, suggerint un paper de la senyalització de TrkB en la regulació de l'apoptosi (Garcia-Suarez *et al.*, 2002). Tot i que no tenim cap evidència que la proteïna SMN pugui estar implicada en l'apoptosi dels limfòcits corticals del timus, si que està demostrat que l'activació de la via TrkB-PI3K-AKT inhibeix la GSK3 (**Fig. 18**). Quan la GSK3 està fosforilada a la serina 9 (inhibida), incrementen les proteïnes anti-apoptòtiques com Bcl-2, mentre que si està activada incrementen les proteïnes pro-apoptòtiques com Bax o p53 (**Fig. 19**). A més a més, recentment s'ha descobert que inhibidors de la GSK3 incrementen els nivells d'SMN (Makhortova *et al.*, 2011). Aquestes evidències juntament amb el suggeriment de García-Suárez *et al.* (2002), ens poden indicar que la disminució d'SMN en l'AME, podria estar relacionat amb l'increment de l'apoptosi al timus. En la mateixa línia, Ruberti *et al.* (2000), van identificar una altra neurotrofina (factor de creixement nerviós, NGF) que evita la mort dels limfòcits a la melsa i la distròfia al múscul esquelètic. L'atròfia que nosaltres hem observat en els òrgans limfoides es detecta també en animals que pateixen dos tipus de progressió diferent de l'esclerosi múltiple; a part de l'atròfia, també s'ha observat un

increment de l'apoptosi que podria contribuir a alterar les citoquines i a un increment d'anticossos contra la *myelin oligodendrocyte glycoprotein*; suggereixen que hi ha una alteració en l'equilibri de la resposta immunitària de Th1 (citoquines capaces d'activar macròfags i cèl·lules citotòxiques, fenotip CD4⁺) *versus* Th2 (activen les cèl·lules B, CD4⁺) (Tsunoda *et al.*, 2005). Els nostres resultats obtinguts per citometria de flux no indiquen cap canvi significatiu en els nivells de CD4⁺ al timus dels animals AME respecte dels controls, però el fet que els macròfags estiguin disminuïts al múscul i que MCP-1 també estigui regulada a la baixa, podria ser un indicador que la resposta Th1 està impedita; per a poder-ho confirmar, cal estudis exhaustius amb marcadors de limfòcits que desencadenen la resposta immunitària Th1 (INF- γ , el tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-12 i IL-18) i Th2 (IL-4) per tal d'esbrinar si hi ha una alteració en l'equilibri de la resposta immunitària. D'altra banda, l'augment de l'apoptosi dels timòcits podria ser una resposta secundària en els animals terminals estressats. L'apoptosi de les cèl·lules corticals del timus és evident en humans que han patit un període d'estrès (Middelton *et al.*, 1994); de fet, els glucocorticoides i diversos tipus d'estrès, com elevades temperatures, l'estrès físic, les malalties cròniques i l'estrès per immersió a l'aigua (on per exemple hi ha atròfia del timus i una disminució de la població dels CD4⁺CD8⁺ (doble positius) i un increment dels macròfags, resultats diferents als nostres) poden induir l'apoptosi i involució del timus, i canvis en els subgrups de limfòcits i l'expressió de molècules d'adhesió a la melsa on, per exemple, hi ha un increment dels limfòcits CD4⁺ però no dels CD8⁺, com succeeix en els nostres ratolins (Wyllie, 1980; Tarcic *et al.*, 1995; Tarcic *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 2004). Recentment ha estat demostrat que la disminució d'SMN en altres tipus cel·lulars, a part de les MNs, pot contribuir significativament en la patologia de l'AME (Ling *et al.*, 2010), s'ha descrit defectes al cor de pacients amb AME (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2008). La causa de les anomalies cardíaca, que sovint acaben amb una aturada cardíaca, es deu a l'increment de la fibrosi, produïda per una desajustament entre la síntesi i la degradació de la matriu extracel·lular. Una possible causa de l'increment de la fibrosi és l'augment de l'estrès oxidatiu causat per ROS. Estudis de tractament amb scAAV9, que expressen cDNA de FL-SMN, en animals SMA Δ 7, demostren una restauració parcial dels defectes cardíacs en els animals tractats; no obstant, malgrat la millora, la mort dels animals deguda a les anomalies cardíaca continuava essent elevada (Shababi *et al.*, 2012). Alhora, pacients amb insuficiència cardíaca crònica, en

què anomalies inflamatòries i autoimmunes intervenen en la progressió de la malaltia, tenen les cèl·lules T reguladores (T_{reg}) defectuoses, tant en nombre com en la seva funció. La causa d'aquests defectes rau en un increment de l'apoptosi de les T_{reg} ²² i les dificultats que tenen en la seva sortida del timus, implicant per tant, el timus com a òrgan defectuós primari en pacients amb insuficiència cardíaca crònica (Tang *et al.*, 2011). Per tant, seria molt interessant detectar si els defectes cardíacs poden tenir a veure amb l'aplàsia del timus. En resum, els defectes en el òrgans limfàtics observats poden ser deguts a diversos factors, per tant, seria interessant aprofundir més en l'estudi de les poblacions dels limfòcits i determinar si l'atròfia selectiva dels òrgans immunes, com ara la melsa i el timus, és un defecte primari en el sistema immune de ratolins que desenvolupen una forma severa de l'AME, i descartar que l'estrès per manca d'ingesta sigui la causa de la involució dels òrgans limfoides. Curiosament, Ruberti *et al.* (2000) van descobrir una altra neurotrofina (l'NGF) que evita la mort dels limfòcits a la melsa. Ratolins adults que tenen l'NGF KO pateixen defectes severes en les neurones colinèrgiques del prosencèfal, mort cel·lular a la melsa (sobretot a la polpa vermella) i distròfia dels músculs esquelètics (sobretot dels músculs extensors de les potes posteriors), indicant que l'NGF podria tenir un paper en el desenvolupament de les miofibres, sovint, també presentaven escoliosi a l'esquena, a part de tenir una mida i pes molt inferior al dels controls. Donat que aquest fenotip té similituds amb els nostres ratolins, seria interessant mirar si l'NGF té alguna cosa a veure amb l'atròfia esplènica.

Tractament amb liti

Els esforços per trobar una cura per l'AME van dirigits a restaurar el gen *SMN* a totes les cèl·lules a través d'enginyeria genètica o a incrementar els nivells d'*SMN2* amb l'ús de fàrmacs. El tractament amb liti ha estat històricament lligat a determinades malalties psiquiàtriques com és el cas del trastorn bipolar (Manji *et al.*, 1999). El fet que en els darrers anys s'hagi descobert que dosis inferiors a les terapèutiques del liti tenen efectes neuroprotectors (Chuang i Manji, 2007; Young *et al.*, 2008; Calderó *et al.*, 2010) va instar a Fornai *et al.* (2008) a provar el liti en l'ELA, obtenint resultats prometedors en què en un model de ratolins SOD1 (G93A) desapareixia l'astrogliosi

²² Les cèl·lules Treg o supressores, és una subpoblació de cèl·lules T que *down-regulen* el sistema immunitari, mantenen la tolerància als antígens propis i *down-regulen* les malalties autoimmunes. Expressen CD4, CD25 i Foxp3.

reactiva i es preservaven les MNs de la ME; i en pacients humans, el liti, retardava la progressió de la malaltia. Aquests resultats, però, no han estat confirmats en altres estudis; Pizzasegola *et al.* (2009), injecten 1mEq/Kg (tal i com van fer Fornai *et al.* [2008]) i obtenen uns nivells de liti 10 vegades inferiors als de Fornai; a més a més, no observen efectes neuroprotectors del liti en les MNs de la banya ventral de la zona lumbar de la ME dels ratolins tractats, i tampoc observen cap millora ni en l'increment de l'autofagia ni en l'activitat mitocondrial. Per altra banda, Gill *et al.* (2009) observen un lleuger increment, no significatiu, en l'avançament dels defectes neurològics en la fase d'inici de la malaltia en els ratolins tractats, respecte dels controls; tampoc observen efectes positius en els ratolins G93A.

