



**Universidad de Concepción**  
**Dirección de Postgrado**  
**Facultad de Ciencias Biológicas – Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas**  
**Área Biología Celular y Molecular**

**Estudio del efecto de la activación de la vía de  
señalización Wnt canónica sobre la regeneración de la  
unión neuromuscular**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de  
Concepción para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas Área  
Biología Celular y Molecular

FRANCISCA BERMEDO GARCÍA

JUNIO 2022

CONCEPCIÓN – CHILE

Profesor guía: Juan Pablo Henríquez Hohmann  
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

---

Dr. Juan Pablo Henríquez  
Profesor guía tesis  
Universidad de Concepción

---

Dra. Teresa Caprile  
Profesora evaluadora interna  
Universidad de Concepción



---

Dr. Gonzalo Yévenes  
Profesor evaluador interno  
Universidad de Concepción

---

Dr. Juan Carlos Tapia  
Profesor evaluador externo  
Universidad de Talca

---

Dr. Ariel Castro  
Director Programa Doctorado  
Ciencias Biológicas, área  
Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT Regular 1170614 (2017-2020)

Beca de Doctorado Nacional CONICYT 21161276 (2016-2020)

Beca Gastos Operacionales CONICYT 21161276 (2018-2020)

Beca Pasantía Internacional CONICYT (2019)

Apoyo asistencia eventos nacionales UDEC (2019)

Beca apoyo décimo semestre proyecto EDPG (2020)

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr Juan Pablo Henríquez, por su paciencia, compromiso y entusiasmo, desde que llegué al laboratorio, hace ya bastantes años. Gracias por contribuir en mi formación científica y por su apoyo más allá de las paredes del laboratorio.

A lxs integrantes del laboratorio de Estudios Neuromusculares (Nest Lab), quienes hacen del laboratorio un ambiente tan agradable en el que trabajar y hacer ciencia. A Jessica y Diego, por su amistad y trabajo en equipo. A Angelymar, Esperanza e Ian, que solo sumaron al excelente ambiente del laboratorio. En especial quiero agradecer a Viviana, que ya no forma parte del laboratorio, pero cuya amistad, que formamos haciendo experimentos trascendió. De igual forma agradecer a Cristina y Jorge, que eran parte del laboratorio cuando recién me integré.

A los miembros de mi comisión de tesis, por sus comentarios y contribuciones a este trabajo.

A la Dra Lucía Tabares, por recibirme amablemente en su laboratorio y por su espíritu de colaboración científica con mi trabajo de tesis.

A mis amigxs fuera del laboratorio, amigxs que encontré durante mi formación de pregrado, amigas que encontré durante mi niñez y adolescencia, y a quien llegó al final de este camino y me ayudó a encontrar ese impulso que necesitaba. Gracias por tener siempre palabras de apoyo y ánimo.

Por último, quiero agradecer a las personas que me han formado y me han permitido estar donde estoy hoy, mi mamá, mi segunda mamá y mi papá. No puedo más que decirles que gracias por todo.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	III
TABLA DE CONTENIDOS .....	IV
INDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABLAS .....	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XIV
RESUMEN .....	XV
ABSTRACT .....	XVIII
1. Introducción .....	1
1.1. Unión neuromuscular .....	1
1.2. Formación y maduración de la UNM .....	3
1.2.1. Desarrollo y maduración del terminal nervioso .....	3
1.2.2. Desarrollo y maduración de las tSCs .....	4
1.2.3. Desarrollo y maduración del dominio postsináptico .....	4
1.2.4. Determinantes moleculares de la formación de la UNM .....	6
1.3. Transmisión sináptica en la UNM .....	8
1.4. Daño a la UNM .....	11
1.4.1. Comportamiento del axón motor frente a daño al nervio.....	12
1.4.2. Comportamiento de los dominios postsinápticos frente a daño al nervio.	13

1.4.3.	Comportamiento de las células de Schwann frente a daño al nervio.....	15
1.5.	Alteraciones morfológicas de la UNM en otros contextos biológicos.....	17
1.6.	Recuperación funcional de la UNM luego de daño.....	20
1.7.	Señales moleculares en contextos de daño y regeneración de la UNM.....	21
1.7.1.	Señalización Wnt en la UNM.....	23
1.7.2.	Señalización Wnt en daño a la UNM.....	26
2.	HIPÓTESIS.....	30
	OBJETIVO GENERAL .....	30
3.	MATERIALES .....	32
3.1.	Animales de experimentación .....	32
3.2.	Cepas bacterianas .....	32
3.3.	Plásmidos.....	33
3.4.	Equipos comerciales .....	33
3.5.	Anticuerpos .....	34
3.6.	Reactivos y soluciones en general.....	35
3.7.	Material en general y equipos disponibles .....	36
4.	MÉTODOS.....	38
4.1.	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5α.....	38
4.2.	Purificación de DNA plasmidial por MidiPrep.....	38



4.3. Purificación de plásmidos a gran escala por precipitación con PEG (Maxiprep).....	39
4.4. Electroporación del músculo LAL.....	40
4.5. Daño mecánico al nervio facial .....	41
4.6. Tratamientos farmacológicos .....	42
4.7. Ensayos de doble $\alpha$ -BTX conjugada a fluoróforos .....	43
4.8. Inmunofluorescencia de músculo LAL.....	43
4.9. Análisis de imágenes .....	44
4.9.1. Adquisición de imágenes.....	44
4.9.2. Análisis de la UNM .....	45
4.9.3. Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico. 47	
4.10. Electrofisiología de la UNM del músculo LAL .....	48
4.10.1. Preparación del músculo LAL.....	48
4.10.2. Estimulación presináptica.....	49
4.10.3. Registro de potenciales postsinápticos .....	49
4.10.4. Análisis de registros electrofisiológicos .....	51
4.11. Análisis estadístico .....	53
5. RESULTADOS .....	54
5.1. Identificar los fenotipos morfológicos de los tres componentes celulares y la función a largo plazo durante la regeneración de la UNM del músculo LAL. ....	54

5.1.1. Bateria de anticuerpos para el marcaje de la UNM del músculo LAL de ratón	54
5.1.2. La denervación crónica del músculo LAL gatilla la degeneración de los componentes de la UNM adulta.	56
5.1.3. El número de células de Schwann terminales disminuye durante la denervación crónica del músculo.	63
5.1.4. Las UNMs del músculo LAL mantienen su morfología global luego de su regeneración.	65
5.1.5. La UNM presenta adaptaciones morfológicas luego de la reinervación...	75
5.1.6. Recuperación funcional de la transmisión sináptica neuromuscular después de la reinervación de la placa terminal.	88
5.2. Estudiar el efecto de la activación e inhibición farmacológica de la señalización Wnt canónica sobre la morfología de los tres componentes celulares y la función durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	95
5.2.1. La vía de señalización Wnt canónica se activa con <i>Andrographolide</i>	95
5.2.2. La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM retrasa la reinervación sin alterar su morfología.	96
5.2.3. La activación de la vía Wnt canónica provoca defectos en la recuperación funcional de la UNM luego de daño al nervio	111
5.2.4. Un aumento en la dosis de <i>Andrographolide</i> resulta en alteraciones en el axón motor regenerado	113



reinervación de los dominios postsinápticos se retrasa, lo que correlaciona con una disminución de parámetros funcionales de transmisión sináptica. ....	127
5.2.5. El bloqueo de la secreción de ligandos Wnt mejora algunos parámetros de la transmisión sináptica de la UNM luego de daño al nervio .....	127
5.2.6. La inhibición de la vía Wnt canónica mejora la recuperación funcional de la UNM luego de daño al nervio .....	133
6. DISCUSIÓN.....	143
6.1. Morfología de los dominios postsinápticos frente a daño degenerativo y regenerativo .....	144
6.5. Efectos de la activación de la vía Wnt canónica en la reinervación de la UNM	157
6.6. Efectos de la activación de la vía Wnt canónica en el dominio postsináptico	161
6.8. Efectos de la vía de señalización Wnt sobre la recuperación funcional de la UNM	163
6.8.1. Efectos de la inhibición de la vía de señalización Wnt sobre la recuperación funcional de la UNM .....	166
7. CONCLUSIONES .....	168
8. ANEXOS.....	170
9. BIBLIOGRAFÍA.....	171



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema de la estructura de la sinapsis neuromuscular	10
<b>Figura 2</b>	Esquema de la regeneración morfológica de la sinapsis neuromuscular	19
<b>Figura 3</b>	Esquema de la vía de señalización Wnt canónica	25
<b>Figura 4</b>	Los anticuerpos SV2 y 2H3 resultan en un marcaje eficiente del axón y terminal motor de la UNM	58
<b>Figura 5</b>	El músculo LAL se atrofia luego de un mes de denervación crónica	60
<b>Figura 6</b>	Los componentes celulares de la UNM se degeneran a distintos tiempos después de denervación crónica	62
<b>Figura 7</b>	La denervación crónica resulta en la aparición de agregados ectópicos del AChR en las fibras musculares	63
<b>Figura 8</b>	La UNM disminuye su tamaño como resultado de la denervación crónica	65
<b>Figura 9</b>	Las células de Schwann terminales no se mantienen en UNMs denervadas por largos períodos de tiempo	67
<b>Figura 10</b>	La UNM recupera su morfología global luego de daño por aplastamiento al nervio	69
<b>Figura 11</b>	Algunos parámetros del terminal nervioso se mantienen alterados a tiempos prolongados luego de la reinervación	70
<b>Figura 12</b>	La denervación transitoria de la UNM no resulta en cambios morfológicos de las tSC	71
<b>Figura 13</b>	Los parámetros morfológicos del dominio postsináptico no se recuperan inmediatamente luego de la reinervación	73
<b>Figura 14</b>	Los agregados del AChR ectópicos desaparecen cuando ocurre la reinervación de los dominios postsinápticos	75
<b>Figura 15</b>	En el músculo LAL la reinervación comienza una semana luego del aplastamiento del nervio	77

<b>Figura 16</b>	La estabilidad de los AChR decae progresivamente y de forma inmediata luego de la resección del nervio	79
<b>Figura 17</b>	La estabilidad de los AChR no se recupera de forma inmediata con la reinervación de los dominios postsinápticos	80
<b>Figura 18</b>	Los dominios postsinápticos denervados crónicamente exhiben una fragmentación borrosa	82
<b>Figura 19</b>	A tiempos prolongados luego de la reinervación los dominios postsinápticos tienen morfologías fragmentadas definidas	84
<b>Figura 20</b>	Las estructuras postsinápticas fragmentadas definidas son estructuras estables y las estructuras postsinápticas fragmentadas borrosas son estructuras inestables	85
<b>Figura 21</b>	El análisis de las UNMs mediante proyecciones 3D permite detectar el número de axones motores que inervan un dominio postsináptico	88
<b>Figura 22</b>	La poli-inervación se mantiene luego de la reinervación de la UNM en el músculo LAL	90
<b>Figura 23</b>	No existen cambios significativos en los parámetros de los mEPP luego de la reinervación de la UNM en el músculo LAL	93
<b>Figura 24</b>	La transmisión sináptica de la UNM no se recupera de forma inmediata con la reinervación de los dominios postsinápticos	94
<b>Figura 25</b>	ANDRO activa la vía Wnt canónica, medido por el reportero TCF/Lef:H2B-GFP	98
<b>Figura 26</b>	La morfología global de la UNM no exhibe cambios con la activación de la vía Wnt canónica durante su regeneración	101
<b>Figura 27</b>	La activación de la vía Wnt canónica retrasa los primeros contactos entre los axones regenerados y los dominios postsinápticos	104

<b>Figura 28</b>	La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM no gatilla en cambios morfológicos de las tSC	106
<b>Figura 29</b>	No existen cambios en los parámetros morfológicos del dominio postsináptico al activar la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	108
<b>Figura 30</b>	La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM no gatilla cambios en la fragmentación de los dominios postsinápticos	110
<b>Figura 31</b>	La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios con la activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	113
<b>Figura 32</b>	La activación de la vía Wnt canónica resulta en defectos en la recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL	115
<b>Figura 33</b>	La morfología global de la UNM no exhibe cambios al utilizar una dosis de ANDRO de 5 mg/kg durante la regeneración de la UNM	117
<b>Figura 34</b>	No existen cambios en los parámetros morfológicos del dominio postsináptico al utilizar una concentración de ANDRO de 5 mg/kg durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	120
<b>Figura 35</b>	El tratamiento con una concentración de ANDRO de 5 mg/kg no gatilla cambios en la fragmentación de los dominios postsinápticos durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	122
<b>Figura 36</b>	La activación de la vía Wnt canónica, usando concentraciones de ANDRO de 5mg/kg, también retrasa los primeros contactos entre los axones regenerados y los dominios postsinápticos	125

<b>Figura 37</b>	La activación de la vía Wnt canónica resulta en una disminución del diámetro axonal durante la regeneración de la UNM	127
<b>Figura 38</b>	Las drogas IWP2 y XAV-939 inhiben la vía de señalización Wnt a través de mecanismos distintos	129
<b>Figura 39</b>	La morfología global de la UNM no exhibe cambios al inhibir la secreción de ligandos Wnt durante su regeneración	131
<b>Figura 40</b>	La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios al inhibir secreción de ligandos Wnt durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	133
<b>Figura 41</b>	La inhibición de la secreción de ligandos Wnt resulta en mejoras en la recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL	135
<b>Figura 42</b>	La morfología global de la UNM no exhibe cambios al inhibir la vía Wnt canónica durante su regeneración	138
<b>Figura 43</b>	La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios al inhibir la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL	140
<b>Figura 44</b>	La inhibición de la vía Wnt canónica resulta en una mejor recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL	142
<b>Figura 45</b>	Adaptación morfológica de la UNM tras un daño degenerativo y regenerativo	146
<b>Figura 46</b>	La vía Wnt canónica regula negativamente la regeneración de la UNM	166

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Ligandos Wnt y sus distintos efectos en la agregación de los AChR sobre la membrana de miotubos en cultivo	28
<b>Tabla 2</b>	Anticuerpos primarios utilizados	35
<b>Tabla 3</b>	Anticuerpos secundarios utilizados	36



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Las adaptaciones morfológicas de la UNM regenerada se generan en todo el músculo LAL	171
----------------	--	-----



## RESUMEN

La unión neuromuscular (UNM) es una sinapsis periférica compuesta por un terminal nervioso, una especialización de la fibra muscular y células de Schwann terminales. Aun cuando la UNM puede sufrir daño a causa de patologías o lesiones a los nervios periféricos, esta sinapsis posee mayores capacidades regenerativas que las sinapsis centrales. En modelos murinos, luego de daño mecánico por aplastamiento del nervio, la reinervación de los dominios postsinápticos conduce a una recuperación funcional exitosa, mientras que, en humanos, el daño a nervios periféricos frecuentemente resulta en una recuperación funcional ineficiente. La caracterización del nicho regenerativo de la UNM denervada, así como de las proteínas y vías de señalización que participan de la mantención de este nicho, es fundamental para explicar y potencialmente intervenir con el objetivo de lograr mejores resultados en la recuperación funcional de la UNM. Una de las vías de señalización que participa durante el desarrollo y maduración de la UNM, y que se activa en los músculos denervados luego de daño al nervio, es la vía de señalización Wnt canónica. Sin embargo, se desconoce cuál es la consecuencia morfológica y funcional de la activación de la vía de señalización Wnt durante la regeneración de la UNM. A partir de resultados previos que indican que la activación de la vía Wnt canónica resulta en una desorganización de las sinapsis neuromusculares, la hipótesis de este trabajo de tesis es que *la regeneración funcional de la sinapsis neuromuscular depende de adaptaciones morfológicas perdurables y es regulada negativamente por la activación de la vía de señalización Wnt canónica*. Para probar esta hipótesis, el objetivo general de este estudio fue estudiar el comportamiento morfológico y funcional a largo plazo en la regeneración de la UNM y el efecto de la



activación de la vía de señalización Wnt canónica en el proceso, considerando dos objetivos específicos: *i)* identificar los fenotipos morfológicos de los tres componentes celulares y la función a largo plazo durante la regeneración de la UNM del *levator auris longus* (LAL); y *ii)* estudiar el efecto de la activación e inhibición farmacológica de la señalización Wnt canónica sobre la morfología de los tres componentes celulares y la función durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.

Para caracterizar la regeneración de la UNM, hemos realizado un estudio comparativo detallado de las consecuencias a corto y largo plazo de la denervación irreversible (crónica) y reversible (parcial) de la UNM en el músculo craneal LAL de ratón. Nuestros hallazgos revelan la existencia de alteraciones morfológicas en las UNMs regeneradas que persisten aun después de largos periodos de tiempo luego de la reinervación y recuperación de la transmisión sináptica. Además, combinando análisis morfométricos y de estabilidad postsináptica, pudimos discriminar dos formas distintas de fragmentación de la UNM, una estable-definida y una inestable-borrosa, que se correlacionan con su potencial de regeneración. Por otra parte, determinamos que la activación de la vía de señalización Wnt canónica retrasa la reinervación de los dominios postsinápticos y que las UNMs reinervadas muestran defectos en la transmisión sináptica. Aun cuando la inhibición de la secreción de los ligandos Wnt no resulta en mejoras significativas importantes sobre la regeneración de la UNM, la inhibición específica de la vía Wnt canónica tiene positivos sobre la recuperación de la transmisión sináptica durante la regeneración de la UNM. En conjunto, nuestros datos muestran que existen cambios permanentes en la

morfología de la UNM luego de su regeneración y que, en lugar de ser predictivos del declive de la UNM, estas adaptaciones morfológicas pueden representar una respuesta adaptativa eficiente para una adecuada recuperación funcional. De forma interesante, la vía Wnt canónica tiene efectos negativos sobre la regeneración de la UNM luego de daño al nervio, mientras su inhibición juega un efecto benéfico sobre la regeneración de esta sinapsis. Las adaptaciones morfológicas y el efecto de la vía Wnt sobre la UNM son relevantes para estudios futuros que desarrollen estrategias destinadas a restaurar la función motora luego de daño a los nervios periféricos.



## ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is a peripheral synapse composed of a nerve terminal, a specialisation of the muscle fibre and terminal Schwann cells. Although the NMJ can be damaged by pathology or injury to peripheral nerves, this synapse has greater regenerative capacities than central synapses. In murine models, following mechanical damage by nerve crush, reinnervation of the postsynaptic domains leads to successful functional recovery, whereas, in humans, damage to peripheral nerves often results in inefficient functional recovery. Characterisation of the regenerative niche of the denervated NMJ, as well as the identification of the proteins and signalling pathways involved in maintaining this niche, is critical to explain and potentially intervene to achieve better outcomes in NMJ functional recovery. One of the signalling pathways involved during NMJ development and maturation, which is activated in denervated muscles following nerve damage, is the canonical Wnt signalling pathway. However, the morphological and functional consequence of Wnt signalling pathway activation during NMJ regeneration is unknown. Based on previous results indicating that activation of the canonical Wnt pathway results in disorganization of neuromuscular synapses, the hypothesis of this thesis work is that *functional regeneration of the neuromuscular synapse relies on long-lasting morphological adaptations and is negatively regulated by activation of the canonical Wnt signalling pathway*. To test this hypothesis, the overall aim of this study was to study the long-term morphological and functional behaviour in NMJ regeneration and the effect of the canonical Wnt signalling pathway activation on the process, considering two specific objectives: *i)* to identify the morphological phenotypes of the three cellular components and long-term function during the NMJ

regeneration of the *levator auris longus* (LAL) muscle; and *ii*) to study the effect of pharmacological activation and inhibition of canonical Wnt signalling on the morphology of the three cellular components and NMJ function during regeneration.