Nosaltres hem provat el liti, en dosis terapèutiques, en els ratolins SMAΔ7, ratolí majoritàriament utilitzat en estudis de tractament de l'AME. Els motius pels quals vàrem decidir fer aquest assaig amb el liti van ser dos. En primer lloc, per observar si els resultats obtinguts per Fornai (2008) a l'ELA es podien extrapolar a l'AME; i en segon lloc, perquè se sap que el liti inhibeix la GSK-3β (Quiroz *et al.*, 2004), proteïna que a través de la cascada de senyalització engegada per PDGF (PDGF-PI3K-AKT) incrementava, considerablement, els nivells d'SMN (Makhortova *et al.*, 2011). Recentment s'ha confirmat que la regulació a l'alça de la GSK3 produeix petites molècules que la inhibeixen (p.e BIP-135), aquestes molècules provades en animals SMAΔ7 allarguen la vida mitja dels animals i incrementen els nivells d'SMN en fibroblasts de pacients amb AME (Chen *et al.*, 2012). Per altra banda, a llarg termini, el liti té efectes en el citoesquelet que tenen a veure amb el control que exerceix la unió de les Wnts, o d'un agent mimètic com és el liti, amb el seu receptor en la formació del complex GSK3²³-axina-APC, en què aquesta unió es trenca fet que provoca una estabilització de la β-catenina, que alhora modula la dinàmica dels microtúbuls en els cons de creixement i fa que augmentin les ramificacions (Harwood, 2005). Nosaltres hem injectat liti per tal d'obtenir una dosi en sang d'1mEq/L, sobrepasant les dosis efectives per a la neuroprotecció (5mmol/L; Chuang i Manji, 2007). Els resultats que hem obtingut en referència a l'increment de pes dels animals tractats es correlacionen amb els d'altres grups (Levine i Saltzman, 2006). Els nostres resultats no són del tot prometedors, tot i demostrar que el liti és efectiu en la inhibició de la GSK3, els nivells

²³La GSK-3 està implicada en la regulació de la quimiotaxis en els cons de creixement i en la morfologia neuronal. La GSK-3 inactiva (fosforilada a l'extrem N-terminal) està a la perifèria dels cons de creixement que estan migrant (Harwood, 2005).

d'SMN no incrementen ni a ME ni al múscul i tampoc observem un increment de les ramificacions en els cons de creixement; no obstant, un increment de l'expressió d'SMN a les MNs indica un lleuger efecte positiu. Per altra banda, tot i administrar dosis terapèutiques, s'observa un alt grau de toxicitat, també observada en ratolins C57B1/6J (Yoshioka *et al.*, 2009), que ens indica que a part del sistema neuromuscular, altres òrgans com els ronyons o el fetge, podrien estar afectats. De fet, la mateixa concentració de liti té efectes oposats en funció de l'estat de maduració de les neurones. En cèl·lules granulars del cerebel immadures el liti provoca l'apoptosi, mentre que en les mateixes cèl·lules, però madures, la mort apoptòtica induïda per la manca de K^+ extracel·lular s'evitava quan s'afegia Li^+ . La mateixa concentració de liti per tant, evita l'apoptosi de les neurones madures, mentre s'activa en les immadures (D'Mello *et al.*, 1994). En les MNs no s'observa un increment de l'apoptosi, no obstant, no podem descartar que aquestes siguin més vulnerables a la toxicitat del liti. Un efecte positiu del liti l'observem a nivell renal, mentre que els glomèruls dels animals amb AME no tractats tenen una disminució significativa del nombre de nuclis, els animals amb AME tractats tenen un increment significatiu d'aquests, arribant a obtenir el mateix nombre de nuclis/glomèrul que els animals controls. Aquest efecte podria ser degut a la inhibició de la GSK3- β produïda pel liti, que incrementaria l'expressió de proteïnes anti-apoptòtiques. Malgrat tot, podria ser que possibles efectes neuroprotectors del liti no s'evidenciïn en aquest model murí d'AME bastant sever, on la vida dels ratolins és molt curta. No podem descartar possibles efectes neuroprotectors del liti en altres models menys aguts, en els quals l'inici del tractament podria ser en edats més avançades, per tant on la maduresa dels teixits ja estigui assolida.

IX CONCLUSIONS

Primera

La mort de les motoneurons en ratolins AME tipus 1 és moderada i no es produeix fins a les etapes finals de la malaltia. No obstant, l'observació de l'astròglia activada en aquests animals acabats de néixer indica que hi ha alteracions a la medul·la espinal en edats molt joves.

Segona

Les unions neuromusculars presenten defectes d'organització molecular previs a l'aparició dels símptomes. El neuropèptid CGRP, la proteïna presinàptica Rab3A i els canals de calci voltatge dependents tipus N, estan significativament disminuïts en les unions neuromusculars dels músculs proximals dels ratolins nounats amb AME tipus I, indicant defectes primerencs a la placa motora; en canvi, proteïnes presinàptiques de tipus estructural com la sinaptofisina, l'SV2 i el neurofilament ens indiquen que la denervació és més aviat escassa. Per altra banda, en els nounats amb AME delta 7, malgrat s'observi una tendència en la disminució d'aquests marcadors, les diferències no són significatives. D'altra banda, el CGRP propi de la innervació sensorial/vegetativa no es troba afectat per l'AME indicant que la seva alteració es específica de MN.

Tercera

En les plaques innervades, l'anàlisi morfomètric del terminals presinàptics mostra una reducció en la complexitat de les seves branques i de l'ocupació de la superfície postsinàptica. Això demostra que en condicions d'AME, hi ha defectes estructurals subtils en les plaques motores innervades.

Quarta

Les proteïnes presinàptiques, RIM i Munc18, relacionades amb l'ancoratge i l'exocitosi de les vesícules sinàptiques, estan significativament disminuïdes, fins i tot en les etapes embrionàries dels ratolins amb AME tipus I, indicant alteracions en la unió neuromuscular en etapes primerenques de la seva formació.

Cinquena

L'expressió del CGRP en les motoneurons toràciques de la banya ventral està disminuïda en ratolins nounats AME tipus I, suggerint que el defecte en el contingut presinàptic de CGRP no és degut a la manca del transport.

Sisena

Els canvis ultraestructurals dels músculs de ratolins amb AME tipus I indiquen alteracions en l'organització de les zones actives de les unions neuromusculars, que es correlacionarien amb les disminucions dels marcadors presinàptics relacionats amb proteïnes que intervenen en la unió de les vesícules als terminals presinàptics.

Setena

Els ratolins amb AME tipus I, també presenten defectes en la maduració de la membrana postsinàptica. També hi ha una desorganització dels miofilaments amb una dissolució focal de la banda Z.

Vuitena

L'anàlisi ultraestructural, juntament amb la tècnica de TUNEL mostren un increment significatiu de l'apoptosi muscular en els ratolins amb AME tipus I. Aquest increment no es deu a la denervació donat que: a) la denervació és escassa i b) en experiments de denervació en animals WT no s'indueix l'apoptosi d'aquestes cèl·lules.

Novena

L'increment d'apoptosi de cèl·lules satèl·lit musculars no es correlaciona amb un augment específic de la densitat de macròfags en el múscul, indicant que hi pot haver defectes en l'atracció dels macròfags per part de les cèl·lules apoptòtiques o bé defectes en determinades poblacions de macròfags en els animals amb AME tipus I. Per contra, tot i l'augment d'apoptosis en els animals AME delta 7 els macròfags no es troben disminuïts. Aquests resultats ens indiquen que l'afectació de la població macrofàgica només succeeix en els animals que pateixen la malaltia de forma severa.

Desena

L'anàlisi histològic del ronyó d'animals amb AME delta 7 mostra alteracions estructurals en el desenvolupament glomerular. Aquestes alteracions inclourien un increment de l'apoptosi de les cèl·lules glomerulars.

Onzena

L'administració de LiCl en animals amb AME delta 7, tot i inhibir la GSK3, no millora ni la supervivència dels animals afectats ni el seu fenotip. I s'observa una acumulació de liti, amb efectes tòxics, al plasma dels animals amb AME que han rebut dosis de 2 mEq/L. No obstant, malgrat els nivells totals d'SMN no incrementen, si que hi ha un increment en l'expressió d'SMN a les motoneurons.

Dotzena

Els efectes nefrotòxics del liti, en animals amb AME, es reflecteixen en un augment d'estructures quístiques. No obstant, mitjançant la quantificació de la densitat nuclear glomerular, s'observa un increment dels nuclis que es podria explicar per una reversió del fenomen apoptòtic glomerular inherent en l'AME.

Tretzena

Els glomèruls del ronyons dels animals SMAΔ7 pateixen una defecte en la seva maduració. Indicant que l'AME es una malaltia sistèmica amb diferent grau d'afectació en funció del teixit.

X REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

A

Abood EA, Jones MM (1991). *Macrophages in developing mammalian skeletal muscle: evidence for muscle fibre death as a normal developmental event*. Acta Anat (Basel). 140:201-12.

Acharya JK, Labarca P, Delgado R, Jalink K, Zuker CS (1998). *Synaptic defects and compensatory regulation of inositol metabolism in inositol polyphosphate 1-phosphatase mutants*. Neuron. 20:1219-29.

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ (1999). *Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents*. Cancer Res. 59:2615-22.

Ahmad S, Wang Y, Shaik GM, Burghes AH, Gangwani L (2012). *The zinc finger protein ZPR1 is a potential modifier of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 2012 Mar 27. [Epub ahead of print]

Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H, Takada S, Matsuo M, Nakamura H (2002). *Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity*. Kobe J Med Sci. 48:25-31.

Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M,

Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH (2001). *Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients*. Hum Mol Genet. 10:2841-9.

Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004). *Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy*. Eur J Hum Genet. 12:59-65.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007). *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med. 204:1057-69.

Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ (2007). *Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy*. J Clin Invest. 117:659-71.

Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND (2004). *Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy*. J Clin Invest. 114:1726-31.

B

Bail S, Kiledjian M (2008). *DcpS, a general modulator of cap-binding protein-dependent processes?* RNA Biol. 5:216-9.

Barbeito AG, Mesci P, Boillée S (2012). *Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS.* J Neural Transm. 117:981-1000.

Barclay JW (2008). *Munc-18-1 regulates the initial release rate of exocytosis.* Biophys J. 94:1084-93.

Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L (2000). *Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes.* Mol Med. 6:957-68.

Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS (2000). *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells.* J Cell Biol. 151:1221-34.

Béchade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La Bella V, Pettmann B, Triller A. (1999) *Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport.* Eur J Neurosci. 11:293-304.

Berciano MT, Novell M, Villagra NT, Casafont I, Bengoechea R, Val-Bernal JF, Lafarga M (2007). *Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons.* J Struct Biol.

158:410-20.

Berglund L, Hoffmann HJ, Dahl R, Petersen TE (1999). *VAMP-1 has a highly variable C-terminus generated by alternative splicing.* Biochem Biophys Res Commun. 264:777-80.

Bernal S, Also-Rallo E, Martínez-Hernández R, Alías L, Rodríguez-Alvarez FJ, Millán JM, Hernández-Chico C, Baiget M, Tizzano EF (2011). *Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) sibilings.* Neuromuscul Disord. 21:413-9.

Bernasconi M, Remppis A, Fredericks WJ, Rauscher FJ 3rd, Schäfer BW (1996). *Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93:13164-9.

Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR (1989). *Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis.* Cell. 59:411-9.

Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, Cifuentes-Diaz C, Li H, della Gaspera B, Chanoine C, Charbonnier F (2008). *Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse.* Neurosci. 28:953-62.

Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, Pariset C, Lécolle S, Côté J, Chanoine C, Charbonnier F (2010). *In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene*

expression in severe spinal muscular atrophy mice. J Neurosci. 30:11288-99.

Bischoff R (1989). *Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture.* Med Sci Sports Exerc. 21(5 Suppl):S164-72.

Bischoff R, Franzini-Amstrong C. *Satellite and stem cells in muscle regeneration.* In: Engel AG, Franzini-Amstrong C, eds. *Myology: Basic and clinical*, vol 1. New York, NY: McGraw-Hill, 2004:66-86

Boon KL, Xiao S, McWhorter ML, Donn T, Wolf-Saxon E, Bohnsack MT, Moens CB, Beattie CE (2009). *Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects.* Hum Mol Genet. 18:3615-25.

Borisov AB, Dedkov EI, Carlson BM (2005). *Abortive myogenesis in denervated skeletal muscle: differentiative properties of satellite cells, their migration, and block of terminal differentiation.* Anat Embryol (Berl). 209:269-79.

Bosch-Marcé M, Wee CD, Martinez TL, Lipkes CE, Choe DW, Kong L, Van Meerbeke JP, Musarò A, Sumner CJ (2011). *Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice.* Hum Mol Genet. 20:1844-53.

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

Bowerman M, Anderson CL, Beauvais A, Boyl PP, Witke W, Kothary R (2009). *SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis.* Mol Cell Neurosci. 42:66-74.

Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL, Kothary R (2010). *Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model.* Hum Mol Genet. 19:1468-78.

Boulisfane N, Choleza M, Rage F, Neel H, Soret J, Bordonné R (2011). *Impaired minor tri-snRNP assembly generates differential splicing defects of U12-type introns in lymphoblasts derived from a type I SMA patient.* Hum Mol Genet. 20:641-8.

Brahe C, Servidei S, Zappata S, Ricci E, Tonali P, Neri G (1995). *Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy.* Lancet. 346:741-2.

Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P (1995). *Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy.* Lancet. 345:694-5. Erratum in: Lancet 1995 345:1060.

Briese M, Esmaeili B, Sattelle DB (2005). *Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes?* Bioessays. 27:946-57.

Briese M, Esmaeili B, Fraboulet S, Burt EC, Christodoulou S, Towers PR, Davies KE, Sattelle DB (2009). *Deletion of smn-1, the Caenorhabditis elegans ortholog of the spinal muscular*

atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan. Hum Mol Genet. 18:97-104.

Burghes AH, Beattie CE (2009). *Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?* Nat Rev Neurosci. 10:597-609.

Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S (1998). *The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 7:1927-33.

Burnett BG, Muñoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH (2009). *Regulation of SMN protein stability.* Mol Cell Biol. 29:1107-15.

Burt EC, Towers PR, Sattelle DB (2006). *Caenorhabditis elegans in the study of SMN-interacting proteins: a role for SMI-1, an orthologue of human Gemin2 and the identification of novel components of the SMN complex.* Invert Neurosci. 6:145-59.

Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdóttir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andrésón T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes AH, Gurney ME (2010). *Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 19:454-67.

C

Cade J (1949). *Lithium salts in the treatment of psychotic excitement.* Med J Australia 36 349

Calderó J, Casanovas A, Sorribas A, Esquerda JE (1992). *Calcitonin gene-related peptide in rat spinal cord motoneurons: subcellular distribution and changes induced by axotomy.* Neuroscience. 48:449-61.

Calderó J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, Esquerda JE (2010). *Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord.* Neuroscience. 165:1353-69.

Cao G, Ko CP (2007). *Schwann cell-derived factors modulate synaptic activities at developing neuromuscular synapses.* J Neurosci. 27:6712-22.

Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE (2006). *Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis.* J Neurosci. 26:11014-22.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002). *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.* Nat Rev Genet. 3:285-98.

Caraballo-Miralles V, Cardona-Rossinyol A, Garcera A, Villalonga P, Soler RM, Olmos G, Lladó J (2012). *SMN deficiency attenuates migration of U87MG astroglia cells through the activation of RhoA.* Mol Cell Neurosci. 49:282-9.

Casanovas A, Ribera J, Hager G, Kreutzberg GW, Esquerda JE (2001). *c-Jun regulation in rat neonatal motoneurons postaxotomy*. J Neurosci Res. 63:469-79.

Cassano M, Biressi S, Finan A, Benedetti L, Omes C, Boratto R, Martin F, Allegretti M, Broccoli V, Cusella De Angelis G, Comoglio PM, Basilico C, Torrente Y, Michieli P, Cossu G, Sampaolesi M (2008). *Magic-factor 1, a partial agonist of Met, induces muscle hypertrophy by protecting myogenic progenitors from apoptosis*. PLoS One. 3(9):e3223.

de Castro BM, De Jaeger X, Martins-Silva C, Lima RD, Amaral E, Menezes C, Lima P, Neves CM, Pires RG, Gould TW, Welch I, Kushmerick C, Guatimosim C, Izquierdo I, Cammarota M, Rylett RJ, Gomez MV, Caron MG, Oppenheim RW, Prado MA, Prado VF (2009). *The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function*. Mol Cell Biol. 29:5238-50.

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

Chakraborty G, Saito M, Mao RF, Wang R, Vadasz C, Saito M (2008). *Lithium blocks ethanol-induced modulation of protein kinases in the developing brain*. Biochem Biophys Res Commun. 367:597-602.

Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C,

Thomas N, Trülsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M (2003). *Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant*. Hum Mol Genet. 12:1367-76.

Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001). *Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate*. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:9808-13.

Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ (2004). *Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway*. Neurochem Int. 45:1107-12.

Chang HC, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A, Sridhar V, Fulga TA, Hart AC, Van Vactor D, Artavanis-Tsakonas S (2008). *Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila*. PLoS One. 3(9):e3209.

Chang T, Zheng W, Tsark W, Bates S, Huang H, Lin RJ, Yee JK (2011). *Brief report: phenotypic rescue of induced pluripotent stem cell-derived motoneurons of a spinal muscular atrophy patient*. Stem Cells. 29:2090-3.

Chari A, Paknia E, Fischer U (2009). *The role of RNP biogenesis in spinal muscular atrophy*. Curr Opin Cell Biol. 21:387-93.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, Authier FJ, Dreyfus PA, Gherardi RK (2003). *Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth*. J Cell Biol. 163:1133-43.

Chazaud B, Chrétien F, Gherardi RK (2007). *Macrophages regulate skeletal muscle regeneration*. Med Sci (Paris). 23:794-5.

Chazaud B, Brigitte M, Yacoub-Youssef H, Arnold L, Gherardi R, Sonnet C, Lafuste P, Chretien F (2009). *Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration*. Exerc Sport Sci Rev. 37:18-22.

Chen PC, Gaisina IN, El-Khodor BF, Ramboz S, Makhortova NR, Rubin LL, Kozikowski AP (2012). *Identification of a Maleimide-Based Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) Inhibitor, BIP-135, that Prolongs the Median Survival Time of $\Delta 7$ SMA KO Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy*. ACS Chem Neurosci. 3:5-11.

Chen J, Billings SE, Nishimune H (2011). *Calcium channels link the muscle-derived synapse organizer laminin $\beta 2$ to Bassoon and CAST/Erc2 to organize presynaptic active zones*. J Neurosci. 31:512-25.

Chuang DM, Manji HK (2007). *In search of the Holy Grail for the treatment of neurodegenerative disorders: has a simple cation been overlooked?* Biol Psychiatry. 62:4-6.

Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacène E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001). *Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy*. J Cell Biol. 152:1107-14.

Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C,

Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J (2002). *Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model*. Hum Mol Genet. 11:1439-47.

Clarke PGH, Oppenheim RW. *Neuron death in vertebrate development: In vivo methods*. In Schwartz LM, Osborne BA, eds. Methods in Cell Biology, vol. 46. New York, NY: Academic Press, 1995:277-321.

Coady TH, Lorson CL (2010). *Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy*. J Neurosci. 30:126-30.

Coady TH, Lorson CL (2011). *SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis*. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2:546-64.

Cohen P, Goedert M (2004). *GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov. 3:479-87.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino F, Bordoni A, Fortunato F, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Menozzi G, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP (2008). *Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy*. J Clin Invest. 118:3316-30.

Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP (2010).

Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice. Brain. 133:465-81.

Csillik B, Tajti L, Kovács T, Kukla E, Rakic P, Knyihár-Csillik E (1993). *Distribution of calcitonin gene-related peptide in vertebrate neuromuscular junctions: relationship to the acetylcholine receptor.* J Histochem Cytochem. 41:1547-55.

D

Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, Casanovas A, Calderó J, Esquerda JE (2011). *Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy.* J Neuropathol Exp Neurol. 70:444-61.

Dale JM, Shen H, Barry DM, Garcia VB, Rose FF Jr, Lorson CL, Garcia ML (2011). *The spinal muscular atrophy mouse model, SMAΔ7, displays altered axonal transport without global neurofilament alterations.* Acta Neuropathol. 122:331-41.

Deák F, Schoch S, Liu X, Südhof TC, Kavalali ET (2004). *Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis.* Nat Cell Biol. 6:1102-8.

Deng L, Kaeser PS, Xu W, Südhof TC (2011). *RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13.* Neuron. 69:317-31.

Devriendt K, Lammens M, Schollen E, Van Hole C, Dom R, Devlieger H,

Cassiman JJ, Fryns JP, Matthijs G (1996). *Clinical and molecular genetic features of congenital spinal muscular atrophy.* Ann Neurol. 40:731-8.

Dimitriadi M, Sleigh JN, Walker A, Chang HC, Sen A, Kalloo G, Harris J, Barsby T, Walsh MB, Satterlee JS, Li C, Van Vactor D, Artavanis-Tsakonas S, Hart AC (2010). *Conserved genes act as modifiers of invertebrate SMN loss of function defects.* PLoS Genet. 6(10):e1001172.

Di Nardo A, Gareus R, Kwiatkowski D, Witke W (2000). *Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms.* J Cell Sci. 21:3795-803.

D'Mello SR, Anelli R, Calissano P (1994). *Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons.* Exp Cell Res. 211:332-8.

Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000). *Zebrafish: bridging the gap between development and disease.* Hum Mol Genet. 9:2443-9.

Doi Y, Peng H, Kudo H, Hamasaki K, Fujimoto S (2000). *Expression of alpha-calcitonin gene-related peptide in the enteric nervous system of rat small intestine.* Neurosci Lett. 285:33-6.

Dorfman R (2012). *Modifier gene studies to identify new therapeutic targets in cystic fibrosis.* Curr Pharm Des. 18:674-82.

Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, Kirova Y, Caramelle P, Garcia L, Butler-

Browne G, Gherardi RK (2004). *Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches*. Am J Pathol. 164:773-9.

Dubowitz V (1999). *Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype*. Eur J Paediatr Neurol. 3:49-51.

Duclert A, Changeux JP (1995). *Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction*. Physiol Rev. 75:339-68.

Dundr M, Hebert MD, Karpova TS, Stanek D, Xu H, Shpargel KB, Meier UT, Neugebauer KM, Matera AG, Misteli T (2004). *In vivo kinetics of Cajal body components*. J Cell Biol. 164:831-42.

E

Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2012). *Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses*. Nat Rev Neurosci. 13:7-21.

El-Khodori BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suárez-Fariñas M, Heyes MP (2008). *Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMN^{Δ7} neonate model of spinal muscular atrophy*. Exp Neurol. 212:29-43.

Endesfelder S, Kliche A, Lochmüller H, von Moers A, Speer A (2005). *Antisense oligonucleotides and short interfering RNAs silencing the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 improve*

proliferation of Duchenne muscular dystrophy patients' primary skeletal myoblasts. J Mol Med (Berl). 83:64-71.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nat Med. 4:1313-7.

F

Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W (2012). *Spinal muscular atrophy: The role of SMN in axonal mRNA regulation*. Brain Res. 2012 Jan 28 [Epub ahead of print]

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

Farooq F, Molina FA, Hadwen J, MacKenzie D, Witherspoon L, Osmond M, Holcik M, MacKenzie A (2011). *Prolactin increases SMN expression and survival in a mouse model of severe spinal muscular atrophy via the STAT5 pathway*. J Clin Invest. 121:3042-50.

Fernández-Chacón R, Wölfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Muñoz M, Rosenmund C, Montesinos ML, Sanes JR, Schneggenburger R, Südhof TC (2004). *The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration*. Neuron. 42:237-51.

Fidziańska A, Goebel HH, Warlo I (1990). *Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a*

proposed pathogenetic mechanism. Brain. 113:433-45.

Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997). *The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis.* Cell. 90:1023-9.

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

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A (2008). *Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A. 105:2052-7.

Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK (2009). *Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes.* Nat Biotechnol. 27:59-65.

Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK (2010). *Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN.* Nat Biotechnol. 28:271-4.

Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH Jr (1998). *Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues.* Proc Natl Acad Sci U

S A. 95:6492-7.

Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangršič T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger ED, Liberman MC, Harke B, Bryan KE, Lee A, Egner A, Riedel D, Moser T (2010). *Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca²⁺ channels and vesicles to add release sites and promote refilling.* Neuron. 68:724-38.

Fidziańska A, Goebel HH, Warlo I (1990). *Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism.* Brain. 113:433-45.

Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J (2000). *Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 9:849-58.

Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, Melki J (2002). *The molecular bases of spinal muscular atrophy.* Curr Opin Genet Dev. 12:294-8.

G

Gabanella F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L (2005). *The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation.* Hum Mol Genet. 14:3629-42.

Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L (2007). *Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular*

atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. PLoS One. 2:e921.