To characterise NMJ regeneration, we have performed a detailed comparative study of the short- and long-term consequences of irreversible (chronic) and reversible (partial) NMJ denervation in mouse cranial LAL muscle. Our findings reveal the existence of morphological alterations in regenerated NMJs that persist even after long periods of time following reinnervation and recovery of synaptic transmission. Furthermore, by combining morphometric and postsynaptic stability analyses, we were able to discriminate two distinct forms of NMJ fragmentation, stable-defined and unstable-blurred, which correlate with their regeneration potential. Moreover, we determined that activation of the canonical Wnt signalling pathway delays reinnervation of postsynaptic domains and that reinnervated NMJs show defects in synaptic transmission. While inhibition of Wnt ligand secretion does not result in significant improvements in NMJ regeneration, specific inhibition of the canonical Wnt pathway has positive effects on the recovery of synaptic transmission during NMJ regeneration. Taken together, our data show the existence of permanent changes in NMJ morphology following NMJ regeneration and that, rather than being predictive of NMJ decline, these morphological alterations may represent an efficient adaptive response for adequate functional recovery. Interestingly, the canonical Wnt pathway has negative effects on NMJ regeneration after nerve damage, while its inhibition exerts positive effects on synaptic recovery. The morphological adaptations and the effect of the Wnt pathway on the NMJ are relevant for future

studies to develop strategies aimed at restoring motor function after peripheral nerve damage.



## 1. Introducción

El contacto entre neuronas motoras y músculos en la sinapsis neuromuscular es fundamental para el movimiento coordinado de los organismos vertebrados. Por otra parte, la unión neuromuscular (UNM) ha sido un modelo arquetípico para el estudio de las sinapsis, dada su relativa simplicidad, fácil acceso y mayor tamaño respecto a las sinapsis del sistema nervioso central (SNC) (Sanes y Lichtman, 2001; Zelada y cols., 2021). El entendimiento de los mecanismos que controlan la mantención de la UNM frente al daño es relevante para el tratamiento de patologías o lesiones que afectan a esta sinapsis. Aun cuando se han descrito moléculas claves para la formación de la UNM, los mecanismos y vías de señalización que subyacen a los procesos de regeneración de esta sinapsis se desconocen.



### 1.1. Unión neuromuscular

En vertebrados, la UNM es una sinapsis periférica de tipo colinérgica, formada por el terminal presináptico de una neurona motora, la especialización postsináptica de una fibra muscular esquelética y células de Schwann terminales (tSC) que cubren al terminal nervioso.

El terminal nervioso de la neurona motora se caracteriza por presentar abundantes mitocondrias en su mitad más cercana a las tSC, mientras que en su porción más cercana a la fibra muscular presenta numerosas vesículas sinápticas que contienen al neurotransmisor Acetilcolina (Sandrock y cols., 1997) y factores tróficos (Sanes y Lichtman, 1999). En la membrana presináptica se encuentran las

zonas activas, regiones que presentan alta densidad de vesículas sinápticas estrechamente asociadas a la membrana, por donde se libera su contenido en respuesta a un potencial de acción de la neurona motora (Slater, 2015). Por otra parte, la membrana postsináptica está especializada para la respuesta rápida a la liberación de neurotransmisor, pues contiene altas densidades de agregados del receptor de acetilcolina (AChR), así como otras proteínas postsinápticas, en contraste con la baja densidad de estas proteínas en zonas extrasinápticas de la fibra muscular (Sanes y Lichtman, 2001; Tintignac y cols., 2015). La membrana postsináptica se estructura en una hendidura sináptica primaria, desde la que se originan pliegues secundarios que forman invaginaciones de cerca de 1  $\mu\text{m}$  de profundidad, directamente opuestas a las zonas activas del terminal presináptico. En los bordes superiores de las crestas de las invaginaciones se encuentran los AChRs, mientras que en las zonas más profundas de los pliegues existe una alta densidad de canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Nav}1.4$ ) (Tintignac y cols., 2015; York y Zheng, 2017). Las células de Schwann terminales o perisinápticas corresponden a las células gliales de la UNM. Según el tamaño de la placa motora, el número de tSCs varía de 3 a 5 en UNMs maduras de mamíferos y anfibios. Las tSCs son no mielínicas y cubren a los terminales axónicos motores, a diferencia de las células de Schwann mielínicas (mSC) que rodean al axón (Figura 1). Se ha descrito que las células de Schwann participan en procesos de formación, mantención y reinervación de la sinapsis neuromuscular (Auld y Robitaille, 2003).

## **1.2. Formación y maduración de la UNM**

### **1.2.1. Desarrollo y maduración del terminal nervioso**

Durante el desarrollo embrionario, las neuronas motoras se originan en la porción ventral del tubo neural desde progenitores multipotenciales y comienzan su diferenciación desde el estadio E11 en roedores (Chen y cols., 2017). Los axones motores migran por las raíces ventrales o por los nervios craneales (músculos faciales) hacia los músculos blanco, formando los primeros contactos sinápticos alrededor de los estadios E12 a E13 en roedores (Darabid y cols., 2014; Bloch-Gallego, 2015). En mamíferos, los primeros contactos entre los axones motores y fibras musculares corresponden a sinapsis poli-inervadas; de hecho, en estudios en los que se utilizó microscopía electrónica de cortes seriados y luego se reconstruyeron tridimensionalmente las UNMs, se observaron dominios postsinápticos poli-inervados por hasta 11 axones motores (Tapia y cols., 2012). Durante las primeras dos semanas postnatales, la mayoría de las ramas axonales motoras se retraen para dar origen a sinapsis mono-inervadas, a través de mecanismos en que participan las tSC censando la actividad sináptica de cada terminal motor (Balice-Gordon y Lichtman, 1993). En las sinapsis recién formadas, la transmisión sináptica no es lo suficientemente eficiente como para producir una contracción muscular controlada, el terminal nervioso contiene pocas vesículas sinápticas y no se reconocen zonas activas (Sanes y Lichtman, 1999; Darabid y cols., 2014). Así, el proceso de maduración presináptica implica que las vesículas se agrupan en el terminal sináptico y cerca de la membrana presináptica forman las



zonas activas, lo que se traduce en una transmisión sináptica eficiente (Tintignac y cols., 2015).

### **1.2.2. Desarrollo y maduración de las tSCs**

Las células de Schwann se originan a partir de células precursoras de la cresta neural, que en estadios embrionarios E13,5-E15,5 (en ratón) dan origen a SC inmaduras, que persisten hasta el nacimiento (Sugiura y Lin, 2011). Durante el desarrollo postnatal, estas células se diferencian a células de Schwann mielínicas (mSC), que forman las vainas de mielina que envuelven a axones gruesos, y no mielínicas, divididas en células de Remak, asociadas a axones delgados, y las tSC, asociadas a las UNMs (Fuertes-Alvarez y Izeta, 2021). Las tSC migran a lo largo de los axones motores y están presentes desde los primeros contactos entre el axón motor y la fibra muscular, mientras en el desarrollo postnatal temprano proliferan y aumentan en número por cada UNM (Sugiura y Lin, 2011).

### **1.2.3. Desarrollo y maduración del dominio postsináptico**

Las fibras musculares provienen desde células del mesodermo que adquieren un compromiso miogénico y migran a los sitios donde se formarán los músculos. En estos sitios, dichos precursores se dividen y se diferencian a mioblastos, los que se alinean y fusionan para formar miotubos en estadio embrionario E11,5 en ratón. La maduración de las fibras musculares se caracteriza por la migración de los

mionúcleos hacia la periferia y la organización del citoesqueleto en sarcómeros (Sanes y Lichtman, 1999). En la región sináptica de las fibras musculares, previo al arribo del axón motor se observan agregados del AChR aneurales que corresponden a pequeñas acumulaciones del receptor que forman un “pre-patrón” de agregación postsináptica (Marques y cols., 2000; Yang y cols., 2001). Luego, los agregados del “pre-patrón” que son inervados por los axones motores se estabilizan para formar UNMs maduras, mientras que aquellos que no son inervados desaparecen luego del arribo del axón motor (Flanagan-Steet y cols., 2005). La formación de dominios postsinápticos se completa con la agregación de AChRs y otras proteínas postsinápticas inducida por señales moleculares secretadas por el axón motor (Flanagan-Steet y cols., 2005).

Durante la maduración de la UNM, los agregados del AChR cambian su morfología. Inicialmente los agregados del AChR presentan una morfología ovalada con densidad uniforme denominada “placa” y se encuentran poli-inervados (Balice-Gordon y Lichtman, 1993). En estadíos postnatales tempranos, la remoción de componentes de la especialización postsináptica en regiones circunscritas del dominio postsináptico da origen a formas complejas denominadas “pretzel”, que presentan zonas con baja y alta densidad del AChR (Marques y cols., 2000; Bolliger y cols., 2010). Posteriormente, durante el envejecimiento se ha descrito la fragmentación de las morfologías tipo pretzel (Valdez y cols., 2012) (ver más adelante, sección 1.1.2).

#### 1.2.4. Determinantes moleculares de la formación de la UNM

La alta densidad de AChR en las zonas sinápticas y la pérdida de estos en las zonas extrasinápticas de la fibra muscular requiere de señales positivas y negativas para la agregación de estos receptores (Ferraro y cols., 2012). El aumento de la densidad de AChRs no solo depende del incremento en la expresión de los genes que codifican para las subunidades del receptor, sino también del tráfico de AChR a la membrana, así como del anclaje y estabilidad de dichos receptores de superficie (Li y cols., 2018). A nivel molecular, la señal mejor descrita que regula positivamente la agregación del AChR es agrina, un proteoglicán de heparán sulfato liberado por el terminal nervioso, que se une en la fibra muscular al correceptor LRP4, promoviendo su dimerización para formar un complejo tetramérico agrina-LRP4 (Li y cols., 2018). Este complejo promueve la activación del receptor tirosina quinasa específico del músculo (MuSK) en la membrana postsináptica por medio de la transfosforilación de MuSK (DeChiara y cols., 1996; Li y cols., 2018). Corriente abajo, la dimerización de la proteína citoplasmática Dok-7 facilita la transfosforilación de MuSK (Inoue y cols., 2009; Li y cols., 2018) (Figura 1). Otras proteínas, como Crk y CrkL también participan de la regulación de la activación de MuSK a través de su interacción con LRP4 (Ferraro y cols., 2012; Li y cols., 2018). La activación de MuSK recluta a la proteína de andamiaje rapsina, la que forma una red subcelular que ancla a los AChR para inducir su agregación en la membrana postsináptica (Gautam y cols., 1996; Zuber y Unwin, 2013) (Figura 1).

La alta densidad de AChRs en las zonas sinápticas también está mediada por el control de la expresión génica, específicamente en los núcleos subsinápticos

musculares, localizados en aposición al terminal motor (Ferraro y cols., 2012). Se ha descrito que la expresión presináptica de neurregulina, que actúa a través sus receptores musculares de la familia ErbB, es importante para estimular la expresión del AChR (Sandrock y cols., 1997; Sanes y Lichtman, 2001). Así mismo, la vía de señalización Agrina/LRP4/MuSK/Dok-7 regula la transcripción de genes en las zonas sinápticas a través de vías independientes de neurregulina (Lacazette y cols., 2003).

Es importante señalar que además de señales inductivas, la correcta formación de la sinapsis neuromuscular requiere de señales negativas para la agregación del AChR que, por ejemplo, disminuyan la concentración del receptor en regiones extrasinápticas de la fibra muscular o que permitan la maduración postsináptica de placas a pretzels (Ferraro y cols., 2012). En este contexto, se ha descrito que la despolarización de la fibra muscular inducida por el neurotransmisor ACh corresponde a una señal negativa para la agregación de los AChR. Por una parte, la despolarización provoca el aumento de calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) que activa cascadas de transducción mediadas por PKC (proteína quinasa C) y CaMKII ( $Ca^{2+}$ /calmodulina proteína quinasa II) que conducen a una reducción en la expresión del AChR (Ferraro y cols., 2012). Por otra parte, ACh estimula a la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), que dispersa a los agregados del AChR inducidos por agrina (Lin y cols., 2005). Otra señal que afecta negativamente a la agregación del AChR de manera independiente de la despolarización de la fibra muscular, corresponde a Eflexina 1, proteína que desestabiliza a los agregados del AChR a través de la activación de RhoA (Shi y cols., 2012). Para la maduración de

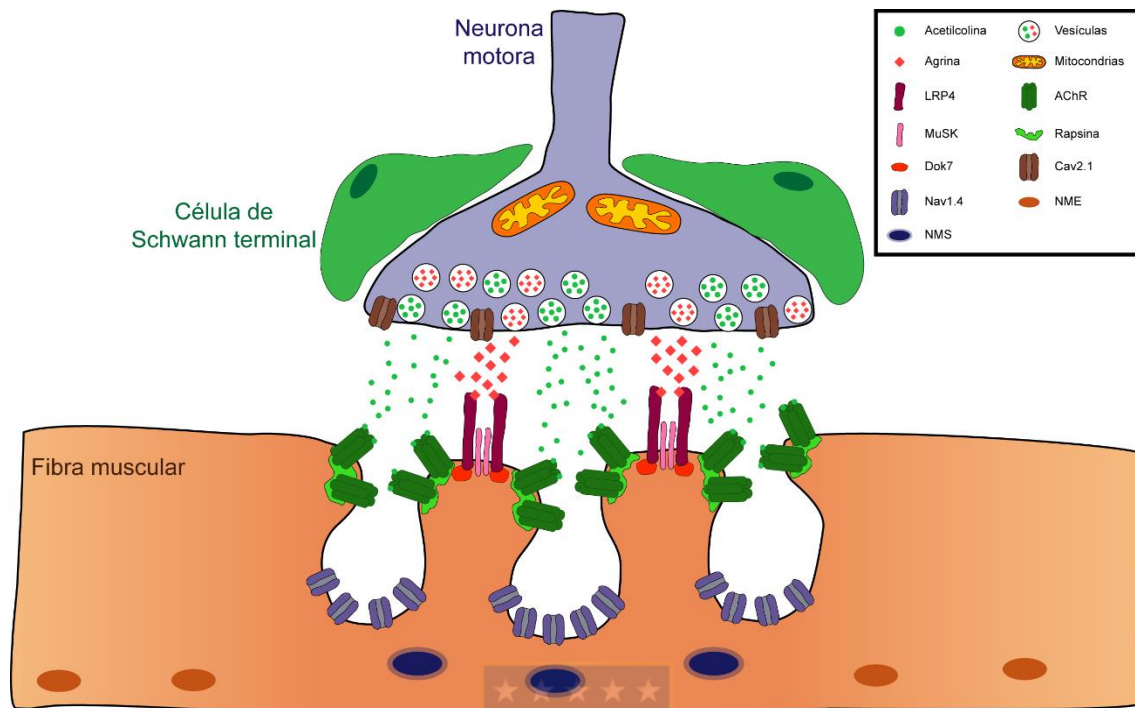
la UNM, se ha descrito la formación de estructuras tipo podosomas que participan en el remodelamiento de los dominios postsinápticos para dar origen a las zonas de baja densidad del AChR de las morfologías postsinápticas tipo pretzel (Shi y cols., 2012). Así, la correcta localización y maduración del dominio postsináptico de la UNM depende tanto de señales positivas para la agregación de los AChR, como también de señales negativas que induzcan la desagregación del receptor en regiones extrasinápticas y en dominios discretos del dominio postsináptico maduro (Ferraro y cols., 2012; Li y cols., 2018).

### **1.3. Transmisión sináptica en la UNM**

La correcta formación y maduración de la UNM permite la eficiente transmisión sináptica para lograr el movimiento de los organismos vertebrados. La transmisión sináptica nace desde un estímulo presináptico (potencial de acción de la neurona motora), el que se propaga y genera la despolarización del terminal nervioso, lo que a su vez provoca la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$  en mamíferos,  $Ca_v2.2$  en ranas) en la membrana del terminal presináptico. La apertura de los  $Ca_v2.1$  permite la entrada de  $Ca^{2+}$  y el consiguiente aumento local del  $[Ca^{2+}]_i$ , el que se une y activa a complejos de proteínas que median la exocitosis de las vesículas sinápticas, tales como las proteínas del complejo SNARE y sinaptotagmina, que exhiben dominios de unión a  $Ca^{2+}$  fundamentales para facilitar la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica lo que, en último término, lleva a la liberación de ACh al espacio sináptico (Slater, 2008). Al conjunto

de moléculas de ACh liberadas por una vesícula se denomina “cuanta”, mientras al grupo de cuantas liberadas desde el terminal nervioso como resultado del potencial de acción se denomina contenido cuantal (QC). Es importante mencionar que existe exocitosis de vesículas sinápticas en el terminal nervioso en ausencia de un potencial de acción, liberaciones que inducen potenciales de placa en miniatura (mEPP) a una frecuencia de alrededor de 1 Hz (Slater, 2015).

La ACh liberada al espacio sináptico se une a los AChR nicotínicos del terminal postsináptico, causando la apertura de estos canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . La apertura de los AChRs permite un flujo neto de iones positivos hacia el interior del terminal nervioso, lo que resulta en una despolarización transitoria de la membrana postsináptica, llamado potencial de placa evocado (EPP). La amplitud de la despolarización de la placa terminal es proporcional a la cantidad de neurotransmisor liberado y al número de AChRs. El EPP generado en condiciones normales es suficiente para superar el umbral del potencial de acción muscular y provocar la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje ( $\text{Nav}1.4$ ). Así, la apertura de los  $\text{Nav}1.4$ s genera el potencial de acción muscular, que gatilla la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Cav}_s$ ) localizados en el retículo sarcoplásmico a lo largo de toda la fibra muscular, lo que desencadena los eventos que culminan con la contracción muscular (Slater, 2008; Slater, 2015) (Figura 1).



**Figura 1: Esquema de la estructura de la sinapsis neuromuscular.**

El terminal nervioso de la neurona motora secreta agrina y el neurotransmisor acetilcolina. Agrina forma el complejo LRP4-MuSK-Dok7 conduciendo a la agregación de los AChRs en los bordes de los pliegues secundarios de la región sináptica de la fibra muscular mediante la agregación y estabilización del AChR junto a la proteína rapsina, y también la expresión de proteínas sinápticas en los núcleos musculares subsinápticos (NMS). Acetilcolina se une a sus receptores (AChR) gatillando el potencial de acción de la placa motora que luego permite la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Nav1.4s que se encuentran ubicados en las profundidades de los pliegues secundarios). En una UNM madura en condiciones fisiológicas, los núcleos musculares extrasinápticos (NME) no expresan proteínas sinápticas.