Gall JG (2003). *The centennial of the Cajal body.* Nat Rev Mol Cell Biol. 4:975-80.

Gangwani L, Flavell RA, Davis RJ (2005). *ZPR1 is essential for survival and is required for localization of the survival motor neurons (SMN) protein to Cajal bodies.* Mol Cell Biol. 25:2744-56.

Garcera A, Mincheva S, Gou-Fabregas M, Caraballo-Miralles V, Lladó J, Comella JX, Soler RM (2011). *A new model to study spinal muscular atrophy: neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-X(L) Overexpression in motoneurons.* Neurobiol Dis. 42:415-26.

Garcia-Suarez O, Blanco-Gelaz MA, Lopez ML, Germana A, Cabo R, Díaz-Esnal B, Silos-Santiago I, Ciriaco E, Vega JA (2002). *Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice.* J Neuroimmunol. 129:25-34.

Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000). *Molecular determinants of presynaptic active zones.* Curr Opin Neurobiol. 10:321-7.

Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, Crawford TO, Gogliotti RG, DiDonato CJ, Monani UR, Morris GE, Burghes AH (2008). *Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect.* Hum Mol Genet.

17:1063-75.

Ge Y, Si J, Tian L, Zhuang S, Dworkin LD, Gong R (2011). *Conditional ablation of glycogen synthase kinase 3 β in postnatal mouse kidney.* Lab Invest. 91:85-96

Gensel JC, Nakamura S, Guan Z, van Rooijen N, Ankeny DP, Popovich PG (2009). *Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity.* J Neurosci. 29:3956-68.

Gibson SJ, Polak JM, Giaid A, Hamid QA, Kar S, Jones PM, Denny P, Legon S, Amara SG, Craig RK, et al (1988). *Calcitonin gene-related peptide messenger RNA is expressed in sensory neurones of the dorsal root ganglia and also in spinal motoneurons in man and rat.* Neurosci Lett. 91:283-8.

Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S (2009). *No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS.* PLoS One. 4:e6489.

Gogliotti RG, Quinlan KA, Barlow CB, Heier CR, Heckman CJ, DiDonato CJ (2012). *Motor neuron rescue in spinal muscular atrophy mice demonstrates that sensory-motor defects are a consequence, not a cause, of motor neuron dysfunction.* J Neurosci. 32:3818-29.

Gomez TM, Spitzer NC (2000). *Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives.* J Neurobiol. 44:174-83.

Gonzalez L Jr, Scheller RH (1999). *Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex*. Cell. 96:755-8.

Gowing G, Svendsen CN (2011). *Stem cell transplantation for motor neuron disease: current approaches and future perspectives*. Neurotherapeutics. 8:591-606.

Grice SJ, Sleigh JN, Liu JL, Sattelle DB (2011a). *Invertebrate models of spinal muscular atrophy: insights into mechanisms and potential therapeutics*. Bioessays. 33:956-65.

Grice SJ, Liu JL (2011b). *Survival motor neuron protein regulates stem cell division, proliferation, and differentiation in Drosophila*. PLoS Genet. 7:e1002030.

Gronard C, Biondi O, Armand AS, Lécolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005). *Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse*. J Neurosci. 25:7615-22.

Growney JD, Scharf JM, Kunkel LM, Dietrich WF (2000). *Evolutionary divergence of the mouse and human Lgn1/SMA repeat structures*. Genomics. 64:62-81

Grunwald DJ, Eisen JS (2002). *Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate*. Nat Rev Genet. 3:717-24.

Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G (2004). *The SMN complex*. Exp Cell Res.

296:51-6.

Guettier-Sigrist S, Coupin G, Braun S, Rogovitz D, Courdier I, Warter JM, Poindron P (2001). *On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy*. Fundam Clin Pharmacol. 15:31-40.

Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, Freyssinet JM, Poindron P, Warter JM (2002). *Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy*. Muscle Nerve. 25:700-8.

Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B (2003). *Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis*. Nat Rev Mol Cell Biol. 4:127-39.

H

Hallermann S, Fejtova A, Schmidt H, Weyhersmüller A, Silver RA, Gundelfinger ED, Eilers J (2010). *Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse*. Neuron. 68:710-23.

Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R (2011). *RIM determines Ca²⁺ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone*. Neuron. 69:304-16.

Hao le T, Wolman M, Granato M, Beattie CE (2012). *Survival motor neuron affects plastin 3 protein levels leading to motor defects*. J Neurosci. 32:5074-84.

- Harwood AJ (2005). *Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited*. Mol Psychiatry. 10:117-26.
- Hauke J, Riessland M, Lunke S, Eyüpoglu IY, Blümcke I, El-Osta A, Wirth B, Hahnen E (2009). *Survival motor neuron gene 2 silencing by DNA methylation correlates with spinal muscular atrophy disease severity and can be bypassed by histone deacetylase inhibition*. Hum Mol Genet. 18:304-17.
- Hedlund E (2011). *The protective effects of β -lactam antibiotics in motor neuron disorders*. Exp Neurol. 231:14-8.
- Henderson CE, Hauser SL, Huchet M, Dessi F, Hentati F, Taguchi T, Changeux JP, Fardeau M (1987). *Extracts of muscle biopsies from patients with spinal muscular atrophies inhibit neurite outgrowth from spinal neurons*. Neurology. 37:1361-4.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000). *A mouse model for spinal muscular atrophy*. Nat Genet. 24:66-70.
- Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000). *Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:9618-23.
- Holzbaur EL, Scherer SS (2011). *Microtubules, axonal transport, and neuropathy*. N Engl J Med. 365:2330-2.
- Horst D, Ustanina S, Sergi C, Mikuz G, Juergens H, Braun T, Vorobyov E (2006). *Comparative expression analysis of Pax3 and Pax7 during mouse myogenesis*. Int J Dev Biol. 50:47-54.
- Hua Y, Zhou J (2004a). *Survival motor neuron protein facilitates assembly of stress granules*. FEBS Lett. 572:69-74.
- Hua Y, Zhou J (2004b). *Modulation of SMN nuclear foci and cytoplasmic localization by its C-terminus*. Cell Mol Life Sci. 61:2658-63.
- Hua Y, Zhou J (2004c). *Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress*. Biochem Biophys Res Commun. 314:268-76.
- Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR (2011). *Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model*. Nature. 478:123-6.
- Huang X, Wu DY, Chen G, Manji H, Chen DF (2003). *Support of retinal ganglion cell survival and axon regeneration by lithium through a Bcl-2-dependent mechanism*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 44:347-54.
- Hyatt JP, Roy RR, Baldwin KM, Edgerton VR (2003). *Nerve activity-*

independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. Am J Physiol Cell Physiol. 285:C1161-73.

I

Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y (1997). *Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy.* Nature. 390:413-7.

J

Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (2000). *Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III.* Hum Mol Genet. 9:341-6.

Jablonka S, Holtmann B, Meister G, Bandilla M, Rossoll W, Fischer U, Sendtner M (2002). *Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death.* Proc Natl Acad Sci U S A. 99:10126-31.

Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M (2006). *Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 15:511-8.

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007). *Defective Ca²⁺ channel clustering in axon*

terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. J Cell Biol. 179:139-49.

Jahn R, Südhof TC (1994). *Synaptic vesicles and exocytosis.* Annu Rev Neurosci. 17:219-46.

Jansen JK, Fladby T (1990). *The perinatal reorganization of the innervation of skeletal muscle in mammals.* Prog Neurobiol. 34:39-90.

Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum SA, Bolshakov VY (1999). *Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I.* Neuron. 24:687-700.

R. Janz *Synaptic Vesicle Protein-2 (SV2)* (2009). Encyclopedia of Neuroscience. Elsevier. Pages 797-800

Jarecki J, Chen X, Bernardino A, Coover DD, Whitney M, Burghes A, Stack J, Pollok BA (2005). *Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 14:2003-18.

Jedrzejska M, Borkowska J, Zimowski J, Kostera-Pruszczyk A, Milewski M, Jurek M, Sielska D, Kostyk E, Nyka W, Zaremba J, Hausmanowa-Petrusewicz I (2008). *Unaffected patients with a homozygous absence of the SMN1 gene.* Eur J Hum Genet. 16:930-4.

Jejurikar SS, Kuzon WM Jr (2003). *Satellite cell depletion in degenerative*

skeletal muscle. Apoptosis. 8:573-8.

Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML (2010). *A feedback loop regulates splicing of the spinal muscular atrophy-modifying gene, SMN2*. Hum Mol Genet. 19:4906-17.