#### 1.4. Daño a la UNM

La UNM puede sufrir denervación por patologías o daño traumático tanto de la médula espinal como de los nervios periféricos. En este contexto, se ha descrito que la sinapsis neuromuscular posee mayores capacidades regenerativas en comparación con las sinapsis centrales (Hoke, 2006); sin embargo, esta capacidad depende en gran medida del establecimiento de nichos celulares y moleculares permisivos para la regeneración de la UNM y el tiempo entre la denervación y reinervación del músculo (Zelada y cols., 2021). Así, *una comprensión profunda de las respuestas celulares que permiten la recuperación adecuada de la función sináptica es fundamental para desarrollar estrategias que permitan prevenir la degeneración de la sinapsis neuromuscular durante el período de denervación.*

Los tipos de daños a los nervios periféricos han sido clasificados de acuerdo con la extensión del daño al axón y al tejido conectivo del nervio: el daño directo al axón con desmielinización focal, pero manteniendo la continuidad del tejido conectivo del nervio corresponde a *axonotmesis*, mientras que la resección completa de nervio y tejido conectivo corresponde a *neurotmesis* (Menorca y cols., 2013). Los mecanismos que subyacen a la mantención de la UNM han sido estudiados en modelos de daño traumático que simulan la *axonotmesis* o *neurotmesis* de los nervios periféricos, por medio del aplastamiento o la resección de un segmento del nervio, respectivamente (Sakuma y cols., 2016). Los distintos modelos experimentales de daño al axón motor resultan en distintos niveles de recuperación de la inervación de la UNM, así como del comportamiento de los componentes celulares de esta sinapsis.



### 1.4.1. Comportamiento del axón motor frente a daño al nervio

Según el tipo de daño que se realice al nervio, las consecuencias morfológicas serán distintas. El daño mediante el aplastamiento del nervio resulta en la reinervación de la UNM, mientras que la resección de un segmento del nervio genera un modelo de denervación crónica de la UNM (Magill y cols., 2007; Sakuma y cols., 2016; Zhao y cols., 2017). Cuando el axón motor es dañado, el segmento entre el sitio del daño y el soma de la neurona motora se define como axón proximal, por otra parte, el segmento remanente entre el sitio de daño y el terminal nervioso se define como segmento distal (Duraikannu y cols., 2019). Dado que en el sitio de daño el medio intracelular toma contacto con el medio extracelular, se produce un aumento de  $[Ca^{2+}]_i$ , en el extremo proximal del axón motor, lo que promueve la fusión de vesículas en el extremo dañado, las que se acumulan en el extremo abierto del axón generando un “tapón vesicular” que sella al axón (Bloom y Morgan, 2011). Posteriormente, se forma un cono de crecimiento que permite la extensión del axón hacia los músculos denervados (Duraikannu y cols., 2019; Zelada y cols., 2021).

Para la regeneración axonal, es necesario que el axón distal (los remanentes axonales) sea removido mediante un proceso llamado degeneración Walleriana, que corresponde al proceso de fragmentación y destrucción del axón distal mediado por mSCs y macrófagos (Rotshenker, 2011). Experimentos de aplastamiento del nervio ciático y análisis de la UNM del músculo *tibialis anterior* mostraron que el aparato presináptico exhibe degeneración Walleriana una semana posterior al daño, lo que resulta en que el 100% de los aparatos postsinápticos se encuentran

denervados. Desde 2 semanas posteriores al daño, se observan los primeros indicios de reinervación de los agregados del AChR, lo que culmina en reinervación entre 3 a 4 semanas luego del daño. En esta etapa, se observa poli-inervación de los dominios postsinápticos, la que restablece una relación 1:1 entre axón motor y placa motora a las 6 semanas posteriores al daño al nervio. De forma interesante, la mono-inervación resulta en la recuperación de los valores de funcionalidad motora a nivel de los controles, estimados según el índice de funcionalidad del nervio ciático (SFI), que considera la distribución del peso, el largo de la zancada y la apertura de los dígitos al caminar (Magill y cols., 2007) (Figura 2). Lo contrario se observó en experimentos de denervación por resección de un segmento de 5 mm del nervio tibial, que inerva el músculo *gastrocnemius* lateral. En este modelo, no existe reinervación ni presencia de marcadores para neuronas motoras en el músculo después de 4 semanas del daño al nervio (Zhao y cols., 2017).

#### **1.4.2. Comportamiento de los dominios postsinápticos frente a daño al nervio**

Aun cuando los dominios postsinápticos mantienen su morfología gruesa luego de la denervación (Magill y cols., 2007; Guzzini y cols., 2008; Sakuma y cols., 2016), se ha demostrado la pérdida y ganancia de regiones de alta densidad de los AChRs en los dominios postsinápticos, efecto que aumenta con tiempos de denervación más prolongados (Kang y cols., 2014). Más aun, al analizar la estabilidad de los AChR en la membrana postsináptica, se observó que, a tiempos cortos luego de la

resección de un segmento del nervio, la vida media de los AChR en la membrana es menor, aumentando la velocidad en la cual son removidos de la placa motora, lo que se traduce en mayor inestabilidad (Akaaboune y cols., 1999; Bruneau y Akaaboune, 2006).

La mantención de la morfología de los dominios postsinápticos depende de la ventana de tiempo de la denervación, y aun cuando a tiempos cortos los cambios morfológicos no son evidentes, la estabilidad del dominio postsináptico se ve afectada. En el contexto de este trabajo de tesis, es importante señalar que *no se ha realizado un análisis detallado a tiempos prolongados después de un daño al nervio respecto a los cambios morfológicos que podrían evidenciar la mantención o la pérdida del nicho regenerativo de la UNM.*

Un fenotipo interesante que se observa en el dominio postsináptico frente a la denervación crónica es la fragmentación. En músculos crónicamente denervados de 3, 6 y 9 meses se describe un incremento en el número de fragmentos de los agregados del AChR, aun cuando los dominios postsinápticos se observan en todos los tiempos analizados (Mu y cols., 2018). El aumento de la fragmentación de los dominios postsinápticos también se ha descrito en un modelo de reinervación tardía, así como en modelos animales de algunas patologías como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), distrofia muscular de Duchenne, Charcot-Marie-Tooth, entre otras (Pratt y cols., 2015; Cipriani y cols., 2018; Dobrowolny y cols., 2018). La pérdida de áreas de agregados del AChR y la consecuente fragmentación del dominio postsináptico descrita en los modelos de denervación, también se ha descrito como una morfología indicadora de deficiencia de la UNM en otros

contextos fisiológicos (Valdez y cols., 2012). De manera interesante, se ha reportado que los dominios postsinápticos de las UNMs de diversas especies, como serpientes, ranas, ovejas e incluso humanos, son significativamente más fragmentados y las UNMs más pequeñas que las de modelos murinos (Jones y cols., 2017; Boehm y cols., 2020). A este respecto, análisis de la transmisión sináptica en fibras musculares de ratones envejecidos (26-28 meses) que contienen dominios postsinápticos fragmentados no arrojaron diferencias significativas con fibras de animales más jóvenes sin fragmentación, observándose incluso una tendencia al aumento en la transmisión sináptica (Willadt y cols., 2016). Esta evidencia sugiere que la fragmentación de los agregados del AChR no sería *per se* la causa de los defectos en la transmisión sináptica. Así, en el contexto de esta tesis, es interesante considerar el contexto en el que se presentan los fenotipos fragmentados, así como el análisis de distintos tipos de fragmentación de la UNM.

#### **1.4.3. Comportamiento de las células de Schwann frente a daño al nervio**

Para que se logre la regeneración de la UNM luego de daño al nervio es necesaria la degradación de los remanentes del axón distal, lo que resulta en un microambiente apto para la sobrevivencia, regeneración y guía axonal. Por otra parte, en el músculo denervado, también es necesaria la guía axonal para la reinervación de los dominios postsinápticos denervados. Tanto las mSC como las

tSC participan activamente de estos procesos requeridos para la regeneración de la UNM luego de daño mecánico al nervio.

En el sitio de daño al nervio, las mSCs reaccionan de forma inmediata frente a la detección del daño axonal por mecanismos aun no descritos, lo que gatilla su desdiferenciación. Las respuestas de las mSC frente al daño axonal incluyen: *i*) la regulación positiva de factores neurotróficos que estimulan la supervivencia y regeneración axonal, *ii*) la regulación positiva de la expresión de citoquinas que reclutan a macrófagos que participan de la fagocitosis de los fragmentos del axon distal (degeneración Walleriana), y *iii*) la activación de procesos celulares intrínsecos de degradación de mielina, que se ha descrito inhiben el crecimiento axonal (Rotshenker, 2011; Jessen y cols., 2015). Además, una respuesta fundamental de las mSC frente al daño axonal es el cambio a una morfología elongada bipolar y el alineamiento de estas células para formar columnas celulares llamadas bandas de Büngner (Jessen y cols., 2015), estructuras que mantienen el trayecto de los axones, guiando la reinervación en la UNM (Burnett y Zager, 2004; Scheib y Höke, 2013) (Figura 2).

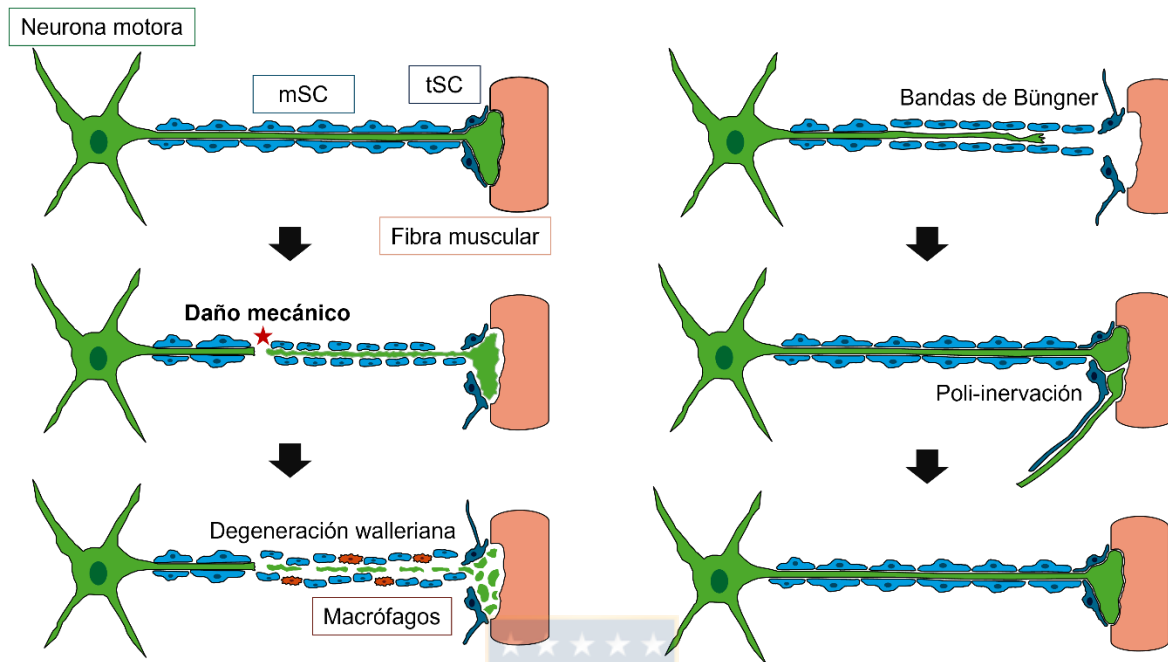
Las tSC son esenciales para la reinervación exitosa de los dominios postsinápticos. Luego de la resección de un segmento del nervio, las tSC extienden procesos de hasta 200-300  $\mu\text{m}$  fuera de la región sináptica, los que se mantienen por hasta 60 días después de la denervación crónica (Reynolds y Woolf, 1992). Estos procesos también se observan luego de daño por aplastamiento del nervio, pero se retraen tan pronto como ocurre la reinervación de los dominios postsinápticos (Reynolds y Woolf, 1992). Se ha descrito que la interacción entre

NRG1 y los receptores ErbB2 presentes en las tSC regulan la extensión de procesos de las tSC luego de la denervación de la UNM (Santosa y cols., 2018). En experimentos desarrollados en un paradigma experimental de denervación parcial en el músculo *soleus*, que resulta en UNMs denervadas en cercanía topológica a UNMs inervadas, se observó que los procesos de las tSCs contactan a UNMs inervadas formando “puentes” que inducen la aparición de “fibras de escape” desde las UNMs inervadas, proyecciones que son guiadas hacia los dominios postsinápticos denervados (Son y Thompson, 1995; Son y Thompson, 1995; Ko y Robitaille, 2015) (Figura 2). Se ha descrito que un evento temprano luego de la denervación de la UNM es la expresión de la quimioquina CXCL12 $\alpha$  por parte de las tSC, la que señala a través del receptor CXCR4, presente en los conos de crecimiento de los axones motores, guiando así a los axones regenerados hacia los dominios postsinápticos (Negro y cols., 2017). Por otra parte, además de su rol en la guía de axones motores luego de daño al nervio, las tSC podrían participar en la mantención de los dominios postsinápticos luego de la denervación a través de la expresión de agrina (Yang y cols., 2001). En conjunto, tanto las mSC como las tSC actúan a distintos niveles en la mantención de un microambiente favorable para la regeneración de la UNM (Figura 2).

### **1.5. Alteraciones morfológicas de la UNM en otros contextos biológicos**

Las morfologías celulares que se observan durante la denervación y reinervación de la UNM también se han descrito en modelos experimentales de

patologías musculares y neurológicas (Haddix y cols., 2018). Estos incluyen la fragmentación postsináptica de la UNM (Shiao y cols., 2004), la aparición de proyecciones celulares y la migración de tSC fuera de la UNM (Carrasco y cols., 2016), así como la poli-inervación de los dominios postsinápticos (Sleigh y cols., 2014). Además, la descripción de fenotipos exclusivos de la regeneración de la UNM se vuelve más complejo si se tiene en cuenta que algunas de las morfologías celulares que ocurren en la reinervación también se pueden observar en la UNM en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, una proporción significativa de UNMs adultas (~20 %) exhiben proyecciones de tSC (Hastings y cols., 2020), mientras que tanto la fragmentación como la poli-inervación de los dominios postsinápticos son progresivamente más frecuentes en las UNMs de animales de edad avanzada (Valdez y cols., 2010; Willadt y cols., 2016; Blasco y cols., 2020). Esta evidencia sugiere que *alteraciones morfológicas específicas en los tres componentes celulares de la UNM podrían coordinarse para ejercer una respuesta adaptativa para restablecer una función sináptica adecuada en distintos contextos biológicos*. En el marco de esta tesis, hemos tenido en cuenta que la mayoría de los estudios han analizado la función y la morfología muscular hasta que se logra la reinervación de la UNM. Sin perjuicio del aporte de dichos estudios, razonamos que *posibles respuestas adaptativas de la UNM podrían visualizarse mejor a tiempos prolongados después de que se produzca la reinervación de los dominios postsinápticos*.



**Figura 2: Esquema de la regeneración morfológica de la sinapsis neuromuscular.**

Luego del daño mecánico al axón motor, ocurre la degeneración Walleriana. Las mSC y los macrófagos fagocitan a los restos del axón motor distal. Una vez que los restos del axón distal se eliminan, las mSC se alinean formando las bandas de Büngner a través de las cuales el axón regenerado es guiado hacia los músculos denervados. Por su parte, las tSC extienden largos procesos celulares guiando a los axones motores regenerados hacia los dominios postsinápticos denervados, lo que resulta en una poli-inervación inicial. Finalmente, la mayoría de los axones motores, excepto uno, se retraen originando así UNMs mono-inervadas.



## 1.6. Recuperación funcional de la UNM luego de daño

Aun cuando los modelos murinos recuperan la morfología y función de la sinapsis neuromuscular alrededor de 6 semanas después del daño por aplastamiento al nervio (Magill y cols., 2007), la regeneración funcional luego de daño a nervios periféricos es muy limitada en humanos, aun considerando los avances en técnicas de microcirugía (Hoke, 2006; Palispis y Gupta, 2017; Huang y cols., 2021). Por otra parte, se ha descrito que, como consecuencia de parálisis facial, la mayoría de los pacientes humanos presentan sincinesia, definida como el movimiento involuntario de músculos de una región cuando se intentan mover músculos de otra (Husseman y Mehta, 2008). Más aun, en las parálisis faciales más comunes y con mejor pronóstico, se ha descrito que el 30% de los pacientes no recupera completamente la función motora (Husseman y Mehta, 2008). En un estudio realizado a pacientes que sufrieron corte completo de nervios de la extremidad superior y posterior reparación quirúrgica, se describieron defectos en las funciones motora y sensorial (Thomas y cols., 1987). Una posible causa de la deficiencia en la recuperación funcional puede ser la muerte neuronal por apoptosis luego del daño (Scheib y Höke, 2013). Además, se debe considerar que los axones motores en humanos deben recorrer distancias mucho mayores que en roedores, y la velocidad de regeneración axonal es menor en humanos (Scheib y Höke, 2013; Palispis y Gupta, 2017). Como corolario de lo anterior, concluimos que *una descripción detallada de la regeneración de la UNM en modelos murinos podría revelar las características morfológicas o moleculares indicativas de una recuperación funcional exitosa.*

Se han desarrollado distintos paradigmas experimentales para tratar de imitar el daño y regeneración que ocurre en humanos, utilizando modelos de daño al nervio que resultan en distintos tiempos y grados de éxito en la regeneración de la UNM (Griffin y cols., 2010). Por ejemplo, modelos de daño al nervio por múltiples aplastamientos a distintos días, así como la resección y posterior resutura del nervio, resultan en una reinervación tardía. En estos paradigmas se observó regeneración axonal, recuperación de la morfología de la UNM y reinervación de los dominios postsinápticos denervados, además de la recuperación de la función sensorial a partir de 20 días luego del daño; sin embargo, no se logró una recuperación de la función motora (Sakuma y cols., 2016). Estos resultados sugieren que sólo en ventanas de tiempo específicas se mantiene un ambiente permisivo para la regeneración funcional de la UNM y *que no existe necesariamente una relación directa entre una recuperación de la morfología de la UNM con su funcionalidad*. De lo anterior, se desprende que poder diseccionar las vías de señalización que participan en la mantención de un nicho regenerativo que permiten la recuperación funcional de la UNM podría ser clave para posibles intervenciones tendientes a mantener la integridad de la UNM denervada y así permitir su recuperación funcional aun a mayores tiempos de reinervación.