K

Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC (2011). *RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction*. Cell. 144:282-95.

Kaeser PS. *Pushing synaptic vesicles over the RIM*. (2011). Cell Logist. 1:106-110.

Kanamoto T, Mota M, Takeda K, Rubin LL, Miyazono K, Ichijo H, Bazenet CE (2000). *Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons*. Mol Cell Biol. 20:196-204.

Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010). *Motor neuron diversity in development and disease*. Annu Rev Neurosci. 33:409-40.

Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008). *Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 17:2552-69.

Kariya S, Mauricio R, Dai Y, Monani UR (2009). *The neuroprotective factor Wld(s) fails to mitigate distal axonal and neuromuscular junction (NMJ) defects in mouse models of spinal muscular atrophy*. Neurosci Lett. 449:246-51.

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

Kawai Y, Takami K, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Tohyama M (1985). *Topographic localization of calcitonin gene-related peptide in the rat brain: an immunohistochemical analysis*. Neuroscience. 15:747-63.

Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999). *RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules*. J Cell Biol. 147:1431-42.

Kernochan LE, Russo ML, Woodling NS, Huynh TN, Avila AM, Fischbeck KH, Sumner CJ (2005). *The role of histone acetylation in SMN gene expression*. Hum Mol Genet. 14:1171-82.

Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009). *Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord*. J Neurosci. 29:13435-44.

Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL (2006). *Importance of the different*

proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. J Biol Chem. 281:8582-90.

Klein PS, Melton DA (1996). *A molecular mechanism for the effect of lithium on development.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93:8455-9.

Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marcé M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009). *Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice.* J Neurosci. 29:842-51.

Kwon DY, Motley WW, Fischbeck KH, Burnett BG (2011a). *Increasing expression and decreasing degradation of SMN ameliorate the spinal muscular atrophy phenotype in mice.* Hum Mol Genet. 20:3667-77.

Kwon JE, Kim EK, Choi EJ (2011b). *Stabilization of the survival motor neuron protein by ASK1.* FEBS Lett. 585:1287-92.

L

La Bella V, Cisterni C, Salaün D, Pettmann B (1998). *Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated.* Eur J Neurosci. 10:2913-23.

La Bella V, Kallenbach S, Pettmann B (2000). *Expression and subcellular localization of two isoforms of the survival motor neuron protein in different cell types.* J Neurosci Res.

62:346-56.

Lance-Jones C (1982). *Motoneuron cell death in the developing lumbar spinal cord of the mouse.* Brain Res. 256:473-9.

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD, Gavriliina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005). *SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN.* Hum Mol Genet. 14:845-57.

Lee YI, Mikesch M, Smith I, Rimer M, 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.* Dev Biol. 356:432-44.

Leenders AG, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE, Verhage M (2001). *Rab3a is involved in transport of synaptic vesicles to the active zone in mouse brain nerve terminals.* Mol Biol Cell. 12:3095-102.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al (1995). *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.* Cell. 80:155-65.

Levine S, Saltzman A (2006). *Lithium increases body weight of rats: relation to thymolysis.* Prog

Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 30:155-8.

Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M, Prevette DM, Oppenheim RW (1998). *Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice.* J Comp Neurol. 396:158-68.

Li Y, Thompson WJ (2011). *Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber.* J Neurosci. 31:13191-203.

Lin CS, Park T, Chen ZP, Leavitt J (1993). *Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells.* J Biol Chem. 268:2781-92.

Ling KK, Lin MY, Zingg B, Feng Z, Ko CP (2010). *Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy.* PLoS One. 5:e15457.

Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, Ko CP (2011). *Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy.* Hum Mol Genet. 21:185-95.

Liu ZH, Chuang DM, Smith CB (2011). *Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome.* Int J Neuropsychopharmacol. 14:618-30.

Lloyd TE, Taylor JP (2010). *Flightless*

flies: Drosophila models of neuromuscular disease. Ann N Y Acad Sci. 1184:e1-20.

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998). *SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity.* Nat Genet. 19:63-6.

Lorson CL, Androphy EJ (2000). *An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN.* Hum Mol Genet. 9:259-65.

Lorson CL, Rindt H, Shababi M (2010). *Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies.* Hum Mol Genet. 19:R111-8.

Lu B, Fu WM, Greengard P, Poo MM (1993). *Calcitonin gene-related peptide potentiates synaptic responses at developing neuromuscular junction.* Nature. 363:76-9.

Lunn JS, Sakowski SA, Hur J, Feldman EL (2011). *Stem cell technology for neurodegenerative diseases.* Ann Neurol. 70:353-61.

Lunn MR, Wang CH (2008). *Spinal muscular atrophy.* Lancet. 371:2120-33.

Lutz CM, Kariya S, Patruni S, Osborne MA, Liu D, Henderson CE, Li DK, Pellizzoni L, Rojas J, Valenzuela DM, Murphy AJ, Winberg ML, Monani UR (2011). *Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy.* J Clin Invest. 121:3029-41.

M

MacLeod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA (1999). *Prenatal onset spinal muscular atrophy*. Eur J Paediatr Neurol. 3:65-72.

Makhortova NR, Hayhurst M, Cerqueira A, Sinor-Anderson AD, Zhao WN, Heiser PW, Arvanites AC, Davidow LS, Waldon ZO, Steen JA, Lam K, Ngo HD, Rubin LL (2011). *A screen for regulators of survival of motor neuron protein levels*. Nat Chem Biol. 7:544-52.

Manji HK, Moore GJ, Chen G (1999). *Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked?* Biol Psychiatry. 46:929-40.

Markowitz JA, Singh P, Darras BT (2012). *Spinal muscular atrophy: a clinical and research update*. Pediatr Neurol. 46:1-12.

Martínez-Hernández R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, Bernal S, Tizzano EF (2009). *The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation*. J Neuropathol Exp Neurol. 68:474-81.

Mattaj IW (1998). *Ribonucleoprotein assembly: clues from spinal muscular atrophy*. Curr Biol. 8:R93-5.

Matteoli M, Haimann C, Torri-Tarelli F, Polak JM, Ceccarelli B, De Camilli P (1988). *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. Proc Natl Acad Sci U S A. 85:7366-70.

Matteoli M, Balbi S, Sala C, Chini B, Cimino M, Vitadello M, Fumagalli G (1990). *Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction*. J Mol Neurosci. 2:175-84.

McClearn D, Medville R, Noden D (1995). *Muscle cell death during the development of head and neck muscles in the chick embryo*. Dev Dyn 202:365-77.

McCue HV, Haynes LP, Burgoyne RD (2010). *The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2:a004085.

McGovern VL, Gavrulina TO, Beattie CE, Burghes AH (2008). *Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse*. Hum Mol Genet. 17:2900-9.

McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003). *Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding*. J Cell Biol. 162:919-31.

Mentis GZ, Blivis D, Liu W, Drobac E, Crowder ME, Kong L, Alvarez FJ, Sumner CJ, O'Donovan MJ (2011). *Early functional impairment of sensory-motor connectivity in a mouse model of spinal muscular atrophy*. Neuron. 69:453-67.

- Mi R, Chen W, Höke A (2007). *Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:4664-9.
- Middleton G, Reid LE, Harmon BV (1994). *Apoptosis in the human thymus in sudden and delayed death*. Pathology. 26:81-9.
- Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE (1999). *The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability*. Hum Mol Genet. 8:2133-43.
- Miyajima H, Miyaso H, Okumura M, Kurisu J, Imaizumi K (2002). *Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing*. J Biol Chem. 277:23271-7.
- Miyamoto M.S.; Miyamoto Y.; Hosokawa T (2004). *Morphological changes of the thymus under stress caused by water immersion and restraint in SAMPI mice*. International Congress Series. 1260:199-202
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000a). *The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 9:333-9.
- Monani UR, Coover DD, Burghes AH (2000b). *Animal models of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 9:2451-7.
- Monani UR (2005). *Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease*. Neuron.48:885-96.
- Moran LB, Graeber MB (2004). *The facial nerve axotomy model*. Brain Res Brain Res Rev. 44:154-78
- Morris GE (2008). *The Cajal body*. Biochim Biophys Acta. 1783:2108-15.
- Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon HB, Ho A, Castillo PE, Liu X, Südhof TC (2010). *Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:6504-9.
- Murray LM, Comley LH, Thomson D, Parkinson N, Talbot K, Gillingwater TH (2008). *Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 17:949-62.
- Murray LM, Lee S, Bäumer D, Parson SH, Talbot K, Gillingwater TH (2010). *Pre-symptomatic development of lower motor neuron connectivity in a mouse model of severe spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 19:420-33.
- Murray LM, Comley LH, Gillingwater TH, Parson SH (2011). *The response of neuromuscular junctions to injury is developmentally regulated*. FASEB J. 25:1306-13.