### **1.7. Señales moleculares en contextos de daño y regeneración de la UNM**

Una característica fundamental de la regeneración del sistema nervioso periférico es que algunas de las proteínas que participan en la formación de la

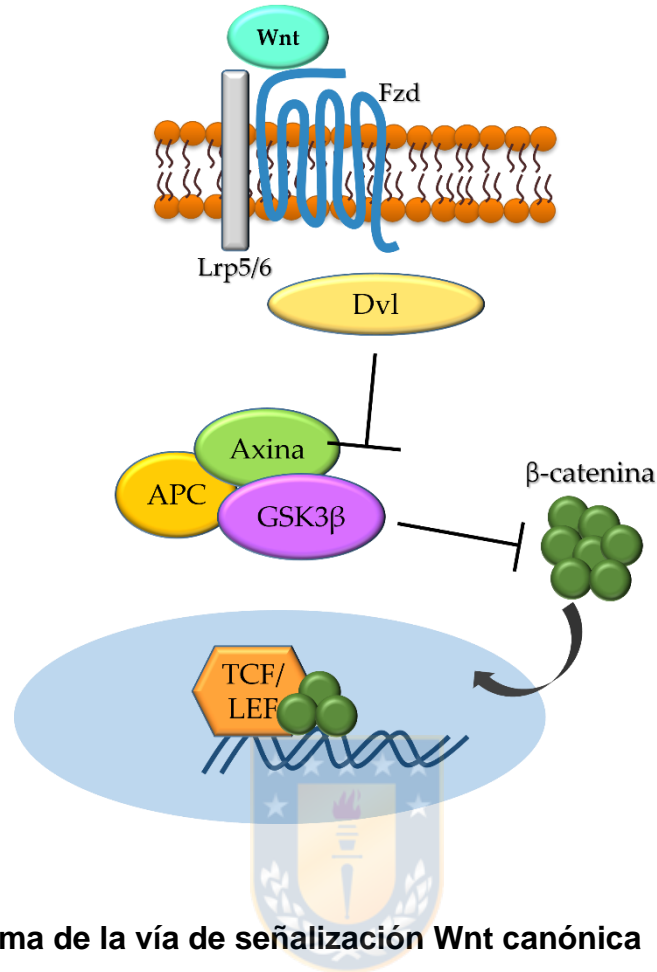
sinapsis neuromuscular regulan también su estabilidad y se alteran frente a daño y denervación de la UNM. Por ejemplo, los niveles de expresión de la proteína MuSK en músculo esquelético se ven afectados cuando los músculos son denervados: aumenta con la denervación y recupera sus niveles basales al ocurrir la reinervación del músculo (Valenzuela y cols., 1995). La localización del ARNm de MuSK y su expresión también cambia con la denervación: desde las zonas sinápticas a las zonas extrasinápticas, con una regulación negativa de la expresión en las zonas sinápticas (Valenzuela y cols., 1995; Bowen y cols., 1998). Por otra parte, el silenciamiento total o parcial de proteínas de la sinapsis neuromuscular como Dok7 o LRP4 en la UNM adulta inducen cambios morfológicos en la UNM, como la fragmentación y reducción del área del dominio postsináptico, disminución de la cobertura del terminal nervioso, defectos en la transmisión sináptica y en el rendimiento en ensayos motores, además de alteraciones en la expresión de proteínas sinápticas (Barik y cols., 2014; Eguchi y cols., 2016). Tanto MuSK, Dok7 y LRP4 participan activamente de la formación y maduración de la UNM, así como también en la mantención de la UNM adulta. Considerando *la importancia de caracterizar un nicho regenerativo en la UNM denervada, es fundamental la identificación de proteínas y vías de señalización que participen de la mantención de este nicho.* Una de las vías que participa durante el desarrollo y maduración de la UNM, y se altera en los músculos denervados luego de daño al nervio, es la vía de señalización Wnt.

### 1.7.1. Señalización Wnt en la UNM

El concepto "señalización Wnt" abarca a diversas vías que desempeñan papeles determinantes en una amplia gama de escenarios biológicos. Por ejemplo, se ha descrito que distintas vías Wnt regulan la proliferación de células madre, la apoptosis y la motilidad celular, participando de procesos del desarrollo como la formación del eje embrionario, la segmentación embrionaria y la organogénesis (Niehrs, 2012; Willert y Nusse, 2012). La señalización Wnt también se ha descrito en diversas patologías como distintos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Niehrs, 2012). Los ligandos Wnt (19 genes Wnt en el ratón y el ser humano) señalizan a través de receptores Frizzled (Fzd), de los que se han descrito diez miembros (Fzd1-10) en vertebrados (Gordon y Nusse, 2006). En la vía de señalización Wnt canónica (también denominada vía Wnt/ $\beta$ -catenina), la unión del ligando Wnt con su receptor Fzd permite la activación de la proteína de andamiaje citoplasmática Dishevelled (Dvl), lo que inhibe la fosforilación de  $\beta$ -catenina mediada por la glicógeno sintasa quinasa  $3\beta$  (Gsk3 $\beta$ ) a través de la desorganización del complejo Gsk3 $\beta$ /Axina/APC. Lo anterior gatilla la degradación de  $\beta$ -catenina, su acumulación en el citoplasma y su translocación al núcleo, con la consecuente activación de la expresión de genes blanco (Koles y Budnik, 2012) (Figura 3). Existe una diversidad de vías "no canónicas", siendo las dos mejor caracterizadas la vía de "polaridad celular planar" (Wnt/PCP), que regula la reorganización del citoesqueleto de actina en diferentes contextos, como la polaridad celular y la morfogénesis (Ciani y Salinas, 2005) y la vía "Wnt/calció", que regula las decisiones sobre el destino y migración celular durante el desarrollo

mediante el aumento de los  $[Ca^{2+}]_i$  y la consecuente activación de proteínas quinasas específicas (Niehrs, 2012). Aunque los ligandos, receptores y efectores Wnt son muy redundantes, las vías Wnt presentan varios niveles de regulación. Las células secretan antagonistas específicos que restringen las funciones de la señalización Wnt. Por ejemplo, los miembros de la familia Dickkopf (DKK) inhiben a los correceptores LRP5/6, bloqueando específicamente la señalización Wnt canónica, mientras que las proteínas secretas relacionadas con Fzd (Sfrps) se unen directamente a los ligandos Wnt, inhibiendo potencialmente a todas las vías Wnt (Cruciat y Niehrs, 2013).

Evidencia acumulada en las últimas dos décadas indican que distintas vías de señalización activadas por ligandos Wnt también participan en la formación de sinapsis (Salinas y Zou, 2008). Específicamente, los ligandos Wnt tienen distintos roles en la formación de la UNM de vertebrados. En embriones de pez cebra, la reducción de la expresión de Wnt11r en células musculares resulta en una reducción del pre-patrón del AChR y en defectos en la guía axonal (Jing y cols., 2009). Por su parte, en ratones nulos para la expresión de Wnt4 se observó una disminución de los agregados del AChR del “pre-patrón” al comparar con animales control (Strochlic y cols., 2012). En cultivos de miotubos tratados con Wnt3 y agrina, se demostró que Wnt3 induce la formación de micro agregados del AChR y que estos se mantienen y consolidan en agregados de mayor tamaño sólo en presencia de agrina (Henriquez y cols., 2008). Por otro lado, el ligando Wnt3a, altamente similar a Wnt3, es expresado por células musculares durante la formación de la UNM regula negativamente la agregación del AChR inducida por agrina a través de



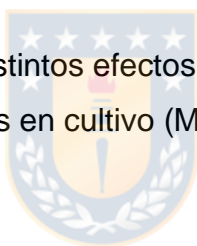
**Figura 3: Esquema de la vía de señalización Wnt canónica**

En la vía Wnt canónica, el ligando Wnt se une a su receptor Frizzled (Fzd) y su correceptor LRP5/6, activando la proteína Dishevelled (Dvl) la que induce el desarme del complejo compuesto por Axina, Gsk3β, APC. La proteína Gsk3β fosforila a β-catenina gatillando su degradación, la activación de la vía resulta en la inhibición de Gsk3β, permitiendo que β-catenina se acumule en el citoplasma, se transloque al núcleo donde forma un complejo con los factores de transcripción TCF/LEF activando la expresión de genes blanco. Modificado de (Ciani y Salinas, 2005).

la disminución de la expresión de rapsina (Wang y cols., 2008). Pese a su alta identidad de secuencia aminoacídica (27 a 83%) (Miller, 2002), los ligandos Wnt pueden presentar actividad pro- o anti-agregación del AChR a través de diferentes vías de señalización, regulando con ello la formación de UNMs maduras (Tabla 1).

Efecto	Ligandos Wnt
<b>Agregación de AChR independiente de Agrina</b>	Wnt9a, Wnt9b, Wnt 10b, Wnt11, Wnt16
<b>Agregación de AChR dependiente de Agrina</b>	Wnt3
<b>Inhibición de la agregación de AChR</b>	Wnt3a, Wnt7a, Wnt8a, Wnt10b

**Tabla 1:** Ligandos Wnt y sus distintos efectos en la agregación de los AChR sobre la membrana de miotubos en cultivo (Modificado de (Li y cols., 2018))



### 1.7.2. Señalización Wnt en daño a la UNM

De manera interesante, diversos estudios han descrito cambios en la actividad de la vía de señalización Wnt canónica en situaciones donde se altera la integridad de la UNM. Por ejemplo, mediante análisis de microarreglo de genoma completo en músculos denervados de ratón 6 días luego del daño, se describió que genes que participan en la vía de señalización Wnt, tales como el receptor *Fzd9*, el regulador positivo de la vía Wnt *Frat2*, y *Nr4a1*, un gen de respuesta a Wnt1, disminuyen sus niveles de expresión. Por otra parte, genes que pueden inhibir la vía de señalización Wnt canónica, como *Ctgf* y *Cyr61*, aumentan su expresión, lo que sugiere que en

los músculos denervados la actividad de la vía de señalización Wnt disminuye (Magnusson y cols., 2005).

En otro estudio, se analizó la expresión génica de efectores de la vía de señalización Wnt en músculos de ratones modelo de ELA, una patología neurodegenerativa que cursa con una pérdida de la innervación de la UNM y posterior muerte de neuronas motoras (Moloney y cols., 2014). Por medio de análisis de microarreglos de cDNA se observó que en estadios pre-sintomáticos tempranos de la patología, ocho genes efectores de la vía Wnt aumentan su expresión, mientras que nueve de ellos exhiben una expresión disminuida. En estadios pre-sintomáticos tardíos, cuando comienza la denervación de la UNM, un gen efector de la vía Wnt aumenta su expresión mientras que cinco de estos genes disminuyen su expresión en músculo (de Oliveira y cols., 2014). Esta evidencia muestra una alteración de la vía de señalización Wnt cuando los defectos en la UNM comienzan a aparecer, previo a la sintomatología de la patología.

La evidencia más completa que relaciona a la señalización Wnt con el daño a la UNM se obtuvo en músculo *plantaris* de ratones después de la resección de un segmento del nervio ciático. Se observó que la desestabilización de agregados del AChR que ocurre dos meses luego del daño se correlacionaba con un aumento en la expresión de Wnt3a (desde dos semanas luego del daño), en comparación a músculos control no denervados. Este aumento se observó especialmente en zonas cercanas a los agregados del AChR desestabilizados. Adicionalmente, utilizando ratones transgénicos TCF/Lef:H2B-GFP, que expresan un gen reportero de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, se observó un aumento en la actividad de la vía



dos meses luego del daño en los músculos denervados, resultados que fueron consistentes con un aumento de los niveles de una forma activa de  $\beta$ -catenina posterior a la neurotmesis (Kurimoto y cols., 2015). Aun cuando estos resultados muestran una activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en UNMs dañadas, *se desconoce la consecuencia de la activación de dicha vía de señalización sobre la UNM denervada.*

En nuestro laboratorio, se han analizado los posibles efectos de la manipulación experimental de la vía Wnt sobre la UNM. En trabajos previos, utilizando cultivos de células C2C12 (línea celular de mioblastos) se sobreexpresó el receptor Fzd9 y se observó una disminución significativa en el área y número de agregados del AChR en los miotubos; por otra parte, al inhibir la expresión de Fzd9 se observaron efectos opuestos, evidenciados por un incremento significativo en el área y número de agregados del AChR de los miotubos (Avilés y cols., 2014). Adicionalmente, se describió la acumulación de  $\beta$ -catenina en los miotubos transfectados con Fzd9 (Avilés y cols., 2014). En su conjunto, estas evidencias revelan que Fzd9 regula negativamente la agregación del AChR en miotubos en cultivo a través de la vía Wnt canónica (Avilés y cols., 2014). En estudios posteriores del efecto de la vía Wnt sobre UNMs inervadas mediante la electroporación *in vivo*, se sobreexpresó Fzd9 en el músculo *levator auris longus* (LAL) y se observó un aumento en el número de agregados del AChR con morfología compleja, mientras que el silenciamiento de Fzd9 resultó en un incremento en el número de agregados fragmentados (Ojeda, 2017). Con respecto a la transmisión sináptica, se observó que al sobreexpresar Fzd9 existe una disminución significativa en la amplitud de los mEPP, de los EPP y del tamaño

del QC, mientras que el silenciamiento de Fzd9 resultó en un aumento en la amplitud de los mEPP (Ojeda, 2017). Por otra parte, al sobreexpresar LRP6, co-receptor de la vía Wnt canónica, en ratones en estadio P21, se observó un aumento en la proporción de estructuras postsinápticas maduras, mientras que la sobreexpresión del inhibidor de la vía Wnt, DKK1, mostró una disminución en la proporción de estructuras postsinápticas maduras (Ojeda, 2017). Así mismo, la sobreexpresión *in vivo* de Wnt3a en fibras musculares indujo fragmentación de aparatos postsinápticos en la UNM, lo que correlacionó con un aumento en la eficiencia de la transmisión sináptica (Ojeda, 2017). En su conjunto, estos *antecedentes reflejan el requerimiento de estudios que permitan entender el efecto de la activación de la vía de señalización Wnt sobre la morfología y función sináptica en situaciones de daño de la UNM.*



## 2. HIPÓTESIS

Dado que la recuperación morfológica de la UNM no conlleva una recuperación directa e inmediata de su funcionalidad, hemos razonado que un estudio detallado de los cambios morfológicos y funcionales a largo plazo en UNMs regeneradas y su comparación con UNMs denervadas crónicamente permitiría detectar *rasgos indicativos de la recuperación de la UNM*. Por otra parte, se ha descrito que distintos ligandos Wnt gatillan diferentes vías de señalización que tienen efectos opuestos sobre la agregación de los AChR en la membrana postsináptica durante la formación de la UNM. De forma interesante, en modelos de patologías se han observado alteraciones en los niveles de expresión de genes que participan en la vía de señalización Wnt. Más aun, la vía de señalización Wnt canónica se encuentra activa posterior a la denervación de la UNM, especialmente en cercanía de los dominios postsinápticos desestabilizados. Sin embargo, *el rol que cumple la vía de señalización Wnt canónica sobre la regeneración de la UNM adulta es desconocido*.

En su conjunto, estos antecedentes reflejan el requerimiento de estudios que permitan entender el efecto de la activación de la vía de señalización Wnt sobre la morfología y función sináptica en situaciones de daño y regeneración de la UNM. En base a esta evidencia, la **hipótesis** de este trabajo de tesis es:

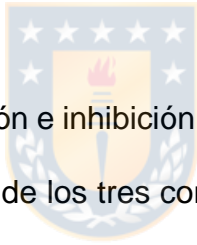
*La regeneración funcional de la sinapsis neuromuscular depende de adaptaciones morfológicas perdurables y es regulada negativamente por la activación de la vía de señalización Wnt canónica.*

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el comportamiento morfológico y funcional a largo plazo en la regeneración de la UNM y el efecto de la activación de la vía de señalización Wnt canónica en el proceso.

Para resolver la problemática planteada, nos propusimos los siguientes **objetivos específicos:**

1.- Identificar los fenotipos morfológicos de los tres componentes celulares y la función a largo plazo durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.



2.- Estudiar el efecto de la activación e inhibición farmacológica de la señalización Wnt canónica sobre la morfología de los tres componentes celulares y la función durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.

### 3. MATERIALES

#### 3.1. Animales de experimentación

Se obtuvieron ratones CF-1 y FVB hembras o machos desde el bioterio del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Concepción, desde el Instituto de Salud Pública de Chile y desde el animalario de la Universidad de Sevilla. Se utilizaron animales de edades entre 2 a 6 meses para realizar estudios en el músculo LAL. Los animales fueron mantenidos en un vivero con condiciones de humedad y temperatura apropiadas. Los animales fueron alimentados con pellets (Prolab RMH-3000, LabDiet) y agua *ad libitum*. La limpieza de jaulas se realizó tres veces por semana. Los procedimientos experimentales fueron aprobados y conducidos siguiendo los protocolos del manual de bioseguridad y bioética de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, Gobierno de Chile) y del Comité de Bioética de la Universidad de Concepción. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia inhalatoria (Isoflurano 2% (v/v) con una mezcla de oxígeno a 0,8-1 L/minuto). Los ratones intervenidos fueron posteriormente sacrificados en cámaras con una sobredosis de isofluorano y exanguinación.

#### 3.2. Cepas bacterianas

*E. coli* DH5 $\alpha$ : Cepa utilizada para la preparación de plásmidos en pequeña y gran escala. Son bacterias competentes para transformación química por el método

de Inoue modificado que presentan una eficiencia de transformación promedio de  $10^{6-7}$  ufc/ng de ADN plasmidial.

Medios de cultivo de bacterias.

Caldo LB (MoBio): extracto de Levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L y NaCl 10 g/L para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos a purificar.

Agar LB (MoBio): para el crecimiento de colonias en placas.

### **3.3. Plásmidos**

pCMV/tdTomato: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato bajo el control del promotor CMV. El gen de resistencia del plásmido pCMV/tdTomato es kanamicina.

TCF/Lef:H2B-GFP: vector reportero de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente verde fusionada a la histona H2B bajo el control de seis elementos de respuesta a los factores de transcripción TCF/Lef. El gen de resistencia del plásmido TCF/Lef:H2B-GFP es kanamicina.

### **3.4. Equipos comerciales**

Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system: kit para extracción de ADN plasmídico desde bacterias transformadas basado en una lisis alcalina y la unión del ADN en una matriz de sílica.

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QiaGen): kit para extracción de ADN plasmídico desde medio líquido de bacterias transformadas mediante lisis alcalina y una columna de intercambio iónico. Se obtienen cantidades entre 100 a 200 µg de ADN.

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QiaGen): kit de extracción de ADN plasmídico desde medio líquido de bacterias transformadas mediante lisis alcalina y una columna de intercambio iónico. Se obtienen cantidades aproximadas a 1000 µg de ADN.

### 3.5. Anticuerpos

Listas de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la dilución indicada respecto del propósito experimental.