Mutsaers CA, Wishart TM, Lamont DJ, Riessland M, Schreml J, Comley LH, Murray LM, Parson SH, Lochmüller H, Wirth B, Talbot K, Gillingwater TH (2011). *Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 20:4334-44.

N

Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S (2007). *Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons*. Nat Neurosci. 10:615-22.

Nagwaney S, Harlow ML, Jung JH, Szule JA, Ress D, Xu J, Marshall RM, McMahan UJ (2009). *Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse*. J Comp Neurol. 513:457-68.

New HV, Mudge AW (1986). *Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis*. Nature. 323:809-11.

Nicole S, Desforges B, Millet G, Lesbordes J, Cifuentes-Diaz C, Vertes D, Cao ML, De Backer F, Languille L, Roblot N, Joshi V, Gillis JM, Melki J (2003). *Intact satellite cells lead to remarkable protection against Smn gene defect in differentiated skeletal muscle*. J Cell Biol. 161:571-82.

Nizzardo M, Nardini M, Ronchi D, Salani S, Donadoni C, Fortunato F, Colciago G, Falcone M, Simone C, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Comi GP, Corti S (2011). *Beta-lactam*

antibiotic offers neuroprotection in a spinal muscular atrophy model by multiple mechanisms. Exp Neurol. 229:214-25.

Nölle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tönges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D, Jablonka S, O'ner J, Srivastav RK, Baasner A, Lingor P, Wirth B, Ponimaskin E, Niedenthal R, Grothe C, Claus P (2011). *The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin*. Hum Mol Genet. 20:4865-78.

O

Omrani O, Bonyadi M, Barzgar M (2009). *Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Iranian spinal muscular atrophy patients*. Pediatr Int. 51:193-6.

Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008). *Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy*. Science. 320:524-7.

P

Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000). *Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord*. Hum Mol Genet. 9:47-56.

Park GH, Maeno-Hikichi Y, Awano T, Landmesser LT, Monani UR (2010). *Reduced survival of motor neuron*

(SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene. *J Neurosci.* 30:12005-19.

Parra J, Martínez-Hernández R, Also-Rallo E, Alias L, Barceló MJ, Amenedo M, Medina C, Senosiain R, Calaf J, Baiget M, Bernal S, Tizzano EF (2011). *Ultrasound evaluation of fetal movements in pregnancies at risk for severe spinal muscular atrophy.* *Neuromuscul Disord.* 21:97-101.

Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR, Klinger KW, Shihabuddin LS, Cheng SH (2010). *CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy.* *Clin Invest.* 120:1253-64.

Patton B, Burgess RW (2005). *Synaptogenesis.* In: Mahendra SR, Jacobson M, eds. *Developmental Neurobiology.* New York, NY: Kluwer Academic, 2005: 269-312

Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G (2002). *The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins.* *Curr Opin Cell Biol.* 14:305-12.

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

Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2001). *A functional interaction between the*

survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J Cell Biol.* 152:75-85.

Pernía-Andrade A, Jonas P (2011). *The multiple faces of RIM.* *Neuron.* 69:185-7.

Pizzasegola C, Caron I, Daleno C, Ronchi A, Minoia C, Carri MT, Bendotti C (2009). *Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice.* *Amyotroph Lateral Scler.* 10:221-8.

Phiel CJ, Klein PS (2001). *Molecular targets of lithium action.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41:789-813.

Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ (2004). *Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2.* *Am J Med Genet A.* 130A:307-10.

Prior TW, Krainer AR, Hua Y, Swoboda KJ, Snyder PC, Bridgeman SJ, Burghes AH, Kissel JT (2009). *A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene.* *Am J Hum Genet.* 85:408-13.

Pun S, Sigrist M, Santos AF, Ruegg MA, Sanes JR, Jessell TM, Arber S, Caroni P (2002). *An intrinsic distinction in neuromuscular junction assembly and maintenance in different skeletal muscles.* *Neuron.* 34:357-70.

Q

Quaggin SE, Kreidberg JA (2008). *Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences*. *Development*. 135:609-20.

Quiroz JA, Gould TD, Manji HK (2004). *Molecular effects of lithium*. *Mol Interv*. 4:259-72.

R

Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG (2007). *A Drosophila melanogaster model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle*. *J Cell Biol*. 176:831-41.

Rak K, Lechner BD, Schneider C, Drexler H, Sendtner M, Jablonka S (2009). *Valproic acid blocks excitability in SMA type I mouse motor neurons*. *Neurobiol Dis*. 36:477-87.

Rickman C, Medine CN, Bergmann A, Duncan RR (2007). *Functionally and spatially distinct modes of munc18-syntaxin 1 interaction*. *J Biol Chem*. 282:12097-103.

Riessland M, Ackermann B, Förster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B (2010). *SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*. 19:1492-506.

Rose FF Jr, Mattis VB, Rindt H, Lorson CL (2009). *Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy*. *Hum Mol Genet*. 18:997-1005.

Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ (1987a). *Formation of primary and secondary myotubes in rat lumbrical muscles*. *Development*. 100:383-94.

Ross JJ, Duxson MJ, Harris AJ (1987b). *Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles*. *Development*. 100:395-409.

Rossoll W, Kröning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002). *Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?* *Hum Mol Genet*. 11:93-105.

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003). *Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons*. *J Cell Biol*. 163:801-12.

Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al (1995). *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. *Cell*. 80:167-78.

Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Berardi N, Cattaneo A (2000). *Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy*. *J Neurosci*. 20:2589-601.

Rubin CI, Atweh GF (2004). *The role of stathmin in the regulation of the cell cycle*. J Cell Biochem. 93:242-50.

Rudnik-Schöneborn S, Heller R, Berg C, Betzler C, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Zerres K (2008). *Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy*. J Med Genet. 45:635-8.

Ruiz R, Casañas JJ, Torres-Benito L, Cano R, Tabares L (2010). *Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice*. J Neurosci. 30:849-57.

S

Sala C, Andreose JS, Fumagalli G, Lomo T (1995). *Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions*. J Neurosci. 15:520-8.

Sanes JR, Lichtman JW (2001). *Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus*. Nat Rev Neurosci. 2:791-805.

Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997). *Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:9920-5.

Schlüter OM, Schnell E, Verhage M,

Tzonopoulos T, Nicoll RA, Janz R, Malenka RC, Geppert M, Südhof TC (1999). *Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release*. J Neurosci. 19:5834-46.

Schütz B, Mauer D, Salmon AM, Changeux JP, Zimmer A (2004). *Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice*. J Comp Neurol. 476:32-43.

Seale P, Asakura A, Rudnicki MA (2001). *The potential of muscle stem cells*. Dev Cell. 1:333-42.

Sendtner M (2010). *Therapy development in spinal muscular atrophy*. Nat Neurosci. 13:795-9.

Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G (2007). *Axonal-SMN (a-SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:1959-64.

Shababi M, Habibi J, Ma L, Glascock JJ, Sowers JR, Lorson CL (2012). *Partial restoration of cardio-vascular defects in a rescued severe model of spinal muscular atrophy*. J Mol Cell Cardiol. 52:1074-82.

Shapira M, Zhai RG, Dresbach T, Bresler T, Torres VI, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2003). *Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles*. Neuron. 38:237-52.

Shefer G, Wleklinski-Lee M, Yablonka-Reuveni Z (2004). *Skeletal muscle satellite cells can spontaneously enter*

an alternative mesenchymal pathway. J Cell Sci. 117:5393-404.

Shpargel KB, Praveen K, Rajendra TK, Matera AG (2009). *Gemin3 is an essential gene required for larval motor function and pupation in Drosophila.* Mol Biol Cell. 20:90-101.

Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2004). *An extended inhibitory context causes skipping of exon 7 of SMN2 in spinal muscular atrophy.* Biochem Biophys Res Commun. 315:381-8.

Skofitsch G, Jacobowitz DM (1985). *Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system.* Peptides. 6:721-45.