Nombre	Anticuerpo	Tipo	Especie	Origen	Propósito	Dilución
<b>α-BTX</b>				Molecular Probes	IF	1:500
<b>16.5H2</b>	Marcador de neuronas motoras SC-1	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:50
<b>2H3</b>	Antígeno asociado a neurofilamentos	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:300
<b>39.3F7</b>	Factor de transcripción Isl-1	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:50
<b>DAPI</b>				ThermoFisher	IF	1:100
<b>MAP1B</b>	Map1b	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	IF	1:50
<b>MO-1</b>	Marcador de neuronas motoras	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:50

<b>S100</b>	Proteína S100	Policlonal	Conejo	Dako	IF	1:300
<b>SB1</b>	Sinaptobrevina	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:50
<b>SV2</b>	Glicoproteína de vesículas sinápticas 2A	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:50

**Tabla 2:** Anticuerpos primarios utilizados. Lista de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo, con su respectiva dilución de uso. IF: Inmunofluorescencia.

<b>Antígeno</b>	<b>Marca</b>	<b>Señal</b>	<b>Propósito</b>	<b>Dilución</b>
<b>IgG ratón</b>	JacksonImmunoResearch	Cy <sup>TM</sup> 3	IF	1:250
<b>IgG conejo</b>	JacksonImmunoResearch	Cy <sup>TM</sup> 5	IF	1:250
<b>IgG cabra</b>	JacksonImmunoResearch	Cy <sup>TM</sup> 3	IF	1:250

**Tabla 3:** Anticuerpos secundarios utilizados. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo, con su respectiva dilución de uso. IF: Inmunofluorescencia.

### 3.6. Reactivos y soluciones en general

Acetona (Merck); etanol (Merck); HCl (Merck); isopropanol (Merck); agua grado biología molecular (Promega); Glicina (US Biological); BSA 10mg/ml (New EnglandBiolabs); Isoflorano (Fontane); medio de montaje acuoso para fluorescencia (Sigma-Aldrich); Formaldehido (FA) 1,5 %/ (v/v) (Millipore); PBS 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4); suero fisiológico de cloruro de sodio 0,9 % (Airoflex); Andrographolide (98%, Sigma-Aldrich); XAV-939 (98%, Sigma-Aldrich); IWP-2 (98%, Sigma-Aldrich) y  $\mu$ -conotoxina GIIB (99%, Alomone Labs).



### **3.7. Material en general y equipos disponibles**

Cubreobjetos de 24x50mm (Citoglas), placas de cultivo bacteriano, tubos cónicos de 15 y 50 ml, material de disección (pinzas Dumont Mini Forceps –Style 5 y Dumont #5SF Forceps, tijeras Vannas Spring Scissors) (FST), pipetas de plástico estériles de 5 y 10 ml, pipetas pasteur de vidrio (HIRSCHMANN), Kit Sylgard 184 Dow (Corning).

El Laboratorio de Estudios Neuromusculares (NeSt Lab) contempla todas las normas de bioseguridad detalladas en el manual respectivo de ANID y la Universidad de Concepción.

El laboratorio posee cuatro refrigeradores 2-8°C, tres refrigeradores de -20°C, un refrigerador de -80°C, una balanza electrónica, pHmetro, homogenizador de tejidos, microcentrífuga de sobremesa, fuentes de poder, cámara de electroforesis y electrotransferencia de proteínas y agitadores orbitales (Labnet). Tenemos un sistema de fotodocumentación para geles y para la cuantificación de proteínas, ADN y ARN (Qubit), un termociclador y un equipo de autoclave.

El laboratorio cuenta con una sala de disección, dedicada a la manipulación de animales. La sala de disección está equipada con un estereomicroscopio de disección con luz fría (Motic), una máquina de anestesia inhalatoria (SciVerma Scientific) y un electroporador ECM 830 (BTX).

Se cuenta además con una sala de microscopía equipada con un estereomicroscopio AxioZoom.V16 con objetivos de alta apertura numérica de 1,0x y 2,3x con un factor de acercamiento de 12,5:1 (generando magnificación desde

11x hasta 410x) (Carl Zeiss) equipado con un sistema Apotome. El estereomicroscopio cuenta con platina motorizada y filtros para longitudes de onda en el rango de GFP, RFP, BFP y DAPI. La sala de microscopía cuenta también con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse i80 equipado con una cámara monocromática digital de alta calidad Nikon DS Qi1Mc.

Además, se cuenta con las facilidades del Centro de Microscopía Avanzada CMA-BíoBío, que contiene un microscopio confocal LSM700 (Zeiss) y un microscopio espectral LSM 780 (Zeiss).



## 4. MÉTODOS

### 4.1. Transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$

Para la generación de vectores plasmidiales se transformó la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competente, mezclando entre 25 y 50 ng de ADN de concentración conocida con 50  $\mu$ L de bacterias. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min, luego se incubó por 90 s a 42 °C y posteriormente se llevó a hielo rápidamente por 2 min. Las bacterias se recuperaron agregando 250  $\mu$ L de caldo LB e incubando a 37 °C a 200 rpm de agitación por 1 h. Se sembró una alícuota de 50  $\mu$ L de bacterias en placas de agar con kanamicina 100  $\mu$ g/mL según corresponda, para selección de colonias transformadas. Para la purificación de los vectores plasmidiales se creció una colonia aislada en caldo LB con kanamicina 100  $\mu$ g/mL por 12-16 h a 37 °C y 200 rpm para tratar de acuerdo con los kits comerciales QIAGEN Plasmid Midi kit de QIAGEN y QIAGEN Plasmid Maxi kit de QIAGEN.

### 4.2. Purificación de DNA plasmidial por MidiPrep

Para obtener vectores plasmidiales desde un cultivo bacteriano en un rango de eficiencia de 100-200  $\mu$ g se utilizó el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi kit (QiaGen). El método se basa en la lisis alcalina de las bacterias y afinidad por una matriz hecha de sílica que se une al ADN en presencia de una sal caotrópica. Se creció un cultivo bacteriano de 100 mL de medio LB con kanamicina y fue incubado

a 37 °C con agitación por toda la noche. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 6.000 xg por 15 min y el sedimento fue resuspendido en 4 mL de tampón P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNasa A). Luego, se agregó 4 mL de tampón P2 (200 mM NaOH; 1 %p/v SDS) para lisar las bacterias, se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó tampón P3 (3 M acetato de potasio pH 5,5). La mezcla fue centrifugada a 18.000 xg por 45 min a 4°C y la fase acuosa transparente fue aplicada a una columna de afinidad por ADN previamente equilibrada con tampón QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 %v/v isopropanol; 0,15 %v/v Triton X-100). El ADN unido a la columna fue lavado con tampón QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 8,5; 15 % v/v isopropanol) y eluido con 5 mL de tampón QF (1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl pH 7,0; 15 %v/v isopropanol). Posteriormente, el ADN fue precipitado con 3,5 mL de isopropanol y centrifugado a 13.000 xg por 30 min a 4 °C. Finalmente, el sedimento fue lavado con Etanol 70 %v/v, secado y resuspendido en un volumen de entre 50 y 100 µL de agua de biología molecular ultrapura.

#### **4.3. Purificación de plásmidos a gran escala por precipitación con PEG (Maxiprep)**

Se creció un cultivo de 500 mL de medio LB con kanamicina apropiado inoculado con una colonia transformada con el plásmido correspondiente, entre 18 y 20 h a 37 °C con agitación. Luego, las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 4.000 rpm (Rotor GSA, Sorvall) por 15 min a 4 °C. El sedimento fue

resuspendido en 10 mL de tampón P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL ARNasa A). Posteriormente, se agregó 10 mL de tampón P2 (200 mM NaOH; 1 %p/v SDS) para lisar las bacterias, se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó tampón P3 (3 M acetato de potasio pH 5,5). La mezcla fue centrifugada a 18.000 x g por 45 min a 4°C y la fase acuosa transparente fue aplicada a una columna de afinidad por ADN previamente equilibrada con tampón QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 %v/v isopropanol; 0,15 %v/v Triton X-100). El ADN unido a la columna fue lavado con 60 mL de tampón QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 8,5; 15 % v/v isopropanol) y eluido con 15 mL de tampón QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 15 %v/v isopropanol). Posteriormente, el ADN fue precipitado con 10,5 mL de isopropanol y centrifugado a 13.000 xg por 30 min a 4 °C. Finalmente, el sedimento fue lavado con Etanol 70 %v/v, secado y resuspendido en un volumen de 100 - 150 µL de PBS 0,1 M.39

#### **4.4. Electroporación del músculo LAL**

Los músculos LAL de ratones adultos de 3 meses fueron electroporados con los plásmidos indicados en el apartado 3.3. Previo a la electroporación, se inyectó de modo subcutáneo 10 µL de hialuronidasa 2 mg/mL en PBS 1X durante 1 h. Posteriormente y bajo anestesia inhalatoria (isofluorano) se realizó una incisión en la piel de 8 mm sobre la sutura sagital del cráneo dejando el músculo LAL expuesto. A continuación, se inyectó en la fascia que se distribuye sobre el músculo 10 µL de

ADN en PBS 1X formando una burbuja. Se aplicaron 5 pulsos cuadrados de 50 V/cm<sup>2</sup> de 20 ms de duración cada uno a 1 Hz de frecuencia (Ojeda y cols., 2020), utilizando el electroporador ECM 830 (BTX) y electrodos de oro tipo aguja (Genetrodes, BTX).

#### **4.5. Daño mecánico al nervio facial**

La denervación del músculo LAL fue realizada como se describe en trabajos anteriores del laboratorio (Ojeda y cols., 2020). Brevemente, los ratones fueron anestesiados utilizando una mezcla de oxígeno/isoflurano 2 % (v/v) y la sedación fue comprobada mediante el reflejo de tacto en el pie. A continuación, el ratón fue ubicado sobre su lado izquierdo y su oreja derecha fue fijada hacia la nariz exponiendo el área posterior del pabellón auricular donde se realizó la incisión. El área fue afeitada y desinfectada previa la incisión utilizando el antiséptico clorhexidina gluconato 2%. En la zona posterior al pabellón auricular derecho del animal se procedió a ubicar la vena auricular, y a una distancia de 2 mm de la vena se realizó una incisión de aproximadamente 5 mm en la piel para poder disecar a través de la grasa evitando el corte de vasos sanguíneos o tejido muscular. Se consideró la ubicación anatómica del nervio accesorio espinal, del conducto auditivo y del músculo digástrico anterior como referencias para localizar el nervio facial. Una vez que se visualizó la rama posterior auricular del nervio facial, se realizó la resección de aproximadamente 3-5 mm de nervio o se realizó el aplastamiento del nervio durante 30 segundos con presión constante, utilizando una pinza Dumont

#5/45. Posteriormente, la piel fue suturada con hilo quirúrgico absorbible de poliglactina (Vicryl 6-0), y los animales fueron inyectados subcutáneamente con Tramadol clorohidrato 5% en una dosis de 30 mg/kg de ratón. Los animales sometidos a procesos quirúrgicos fueron monitoreados para la evaluación de signos de dolor o estrés asignando puntajes por cada uno de los distintos parámetros considerando los criterios del punto final humanitario previamente descritos (Wolfensohn y Lloyd, 1999). Adicionalmente, los animales sometidos a procesos quirúrgicos fueron monitoreados durante el día del procedimiento por signos faciales de dolor de acuerdo con evidencia previa (Langford y cols., 2010).

#### **4.6. Tratamientos farmacológicos**

Con el fin de determinar el efecto de la activación e inhibición de la vía Wnt en la regeneración de la UNM del músculo LAL, ratones denervados por medio de aplastamiento del nervio facial fueron tratados con ANDRO (activador de la vía Wnt canónica), XAV-939 (inhibidor de la vía Wnt canónica), IWP2 (inhibidor de la vía Wnt), o sus respectivos vehículos. Los fármacos fueron disueltos en suero fisiológico comercial (Cloruro de Sodio 0.9 %,) y aplicado por vía subcutánea mediante la utilización de jeringas de plástico desechables de 1mL, sin que el volumen final suministrado excediera los 200  $\mu$ L. El tratamiento fue aplicado a los animales tres veces a la semana durante 1 a 3 semanas, según los requerimientos del experimento. Como control fue utilizado el vehículo de cada fármaco disuelto en suero fisiológico.

#### **4.7. Ensayos de doble $\alpha$ -BTX conjugada a fluoróforos**

Para analizar la estabilidad de los AChR, se realizaron ensayos de doble  $\alpha$ -BTX como se describe en trabajos anteriores del laboratorio (Zelada y cols., 2021). Brevemente, ratones anestesiados fueron inyectados subcutáneamente (en la región de la cabeza/cuello) con una concentración no saturante de  $\alpha$ -BTX conjugada al fluoróforo Alexa-488 (BTX1). Luego de siete días, los animales fueron sacrificados, se disecaron los músculos LAL, y se fijaron con formaldehído durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los músculos se lavaron y fueron tratados  $\alpha$ -BTX conjugada al fluoróforo Alexa-555 (BTX2).



#### **4.8. Inmunofluorescencia de músculo LAL**

Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de isoflurano y exanguinación. Posteriormente, se disecó el músculo LAL en PBS 1X.

Para analizar los cambios morfológicos de la UNM luego del daño al nervio, se marcaron los componentes celulares de la UNM: axones y terminales motores, tSC y AChR. Posterior a su disección, los músculos fueron fijados en Formaldehído (FA) 0,5 %/ (v/v) en PBS 1X a temperatura ambiente durante 90 min. Luego, los músculos se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 min en agitación (70-100 rpm) a temperatura ambiente. Los músculos LAL fueron incubados con glicina 0,15 M en PBS 1X durante 30 min y luego permeabilizados mediante lavados con PBST (PBS 1X/Tritón X-100 0,5 % (v/v)) 8-10 veces durante 10-15 min. Posteriormente, los músculos fueron bloqueados con PBST-BSA 4 % (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Para



disminuir la tinción inespecífica de los anticuerpos hechos en ratón se realizó una co-incubación con 30 µg/mL del fragmento de unión a antígeno (Fab) dirigido contra IgG de ratón, en conjunto con el bloqueo de las muestras. Al día siguiente, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios 2H3 (1:300) y SV2 (1:50) que cuando son usados en forma simultánea marcan el axón motor y el terminal axónico, respectivamente, además del anticuerpo S100B (1:300) que marca células de Schwann (Tabla 1), en PBST-BSA 4 % (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C. A continuación, los músculos fueron lavados con PBST durante 2 h en agitación, cambiando la solución 8 veces, y luego incubados con dilución de anticuerpo secundario junto con αBTX Alexa-488 (1:500) y DAPI (1:1000) (Tabla 2) en PBST-BSA 4 % (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los tejidos fueron lavados con PBST durante 2 h cambiando la solución 8 veces y luego postfijados con FA 1 % (v/v) en PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente. Los músculos fueron lavados con PBST durante 1 h y luego con PBS 1X. Finalmente, los músculos fueron montados entre dos cubreobjetos en medio de montaje para fluorescencia, adhiriendo los cubreobjetos en sus bordes con cianoacrilato.

## **4.9. Análisis de imágenes**

### **4.9.1. Adquisición de imágenes**

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 700 con tres líneas de láser para la excitación de fluoróforos (488, 561 y 633). Se utilizó el objetivo 40 X (Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27) y 63 X (Plan-

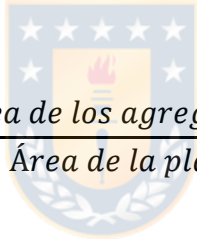
Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27) para la adquisición de imágenes con los canales de los tres componentes de la UNM. Se capturaron imágenes de planos confocales de 1  $\mu\text{m}$ , obteniendo secciones de 60-80  $\mu\text{m}$  totales. Para el análisis de la morfología del componente postsináptico, se utilizó la opción de corrección de brillo “Auto x Brightness correction” ajustando la ganancia maestra de intensidad de fluorescencia en los planos z más profundos, sin variar la potencia del láser. Durante el procedimiento de exploración, los valores se interpolan en forma automática y lineal entre las posiciones vecinas dentro de la pila de planos z.

Para las reconstrucciones de músculo completo en campo claro se utilizó la función *tile* del estereomicroscopio AxioZoom.V16, la que permite obtener imágenes de alta resolución al subdividir la región de interés en múltiples imágenes más pequeñas que luego se combinan con precisión en los bordes utilizando el software ImageJ, para obtener una visión general más amplia.

#### **4.9.2. Análisis de la UNM**

Aproximadamente 30 a 50 UNMs por cada músculo LAL fueron cuantificadas en al menos tres animales por condición. Los parámetros morfométricos de los dominios pre y postsinápticos fueron cuantificados utilizando el programa ImageJ de acuerdo con una metodología estandarizada descrita previamente como “NMJ-morph” (Jones y cols., 2016). Brevemente, las imágenes adquiridas por microscopía confocal fueron procesadas para obtener las proyecciones de máxima intensidad (MIPs) digitalizadas. Utilizando la función “*crop*” (cortar), se seleccionaron las UNMs

*en face* (aquellas UNM que se encuentran completamente extendidas y hacia el punto de observación) de cada campo visual. Para cada UNM seleccionada, se separaron los canales de los dominios pre y postsinápticos y se ajustó el umbral por el método Huang (que define un rango de píxeles difusos para ajustar el umbral de píxeles considerados para una imagen y separarlos del fondo de la imagen (Huang y Wang, 1995)) para fijar los píxeles fluorescentes que componen los dominios pre y postsinápticos. Luego, se seleccionaron los parámetros a medir incluyendo el área y el perímetro. Para medir los parámetros de la placa motora se utilizó el comando “*Create background*” y luego se midieron área, perímetro y diámetro de cada placa motora. La compactación del dominio postsinápticos se calculó mediante la siguiente fórmula:



$$\text{Compactación} = \left( \frac{\text{Área de los agregados del AChR}}{\text{Área de la placa motora}} \right) \times 100$$

La determinación del porcentaje de superposición entre los dominios pre y postsinápticos se realizó mediante la concatenación de las imágenes de ambos canales por separado para obtener el área de los agregados del AChR “sin ocupar” por el terminal nervioso. Usando una fórmula descrita previamente, se obtuvo el porcentaje de superposición entre los dominios pre y postsinápticos.

$$\text{Superposición} = \left[ \frac{(\text{Á. total de los agreg. del AChR} - \text{Á. de los agreg. del AChR sin "ocupar"})}{\text{Á. total de los agreg. del AChR}} \right] \times 100$$

Con el fin de estudiar cambios en el comportamiento de las tSC, se analizó cada soma de tSC por UNM y las proyecciones de las tSC fuera de la región sináptica.

Utilizando el programa ZEN 2.3 SP1 (black) se analizó la presencia de somas de SC en un radio de 50  $\mu\text{m}$  de los dominios postsinápticos.

Para analizar la inervación de los dominios postsinápticos, también se realizaron reconstrucciones tridimensionales de imágenes de planos z utilizando el programa ImageJ y se contabilizó de forma manual cada axón motor contactando a un dominio postsináptico.

#### **4.9.3. Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico**

Los aparatos postsinápticos fueron identificados mediante la detección de agregados de AChRs teñidos con  $\alpha\text{BTX}$ . Con el fin de analizar posibles cambios, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de imágenes de planos z utilizando el programa ImageJ. Se contabilizaron de forma manual los fragmentos aislados que conforman cada pretzel, formados por el desensamble de AChRs que generan segmentos discontinuos de agregados de AChRs. Las proyecciones que se generaron fueron rotadas en  $360^\circ$  para evidenciar la separación entre cada fragmento. El índice de fragmentación se calculó utilizando la fórmula descrita previamente (Jones y cols., 2016):

$$\text{Fragmentación} = 1 - \left( \frac{1}{\text{Número de fragmentos del dominio postsináptico}} \right)$$

Adicionalmente, los dominios postsinápticos se clasificaron según su morfología en agregados tipo pretzel maduro (morfología compleja con formas altamente

ramificadas), fragmentados (aparatos postsinápticos con 6 o más agregados distintivos de AChR o “fragmentos”) o colapsados (dominios postsinápticos “encogidos”, sin ramificaciones visibles). Los agregados de tipo fragmentados fueron subclasificados en fragmentados definidos y borrosos según evidencia descrita anteriormente (Tremblay y cols., 2017). La morfología de los dominios postsinápticos (pretzel, fragmentado y colapsado; así como fragmentado definido y fragmentado borroso) fue clasificada manualmente mediante estudio ciego a los grupos experimentales.

#### **4.10. Electrofisiología de la UNM del músculo LAL**

##### **4.10.1. Preparación del músculo LAL**

Para proceder con los registros electrofisiológicos, los ratones fueron sacrificados mediante saturación por CO<sub>2</sub> y exanguinación. Los animales fueron inmovilizados decúbito prono y rasurados con una hoja de afeitar. Luego se diseccionó todo el tejido muscular desde el pabellón auricular derecho hasta el izquierdo cruzando la línea media sagital. Todos los músculos craneales disecados fueron traspasados a una placa Petri de 55 mm<sup>2</sup> donde fueron sujetos sobre una cubierta de silicona con alfileres de 0,2 mm, con los músculos LAL hacia la base de la placa. Se retiraron las diferentes capas musculares hasta llegar al músculo LAL. Finalmente, se limpió de tejido adiposo y fascia. Posteriormente, el músculo LAL disecado con las ramas del nervio intacto (2 – 3 mm) se posicionó en una cámara de registro de metacrilato que contiene una base de goma de silicona especialmente

diseñada para ello, con un sistema de burbujeo de oxígeno. A su vez, en el interior de la solución de la cámara se ubicó un electrodo clorurado conectado con tierra del seguidor de voltaje. Para penetrar las fibras musculares, la pipeta se ubicó cercana a la superficie del músculo, visualizándose bajo un microscopio de transmisión directa (Olympus BX50WI).

#### **4.10.2. Estimulación presináptica**

En este procedimiento, el nervio fue aislado y estimulado mediante un electrodo de succión compuesto por un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro que aloja un hilo de plata clorurado (Ag-AgCl, electrodo activo) y sobre el que se enrolla otro hilo conductor (Ag-AgCl) que corresponde al electrodo de referencia. Este dispositivo se conectó a un generador de pulsos aislado (Isolated Pulse Stimulator modelo 2100 A-M Systems) y a un sistema de succión mediante un tubo y una jeringa con solución salina extracelular. La estimulación del nervio se realizó aplicando una diferencia de potencial entre ambos terminales del electrodo de succión mediante pulsos cuadrados de 0,2 ms y de 2 - 15 V a frecuencias de 0,5 – 10 – 20 y 50 Hz.

#### **4.10.3. Registro de potenciales postsinápticos**

Para el registro de los potenciales postsinápticos de las fibras musculares, se utilizaron micropipetas fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato (calibre: 1mm Ø exterior, 0,75mm Ø interior) mediante un estirador de vidrio

horizontal (puller modelo P-97, Sutter Instrument Co.) calibrado bajo los siguientes parámetros: calor: 460, tirón: 200, velocidad: 80 y tiempo 200. Las micropipetas se llenaron con solución salina de 3 M de KCl en contacto con un alambre de plata clorurado unido al seguidor de voltaje y éste, a su vez, al cuerpo principal del amplificador de registro intracelular (TEC-0,5) y sujeta a un micromanipulador (Narishige MHW-3). La salida del amplificador se conectó a un convertidor analógico digital o interfaz (PowerLab/4SP), que transformó la señal analógica en digital, enviándola posteriormente al computador. Todo este dispositivo experimental se ubicó sobre una mesa anti vibratoria (Newport) aislado eléctricamente mediante una jaula de Faraday. La resistencia de la micropipeta dentro de la solución varió entre 15 - 35 MΩ. Esta resistencia se compensó mediante el amplificador, igual que la capacidad de la pipeta y el potencial de unión líquido debido a las soluciones del baño y de la pipeta. Usando el micromanipulador, se aproximó la micropipeta a una fibra muscular de manera que se observó un aumento progresivo de la resistencia. Una vez que la micropipeta penetró en la fibra muscular, se registró el potencial de membrana como una deflexión hacia abajo. Posteriormente, se dejaron de aplicar pulsos cuadrados a través de la micropipeta y se estimuló el nervio mediante el electrodo de succión. Tras dar un estímulo, se verificó el tiempo de subida del EPP, para saber la cercanía al terminal motor considerando aceptables valores menores a 1,2 ms. Tras comprobar la viabilidad del preparado, se bloqueó la contracción muscular adicionando al baño 3 mM de  $\mu$ -Conotoxina GIIB, bloqueante específico de los canales  $Na_v1s$  del músculo. Tras el bloqueo, se cerró el sistema de intercambio de solución y el burbujeo de la solución se trasladó a la cámara de

registro. Los experimentos se realizaron con una solución que contenía la siguiente composición: 135 NaCl, 5 KCl, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> y 12 glucosa (en mM). Se registraron mEPPs de un registro continuo de 200 ms y EPPs (protocolos de 100 estímulos) en diferentes fibras de un mismo preparado. Los datos fueron adquiridos en el programa Chart5. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente promedio de 22°C.

#### **4.10.4. Análisis de registros electrofisiológicos**

Los registros intracelulares se realizaron en el músculo LAL de ratones luego del daño por aplastamiento de nervio. Las amplitudes de los EPP y mEPP registrados en cada terminal fueron normalizados a -70 mV de potencial de membrana. Para ello, se utilizó la siguiente fórmula donde EPP corresponde a la amplitud del EPP registrado, EPP<sub>r</sub>, la amplitud del EPP corregido por el potencial de membrana y f el factor de conversión que se define de la siguiente forma:

$$f = \frac{V_s - E_r}{V_m - E_r}$$

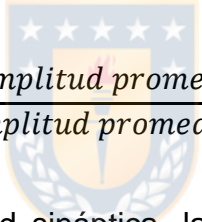
En esta fórmula, V<sub>s</sub> corresponde al potencial de membrana de corrección -70 mV, V<sub>m</sub> corresponde al potencial de membrana de la fibra registrada y E<sub>r</sub> corresponde al potencial de reversión que, para todos los casos se asume un valor de -5 mV.



Además, los EPPs registrados (EPPr) se corrigieron por la sumación no lineal mediante la ecuación de Boyd y Martin (Boyd y Martin, 1956):

$$EPPc = \frac{EPPr}{\left(1 - \left(\frac{EPPr}{V_m - E_r}\right)\right)}$$

Donde EPPc corresponde a la amplitud del potencial postsináptico corregido. El registro simultáneo de los potenciales de placa evocado y espontáneo se llevó a cabo durante 200 ms (estimulación del nervio a 0,5 Hz) y el contenido cuantal (QC) se estimó por el método directo mediante la siguiente fórmula:


$$QC = \frac{\text{Amplitud promedio EPP}}{\text{Amplitud promedio mEPP}}$$

Los parámetros de plasticidad sináptica, la facilitación por pulsos pareados (PPF) y la depresión de los últimos 10 estímulos se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$PPF = \frac{\text{Amplitud segundo EPP}}{\text{Amplitud primer EPP}}$$

$$\text{Depresión} = \frac{\text{Amplitud promedio 10 últimos EPP}}{\text{Amplitud promedio 10 primeros EPP}}$$

#### 4.11. Análisis estadístico

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 6.0 y Microsoft Excel 365. Todos los datos son presentados como valor de la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones estadísticas que consideran una variable fueron realizadas usando el test-t de Student de datos no pareados, test de Mann-Whitney o ANOVA de una vía, según se indique en la figura. Para los análisis estadísticos en los cuales fueron consideradas diversas variables, se utilizó el test ANOVA de dos vías. Fueron considerados estadísticamente significativos para un intervalo de confianza del 95%, diferencias con un valor p bajo 0,05. A los valores  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,0001$  se les asignó significancias estadísticas crecientes (\*; \*\*; \*\*\* y \*\*\*\* respectivamente). Se analizaron 3 animales por cada condición (N), 30-50 UNMs por animal (n), y 18-25 fibras musculares por animal (n).

## 5. RESULTADOS

Para determinar si la vía de señalización Wnt canónica regula negativamente el proceso de regeneración de la UNM luego de daño al nervio, se analizó la morfología y transmisión sináptica de la UNM luego de denervación por medio de daño mecánico al nervio utilizando activadores e inhibidores farmacológicos de la vía Wnt durante el proceso regenerativo. Previo al análisis con fármacos, se analizaron los cambios en la morfología y estabilidad de la UNM a largo plazo luego de daño mecánico al nervio que resulta en la degeneración y regeneración de la UNM. Además, se estudió la recuperación de la transmisión sináptica durante el proceso regenerativo de la UNM en el músculo LAL.



### **5.1. Identificar los fenotipos morfológicos de los tres componentes celulares y la función a largo plazo durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

#### **5.1.1. Batería de anticuerpos para el marcaje de la UNM del músculo LAL de ratón**

Para visualizar la UNM por medio de microscopía de fluorescencia, el primer paso consistió en estandarizar una batería de anticuerpos que serían utilizados para el marcaje de los componentes celulares de la UNM: los dominios pre- y postsinápticos, y las tSC. Para esto se utilizó un protocolo de inmunohistoquímica desarrollado en el laboratorio en muestras en montaje completo del músculo craneal LAL que participa en el control del movimiento del pabellón auricular del ratón. Este

músculo tiene ventajas experimentales tales como que se trata de un músculo delgado y plano, lo que permite preparaciones en montaje completo, así como análisis de UNMs *en face*, lo que facilita el análisis morfológico de esta sinapsis (Murray y cols., 2010). Además, es un músculo superficial, lo que facilita intervenciones *in vivo* (Ojeda y cols., 2020).

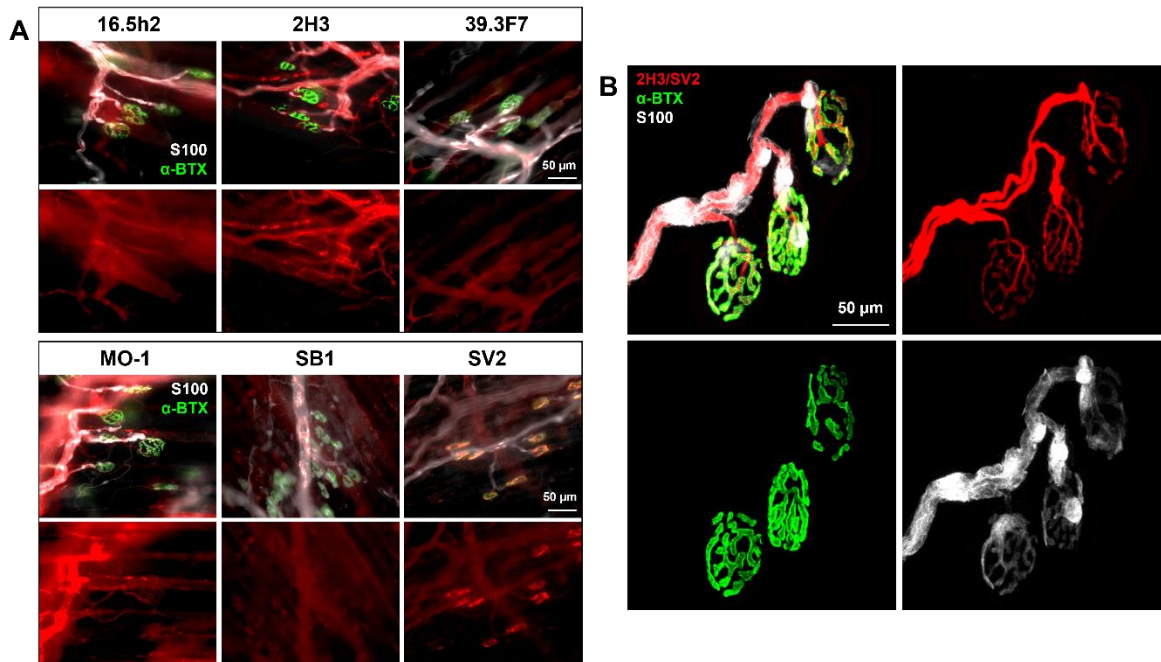
Para el marcaje de los dominios postsinápticos, se utilizó  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BTX), polipéptido derivado del veneno de una serpiente, que se une de forma irreversible y altamente específica a los AChR (Changeux y cols., 1970). Por otra parte, no existe un anticuerpo primario comercial que marque específicamente a las tSC (Castro y cols., 2020), por lo que se utilizó el anticuerpo S100B, que marca tanto a las tSC (no mielínicas) como a las células de Schwann mielínicas (que rodean a axones motores  $\alpha$ ). De esta manera, para seguir el comportamiento específico de las tSC, estas células fueron reconocidas por su ubicación en la UNM y en base a estudios previos que han descrito el comportamiento de estas células en distintas condiciones que resultan en la denervación de la UNM (Reynolds y Woolf, 1992; Son y Thompson, 1995; Son y Thompson, 1995).

Para el marcaje de los axones motores, se usaron distintos anticuerpos primarios, los que marcan neuronas motoras, neurofilamentos, factores de transcripción y proteínas de vesículas sinápticas (Tabla 2). Los anticuerpos fueron puestos a prueba utilizando músculos LAL de ratones sin intervenir y se determinó mediante microscopía de epifluorescencia de forma cualitativa aquellos anticuerpos primarios que otorgaran la marca más eficiente para el dominio presináptico de la UNM. De los anticuerpos probados, el anticuerpo SB1, que reconoce a la proteína

sinaptobrevina (Hadwiger y cols., 2010), no arrojó un marcaje claro de los terminales presinápticos (Figura 4A). Por su parte, los anticuerpos 16.5h2, 39.3F7 y MO-1, dirigidos contra neuronas motoras (Urakami y Chiu, 1990; Niederkofler y cols., 2010; Audouard y cols., 2012), si bien permitieron visualizar un perfil de nervios periféricos, no mostraron un claro marcaje de axones individuales (Figura 4A). Finalmente, los anticuerpos 2H3 y SV2, dirigidos contra neurofilamentos y vesículas sinápticas, respectivamente (Buckley y Kelly, 1985; Dodd y cols., 1988), arrojaron un marcaje claro de los nervios motores, los axones motores individuales y de los respectivos terminales presinápticos (Figura 4A). Dado que ambos anticuerpos primarios fueron desarrollados inmunizando a animales de la misma especie (ratón), y tal como ocurre en muchos de los estudios en el área (Jones y cols., 2016), los axones motores fueron marcados con una mezcla de ambos anticuerpos, los que fueron visualizados con un mismo anticuerpo secundario, de forma de marcar por completo al componente presináptico (axones motores y terminal nervioso) en el músculo LAL (Figura 4B).

### **5.1.2. La denervación crónica del músculo LAL gatilla la degeneración de los componentes de la UNM adulta.**

En su mayoría, los estudios de daño a nervios periféricos y recuperación de la función motora se han centrado en la reparación y regeneración axonal, asumiendo que la reinervación del músculo supondrá la recuperación de la función motora. Sin embargo, estudios recientes que utilizan modelos de reinervación tardía luego de daño al nervio han demostrado que aun cuando la reinervación ocurre, la



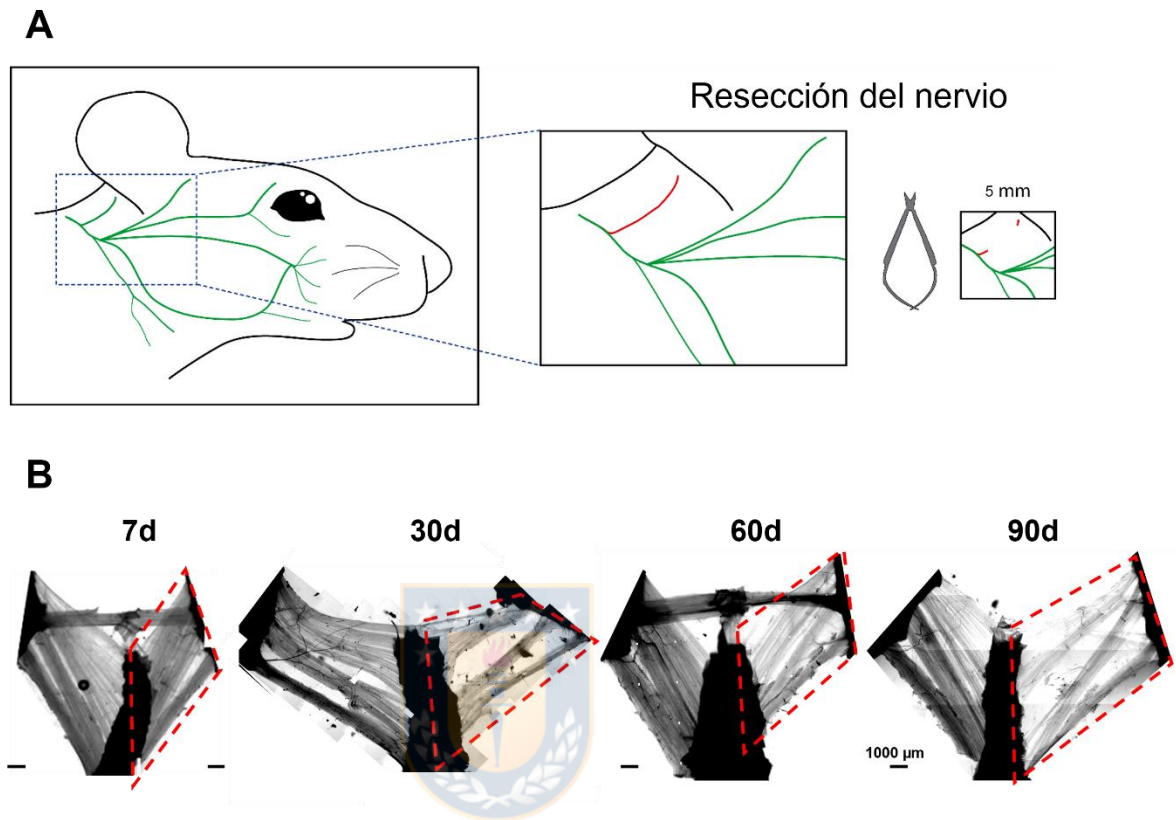
**Figura 4: Los anticuerpos SV2 y 2H3 resultan en un marcaje eficiente del axón y terminal motor de la UNM.**

Se realizaron protocolos de inmunohistoquímica en músculos LAL en modalidad montaje completo probando distintos anticuerpos para la identificación de los componentes de la UNM. **(A)** Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de los anticuerpos contra proteínas del axón o del terminal nervioso presináptico (en rojo): 16.5H2 (marcador de neuronas motoras SC-1), 2H3 (Antígeno asociado a neurofilamentos), 39.3F7 (Factor de transcripción Isl-1), MAP1B (proteína asociada a microtúbulos), MO-1 (Marcador de neuronas motoras), SB1 (Sinaptobrevina) y SV2 (Glicoproteína de vesículas sinápticas 2A). En los paneles superiores se muestran los distintos marcadores de neuronas con el marcaje para AChR (en verde) y para células de Schwann (en blanco). En los paneles inferiores se muestra el canal de marcadores de neuronas por separado. Barra= 50 µm. **(B)** Imagen representativa de microscopía confocal de los anticuerpos seleccionados para el marcaje de la UNM. Se utilizó una combinación de anticuerpos contra las proteínas SV2 y 2H3 para el marcaje de neuronas motoras (rojo), α-BTX para el marcaje de los AChR (verde) y anticuerpo S100B para el marcaje de células de Schwann (blanco). Barra= 50 µm.

recuperación de la transmisión sináptica depende del tiempo en que los dominios postsinápticos permanecen denervados (Sakuma y cols., 2016). Según esta evidencia, se analizó la morfología y funcionalidad de la UNM luego de daño al nervio, utilizando para esto modelos de daño que causan tanto una denervación crónica, como denervación seguida de regeneración de la UNM (Magill y cols., 2007; Sakuma y cols., 2016; Zhao y cols., 2017). En dichos paradigmas experimentales, se analizaron las alteraciones morfológicas a largo plazo de las UNMs del músculo craneal LAL.