Sleigh JN, Buckingham SD, Esmaeili B, Viswanathan M, Cuppen E, Westlund BM, Sattelle DB (2011). *A novel Caenorhabditis elegans allele, smn-1(cb131), mimicking a mild form of spinal muscular atrophy, provides a convenient drug screening platform highlighting new and pre-approved compounds.* Hum Mol Genet. 20:245-60.

Sleigh JN, Gillingwater TH, Talbot K (2011). *The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy.* Dis Model Mech. 4:457-67.

Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF (2002). *Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord.* Brain. 125:1624-34.

Spitzer NC, Lautermilch NJ, Smith RD, Gomez TM (2000). *Coding of neuronal differentiation by calcium transients.* Bioessays. 22:811-7.

Spitzer NC (2002). *Activity-dependent neuronal differentiation prior to synapse formation: the functions of calcium transients.* J Physiol Paris. 96:73-80.

St Pierre BA, Tidball JG (1994). *Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension.* J Appl Physiol. 77:290-7.

Südhof TC (1995). *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions.* Nature. 375:645-53.

Südhof TC (2004). *The synaptic vesicle cycle.* Annu Rev Neurosci. 27:509-47.

Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, McNaught TP, Wride MC, Reyna SP, Bromberg MB (2005). *Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function.* Ann Neurol. 57:704-12.

T

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006). *Molecular anatomy of a trafficking organelle.* Cell. 127:831-46.

Takeda K, Hatai T, Hamazaki TS, Nishitoh H, Saitoh M, Ichijo H (2000). *Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells.* J Biol Chem. 275:9805-13.

Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR, Edgerton VR (2002). *New fiber formation in the interstitial spaces of rat skeletal muscle during postnatal*

growth. J Histochem Cytochem. 50:1097-1111.

Tang TT, Zhu ZF, Wang J, Zhang WC, Tu X, Xiao H, Du XL, Xia JH, Dong NG, Su W, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Yao R, Xie JJ, Jevallee H, Wang X, Liao MY, Shi GP, Fu M, Liao YH, Cheng X (2011). *Impaired thymic export and apoptosis contribute to regulatory T-cell defects in patients with chronic heart failure*. PLoS One. 6:e24272.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008). *New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease*. Brain Res Rev. 59:201-20.

Tapia O, Bengoechea R, Palanca A, Arteaga R, Val-Bernal JF, Tizzano EF, Berciano MT, Lafarga M (2012). *Reorganization of Cajal bodies and nucleolar targeting of coilin in motor neurons of type I spinal muscular atrophy*. Histochem Cell Biol. 2012 Feb 1. [Epub ahead of print]

Tarabal O, Calderó J, Ribera J, Sorribas A, López R, Molgó J, Esquerda JE (1996a). *Regulation of motoneuronal calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats*. Eur J Neurosci. 8:829-36.

Tarabal O, Calderó J, Esquerda JE (1996b). *Intramuscular nerve sprouting induced by CNTF is associated with increases in CGRP content in mouse motor nerve terminals*. Neurosci Lett. 15;219:60-4.

Tarcic N, Levitan G, Ben-Yosef D, Prous D, Ovadia H, Weiss DW (1995). *Restraint stress-induced changes in lymphocyte subsets and the expression*

of adhesion molecules. Neuroimmunomodulation. 2:249-57.

Tarcic N, Ovadia H, Weiss DW, Weidenfeld J (1998). *Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids*. J Neuroimmunol. 82:40-6.

Tews DS, Goebel HH (1996). *DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy*. Neuromuscul Disord. 6:265-73.

Tidball JG, Wehling-Henricks M (2007). *Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo*. J Physiol. 578:327-36.

Ting CH, Lin CW, Wen SL, Hsieh-Li HM, Li H (2007). *Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 16:499-514.

Torres-Benito L, Neher MF, Cano R, Ruiz R, Tabares L (2011). *SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals*. PLoS One. 6(10):e26164.

Toth CC, Willis D, Twiss JL, Walsh S, Martinez JA, Liu WQ, Midha R, Zochodne DW (2009). *Locally synthesized calcitonin gene-related Peptide has a critical role in peripheral nerve regeneration*. J Neuropathol Exp Neurol. 68:326-37.

Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Li H (2008). *Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice*. J Mol Med (Berl). 86:1243-54.

Tsunoda I, Libbey JE, Kuang LQ, Terry EJ, Fujinami RS (2005). *Massive apoptosis in lymphoid organs in animal models for primary and secondary progressive multiple sclerosis*. Am J Pathol. 167:1631-46.

U

V

van Bergeijk J, Rydel-Könecke K, Grothe C, Claus P (2007). *The spinal muscular atrophy gene product regulates neurite outgrowth: importance of the C terminus*. FASEB J. 21:1492-502.

Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernández-Chico C (1996). *Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype*. Hum Mol Genet. 1996 Feb;5(2):257-63. Erratum in: Hum Mol Genet. 5:710.

Voigt T, Meyer K, Baum O, Schümperli D (2010). *Ultrastructural changes in diaphragm neuromuscular junctions in a severe mouse model for Spinal Muscular Atrophy and their prevention by bifunctional U7 snRNA correcting SMN2 splicing*. Neuromuscul Disord. 20:744-52.

W

Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H (2005). *Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases*. J Pharmacol Sci. 99:307-21.

Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, Fuentes JL, Pellizzoni L, Matera AG (2008). *SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic*

target of calpain. Hum Mol Genet. 17:3399-410.

Wan L, Ottinger E, Cho S, Dreyfuss G (2008). *Inactivation of the SMN complex by oxidative stress*. Mol Cell. 31:244-54.

Wen HL, Lin YT, Ting CH, Lin-Chao S, Li H, Hsieh-Li HM (2010). *Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 19:1766-78.

Wyllie AH (1980). *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature. 284:555-6.

Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggenbauer B, Fischer U (2005). *Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy*. Genes Dev. 19:2320-30.

Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL (2005). *A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels*. Hum Mol Genet. 14:1199-210.

Wyatt TJ, Keirstead HS (2010). *Stem cell-derived neurotrophic support for the neuromuscular junction in spinal muscular atrophy*. Expert Opin Biol Ther. 10:1587-94.

X

Y

Yamamoto Y, Henderson CE (1999). *Patterns of programmed cell death in populations of developing spinal*

motoneurons in chicken, mouse, and rat. Dev Biol. 214:60-71.

Yao LH, Rao Y, Varga K, Wang CY, Xiao P, Lindau M, Gong LW (2012). *Synaptotagmin 1 is necessary for the Ca²⁺ dependence of clathrin-mediated endocytosis.* J Neurosci. 32:3778-85.

Yi JJ, Ehlers MD (2007). *Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function.* Pharmacol Rev. 59:14-39.

Ymlahi-Ouazzani Q, J Bronchain O, Paillard E, Ballagny C, Chesneau A, Jadaud A, Mazabraud A, Pollet N (2010). *Reduced levels of survival motor neuron protein leads to aberrant motoneuron growth in a Xenopus model of muscular atrophy.* Neurogenetics. 11:27-40.

Yoshioka W, Akagi T, Nishimura N, Shimizu H, Watanabe C, Tohyama C (2009). *Severe toxicity and cyclooxygenase (COX)-2 mRNA increase by lithium in the neonatal mouse kidney.* J Toxicol Sci. 34:519-25.

Young C, Straiko MM, Johnson SA, Creeley C, Olney JW (2008). *Ethanol causes and lithium prevents neuroapoptosis and suppression of pERK in the infant mouse brain.* Neurobiol Dis. 31:355-60.

Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE (2000). *The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding.* Hum Mol Genet. 9:2869-77.

Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL (2002). *A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy.* J Biol Chem. 277:2852-9.

Z

Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC (2001). *Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle.* Neuron. 29:131-43.

Zhai RG, Bellen HJ (2004). *The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal.* Physiology (Bethesda). 19:262-70.

Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003). *Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization.* J Neurosci. 23:6627-37.

Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006). *Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons.* J Neurosci. 26:8622-32.

Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008). *SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing.* Cell. 133:585-600.

Ziv NE, Garner CC (2004). *Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly.* Nat Rev Neurosci. 5:385-99.

Zou J, Barahmand-pour F, Blackburn ML, Matsui Y, Chansky HA, Yang L (2004). *Survival motor neuron (SMN) protein interacts with transcription corepressor mSin3A.* J Biol Chem. 279:14922-8.

XI ANNEX