A partir de trabajos previos (Olmstead y cols., 2015), se optimizó un procedimiento de denervación específica de los músculos craneales que participan en el movimiento del pabellón auricular en ratones, mediante la resección de un segmento de aproximadamente 5 mm de la rama auricular posterior del nervio facial derecho que inerva al músculo LAL (Figura 5A), mientras que músculos de animales sin daño fueron usados como controles (Ojeda y cols., 2020). Como control de la denervación, y dado que la disminución en el tamaño del músculo y en el calibre de las fibras musculares (atrofia muscular) han sido descritas luego de la denervación (Schiaffino y cols., 2013), se observaron los músculos en campo claro a distintos tiempos luego del daño, realizando reconstrucciones de todo el músculo, donde observamos que los músculos LAL denervados (derechos) presentan un evidente menor tamaño a partir de los 60 días luego del daño (Figura 5B).

Los músculos denervados fueron disecados a distintos tiempos luego del daño y se marcaron los axones motores junto con los terminales nerviosos (en rojo), las células de Schwann (en blanco) y los dominios postsinápticos (en verde) (Figura 6). En músculos control, los terminales nerviosos motores inervan a los dominios



**Figura 5: El músculo LAL se atrofia luego de un mes de denervación crónica.**

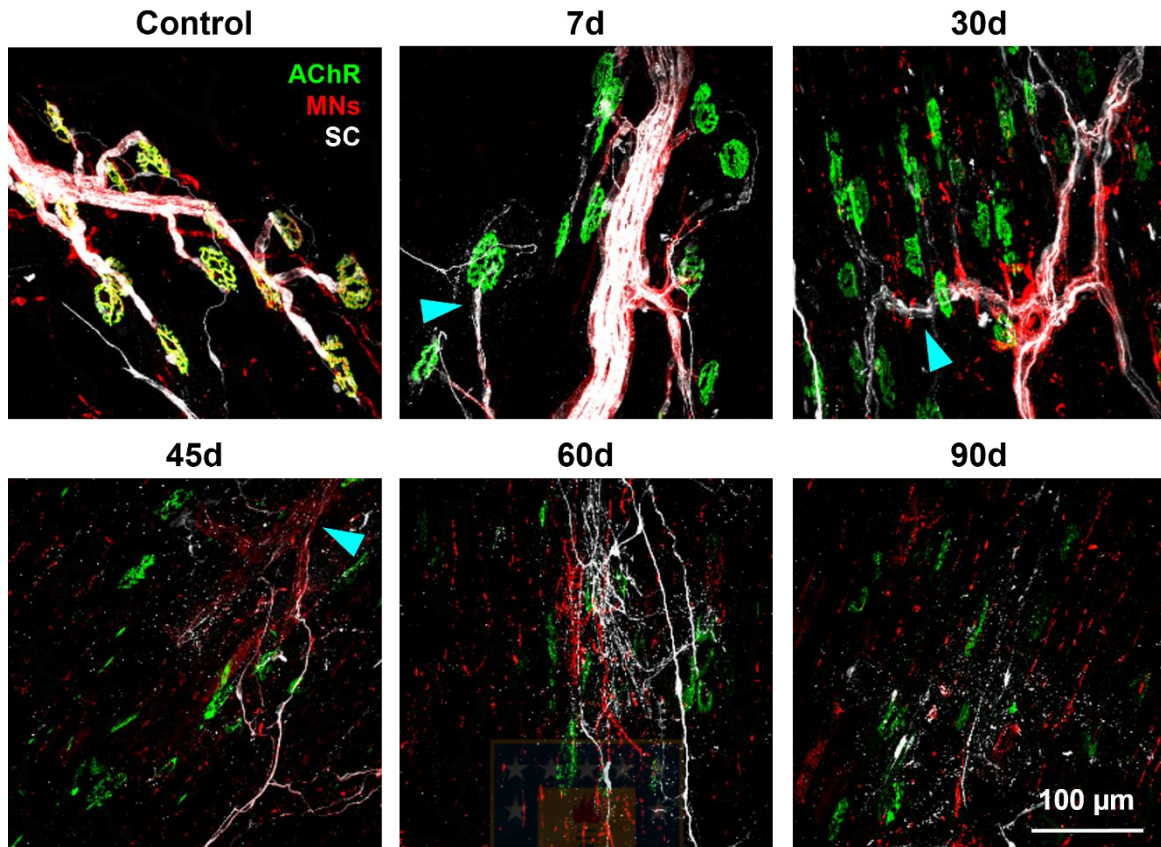
Modelo de degeneración de la UNM mediante un protocolo de daño al nervio tipo neurotmesis. **(A)** Esquema de la resección de un segmento de 5 mm de la rama auricular posterior del nervio facial (en rojo en panel derecho) que inerva al músculo LAL derecho. **(B)** Imágenes de campo claro de músculos LAL 7, 30, 60 y 90 días luego del daño al nervio (línea punteada roja señalizando LAL derecho). Barra= 1000  $\mu$ m.



postsinápticos, las tSC cubren por completo al terminal nervioso y los dominios postsinápticos tienen una morfología madura tipo pretzel. Por otro lado, a distintos tiempos luego de la resección del segmento del nervio se observan cambios en los tres componentes de la UNM: los axones motores se degeneran (evidenciado por la disminución de la tinción en terminales y axones motores, flechas color cian), mientras los dominios postsinápticos cambian su morfología desde maduras tipo pretzel hacia formas altamente fragmentadas a partir de los 30 días luego del daño. Al mismo tiempo, las tSC extienden proyecciones celulares, observándose en algunos casos los somas de las tSC alejados de los dominios postsinápticos denervados (Figura 6).

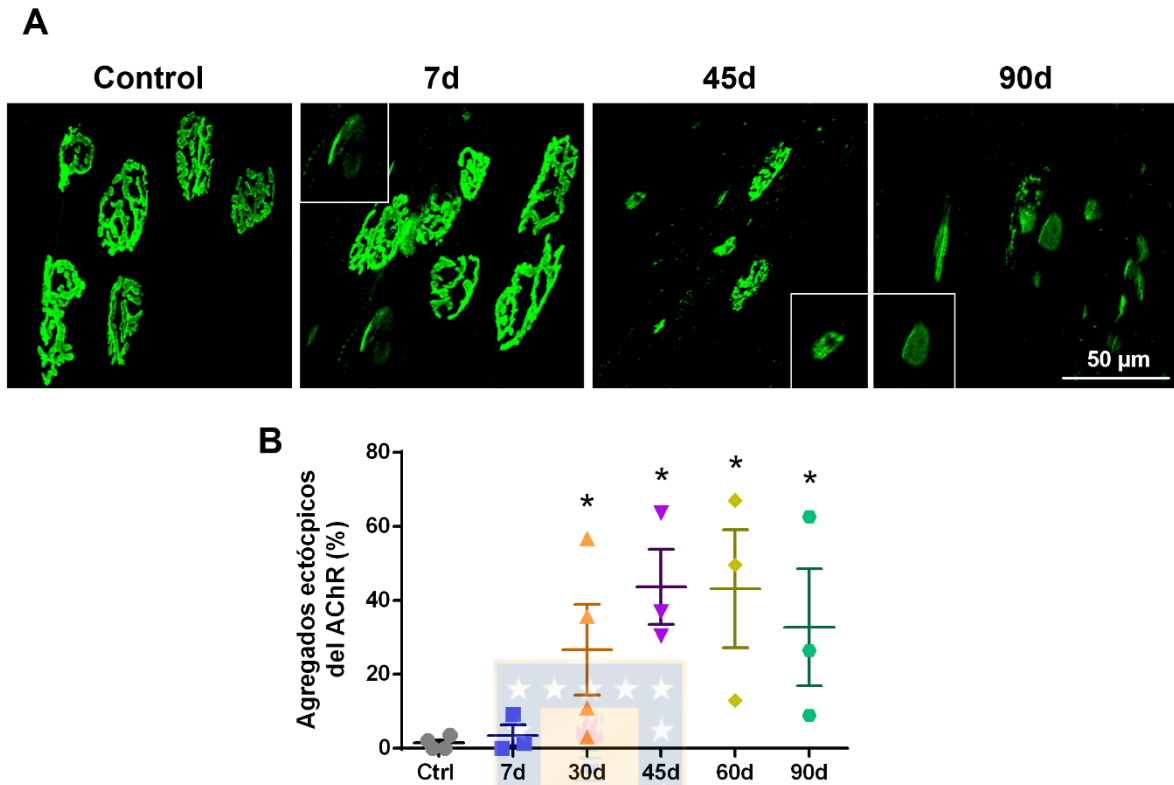
Considerando que la degeneración Walleriana de la porción distal del axón motor y la consiguiente denervación de los dominios postsinápticos resulta en la aparición de agregados ectópicos en los músculos denervados (Lømo, 2003), se cuantificó la proporción de dichos agregados en las fibras musculares de músculos LAL denervados. Se consideraron como agregados ectópicos aquellos con morfologías tipo placa y con densidad de AChR uniforme (Figura 7A). Se observó que el número de agregados del AChR ectópicos incrementó significativamente 30 días luego de la denervación ( $26,65\% \pm 12,23$ ) en comparación con la baja proporción de agregados ectópicos presentes en los músculos control ( $1,43\% \pm 0,87$ ). Este aumento significativo se mantuvo hasta tres meses luego del daño (Figura 7B).

Luego de 30 días de denervación crónica, el incremento en la proporción de agregados ectópicos y el drástico cambio en la morfología de los dominios



**Figura 6: Los componentes celulares de la UNM se degeneran a distintos tiempos después de denervación crónica.**

Músculos LAL fueron denervados por medio de la resección del nervio facial, y las UNM fueron identificadas por marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las tSC (S100B, blanco) y de los AChRs ( $\alpha$ -BTX; verde). Imágenes representativas de músculos LAL control y músculos LAL 7, 30, 45, 60 y 90 días luego del daño. Se observa la pérdida de la marca para axones y terminales motores (cabezas de flechas color cian). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barra= 100  $\mu$ m



**Figura 7: La denervación crónica resulta en la aparición de agregados ectópicos del AChR en las fibras musculares.**

Músculos LAL fueron denervados por resección del nervio facial y se marcaron los agregados del AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). **(A)** Imágenes representativas de los agregados del AChR de músculos control y músculos 7, 45 y 90 días luego de la resección del nervio facial. Los recuadros muestran imágenes ampliadas de agregados ectópicos. Barra= 50  $\mu$ m. **(B)** Se cuantificó el porcentaje de agregados ectópicos de AChR con respecto a los agregados de AChR totales a distintos tiempos luego de la resección del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3-4 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; prueba de Mann-Whitney).

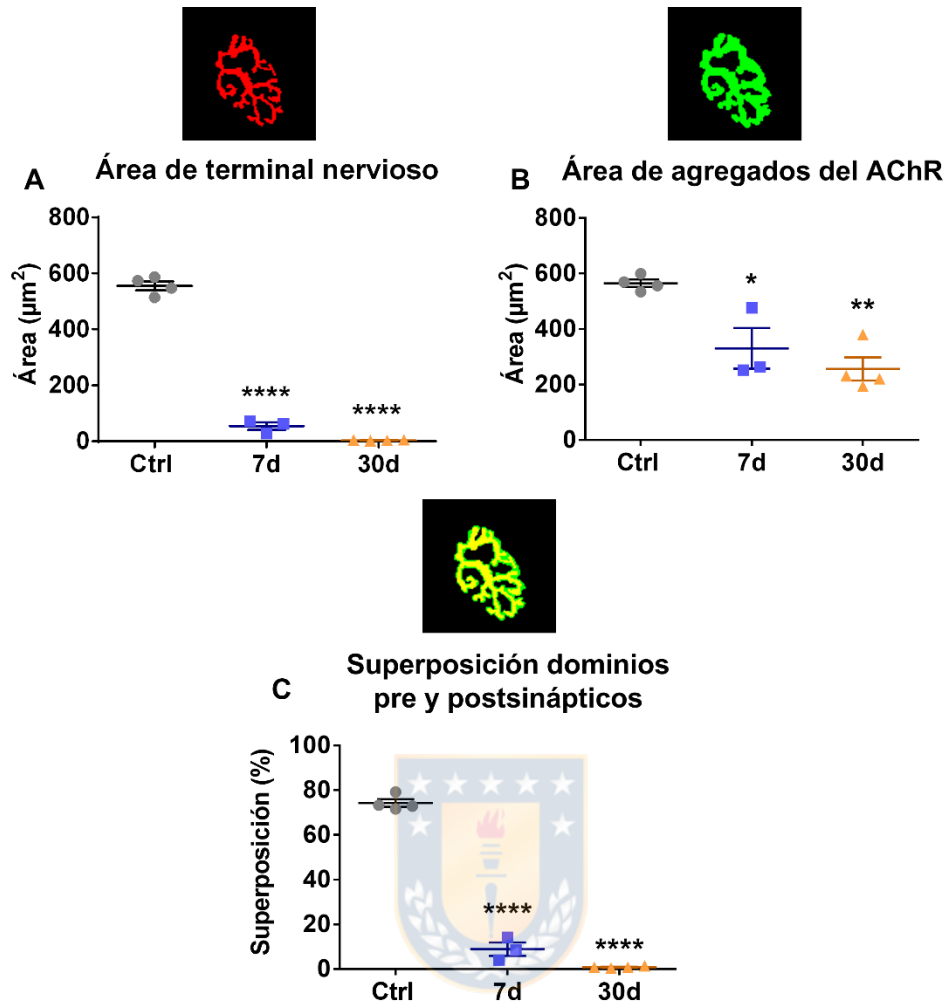
postsinápticos (Figura 6 y 7) dificultan la identificación de las UNMs. Por este motivo, la siguiente serie de análisis se realizó en músculos a 7 y 30 días luego de la resección del nervio. Se observó que a partir de los 7 días luego del daño existe una significativa disminución en el área presináptica, evidenciando la degeneración Walleriana del axón motor distal y, consecuentemente, la denervación de los dominios postsinápticos (Figura 8A). En el dominio postsináptico también se observa la disminución progresiva del área a partir de los 7 días luego del daño (Figura 8B). Consistente con lo anterior, la aposición entre los dominios pre y postsinápticos presenta una disminución significativa 7 días luego del daño (de  $8,61\% \pm 2,96$ ), la que se exagera luego de un mes, alcanzando la denervación total ( $0,79\% \pm 0,21$ ) (Figura 8C).



### **5.1.3. El número de células de Schwann terminales disminuye durante la denervación crónica del músculo.**

Las tSC participan activamente de la regeneración de la UNM. Se ha descrito que luego del aplastamiento del nervio motor, las tSC extienden procesos desde UNMs denervadas, los cuales se retraen luego de la reinervación (Reynolds y Woolf, 1992). Por lo tanto, el siguiente paso fue analizar el comportamiento de las tSC luego de daño crónico al nervio.

La cuantificación de tSCs mostró que los músculos LAL control presentan un promedio de  $2,25 \pm 0,06$  somas de tSC por UNM (Figura 9A, flechas color amarillo) (Figura 9B). A tiempos cortos luego de la denervación, se observan tanto somas como proyecciones de las tSC fuera de las regiones sinápticas (Figura 9A, cabezas



**Figura 8: La UNM disminuye su tamaño como resultado de la denervación crónica.**

Músculos LAL fueron denervados por resección del nervio facial y se analizaron las UNM 7 (cuadrados azules) y 30 días (triángulos naranjas) luego del daño. Como control se analizaron músculos LAL sin denervar (círculos grises). Cuantificación de las áreas de los dominios pre **(A)** y postsinápticos **(B)**. **(C)** Con estos datos se calculó la superposición entre los dominios pre y postsinápticos de UNMs individuales. Las figuras sobre cada gráfico son representativas del parámetro analizado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3-4 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de una vía.

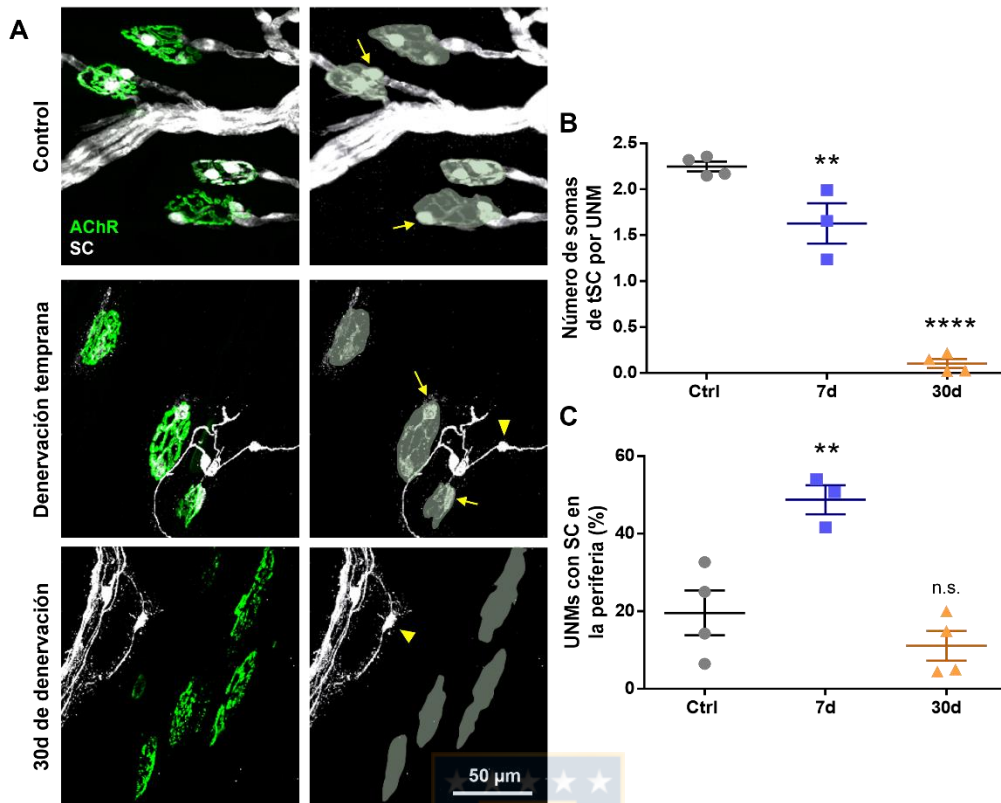
de flecha amarillas), lo que resulta en una disminución significativa a  $1,61 \pm 0,12$  de somas de tSC por UNM a los 7 días post daño al nervio (Figura 9B). A tiempos prolongados (30 días post daño al nervio), las UNMs tienen, en promedio, menos de 1 soma de tSC por UNM ( $0,12 \pm 0,04$ ; Figura 9B). Por otra parte, la cuantificación de UNMs con SC en su periferia (en un radio de  $50 \mu\text{m}$ ) mostró un porcentaje de  $19,60\% \pm 5,78$  de UNMs con SCs en la periferia, valor que incrementa significativamente 7 días posteriores al daño a  $48,77\% \pm 3,73$ , mientras que un mes luego del daño disminuye significativamente a  $11,10\% \pm 3,82$  (Figura 9C).

En conjunto, los resultados revelan que en el músculo craneal LAL se evidencian cambios morfológicos significativos en los componentes celulares de la UNM como resultado de una denervación crónica similares a los descritos en la literatura para músculos de las extremidades.



#### **5.1.4. Las UNMs del músculo LAL mantienen su morfología global luego de su regeneración.**

Se analizó el comportamiento de los componentes celulares de la UNM durante la denervación, reinervación y a tiempos prolongados luego de la reinervación. Para lograr un modelo de regeneración de la UNM, el paradigma experimental consistió en realizar axonotmesis, que implica daño directo al nervio sin causar disrupción del tejido conectivo (Menorca y cols., 2013). Para esto, la rama posterior auricular del nervio facial derecho fue aplastada por 30 segundos con una pinza (Fig. 10A). A distintos tiempos luego del daño, se disecaron los músculos LAL y mediante inmunofluorescencia se marcaron los componentes celulares de la UNM, los que se



**Figura 9: Las células de Schwann terminales no se mantienen en UNMs denervadas por largos períodos de tiempo.**

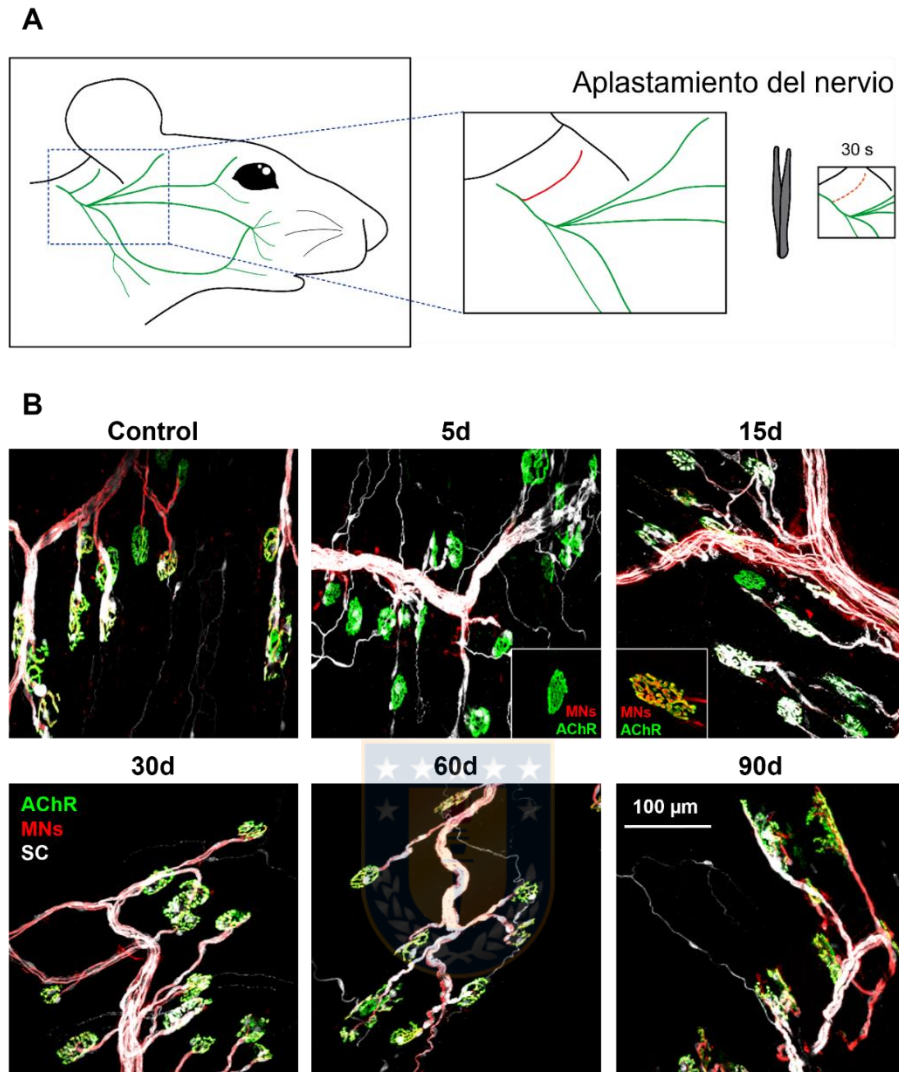
Músculos LAL fueron denervados por resección del nervio facial y las UNM fueron identificadas por marcaje de las tSC (S100B, blanco) y de los AChRs ( $\alpha$ -BTX; verde). **(A)** Imágenes representativas de músculos control (panel superior) y denervados por 7 (panel central) y 30 (panel inferior) días luego de la resección del nervio. Los paneles de la derecha muestran solo el canal de las SC mientras que el dominio postsináptico está delimitado (áreas verdes). Se observan somas de tSCs sobre (flechas amarillas) y en la periferia (cabezas de flecha amarillas) de UNMs. Barra= 50  $\mu$ m. Cuantificación del número promedio de somas de tSC por UNM **(B)** y de UNMs con SC en la periferia (dentro de un diámetro de 50  $\mu$ m de la región postsináptica) **(C)** en músculos LAL control (círculos grises) y en músculos 7 (cuadrados azules) y 30 (triángulos naranjas) días luego de la resección del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3-4 ratones por tiempo. (n.s.= diferencias no significativas, \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de una vía.

analizaron mediante microscopía confocal. Se observa que 5 días luego del daño, una alta proporción de los dominios postsinápticos se encuentran denervados (Figura 10B, inserto en panel 5d). La reinervación de las placas motoras se observa a los 15 días luego del daño al nervio (Figura 10B, inserto en 15d), observándose una morfología similar a las UNMs de músculos control a tiempos posteriores (Figura 10B).

Al cuantificar parámetros presinápticos, se observa una disminución significativa tanto del perímetro como del área del terminal nervioso 5 días luego del daño al nervio (Figura 11A), gatillado por la degeneración Walleriana del axón distal (Rotshenker, 2011). El perímetro del terminal nervioso recupera valores similares al de UNMs de músculos control a los 30 días luego de daño (Figura 11A). Por otra parte, el área del terminal nervioso disminuye significativamente 5 días luego del aplastamiento del nervio, recuperando áreas similares a las de los músculos control sólo tres meses luego del daño (Fig. 11B). Estos resultados indican que el terminal nervioso recupera su morfología luego de la reinervación de la UNM.

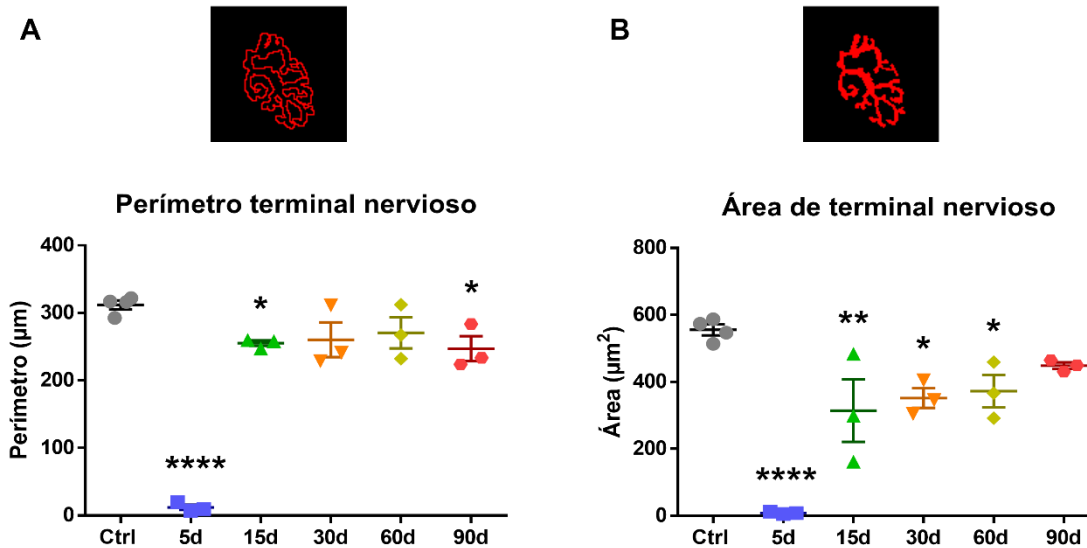
A continuación, se analizó el comportamiento de las tSC como consecuencia de la denervación de la UNM a corto plazo por aplastamiento del nervio. Se cuantificó el número promedio de somas de tSC por UNM (Figura 12A, flecha amarilla), el porcentaje de UNMs con tSC que extendían proyecciones fuera de la región sináptica (Figura 12A, cabeza de flecha amarilla vacía) y el porcentaje de UNMs con somas de SCs en su periferia, estableciendo un umbral de 50  $\mu\text{m}$  de radio rodeando a la placa motora (Figura 12A, cabeza de flecha amarilla). Estos resultados muestran que no existen alteraciones significativas del comportamiento de las tSC





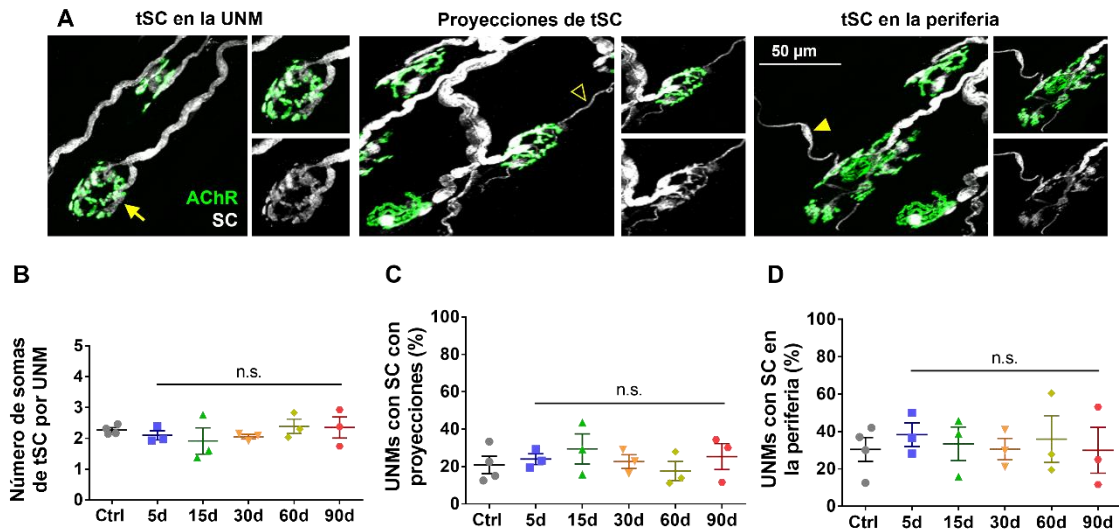
**Figura 10: La UNM recupera su morfología global luego de daño por aplastamiento al nervio.**

Modelo de regeneración de la UNM mediante un protocolo de daño al nervio tipo axonotmesis. **(A)** Esquema del daño al nervio mediante el aplastamiento por 30 segundos de la rama auricular posterior del nervio facial (en rojo en panel derecho) que inerva a los músculos que participan del movimiento del pabellón auricular. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de las UNMs de músculos LAL tomadas 5, 15, 30, 60 y 90 días luego del aplastamiento del nervio. Las UNM fueron identificadas mediante el marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). Barra= 100  $\mu$ m.



**Figura 11: Algunos parámetros del terminal nervioso se mantienen alterados a tiempos prolongados luego de la reinervación.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial. A partir de imágenes de microscopía confocal, se cuantificaron el perímetro (**A**) y área (**B**) del terminal nervioso de las UNMs de músculos LAL control (círculos grises) y músculos 5 (cuadrados azules), 15 (triángulos verdes), 30 (triángulos naranjas), 60 (rombos amarillos), y 90 (hexágonos rojos) días luego del daño al nervio. Las figuras sobre cada gráfico son representativas del parámetro analizado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (n.s.= diferencias no significativas, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de una vía.

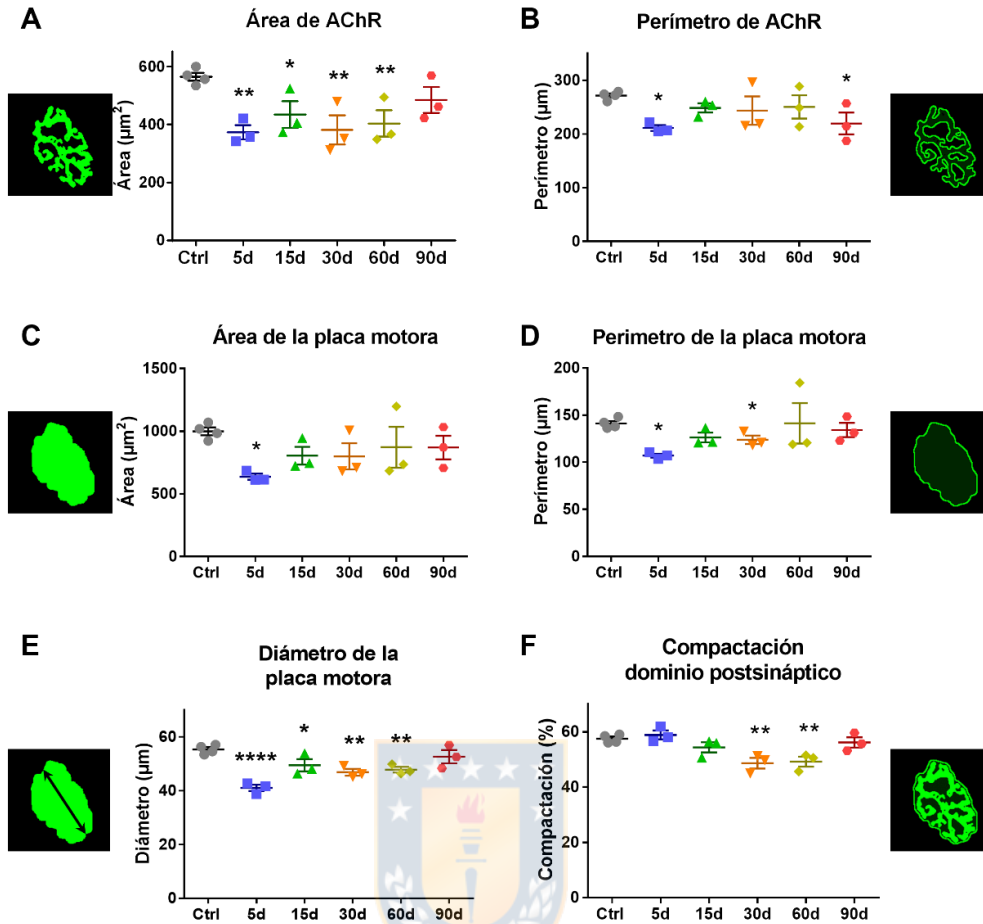


**Figura 12: La denervación transitoria de la UNM no resulta en cambios morfológicos de las tSC.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron identificadas por marcaje de las tSC (S100B, blanco) y de los AChRs ( $\alpha$ -BTX; verde). Imágenes representativas (**A**) y cuantificaciones (**B**, **C**, **D**) de las tSC cubriendo el terminal nervioso (flecha amarilla) (**B**), tSC emitiendo proyecciones fuera de la región sináptica (cabeza de flecha amarilla vacía) (**C**) y tSC migrando fuera de la región de la sinapsis, encontrándose dentro de 50  $\mu$ m a la periferia de los dominios postsinápticos (cabeza de flecha amarilla) (**D**). Barra= 50  $\mu$ m. Resultados de músculos control (círculos grises), y músculos 5 (cuadrados azules), 15 (triángulos verdes), 30 (triángulos naranjas), 60 (rombos amarillos), 90 (hexágonos rojos) días luego del aplastamiento del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (n.s.= diferencias no significativas), prueba de ANOVA de una vía.

durante la denervación, regeneración y a tiempos prolongados después de la regeneración de la UNM del músculo LAL (Figuras 12B, 12C, 12D).

Ha sido ampliamente descrito que la morfología general de los dominios postsinápticos se mantiene luego de la denervación del músculo (Magill y cols., 2007; Guzzini y cols., 2008; Zhao y cols., 2017). Para analizar con más detalle los dominios postsinápticos a tiempos prolongados luego de la reinervación, se cuantificaron parámetros morfométricos de los agregados del AChR (región específicamente marcada con la tinción de  $\alpha$ -BTX), como también la placa motora (regiones marcadas con la tinción de  $\alpha$ -BTX y regiones sin marca, de baja densidad de AChR, dentro del dominio postsináptico) a distintos tiempos luego del daño. Los resultados muestran que el área de los agregados del AChR disminuye significativamente y solo recupera valores similares a UNMs control tres meses luego del daño (Figura 13A). Por otra parte, el perímetro de los agregados del AChR también disminuye, recuperando valores similares a los de los músculos control luego de un mes (Figura 13B). Por su parte, el perímetro de la placa motora disminuye de forma transitoria y exhibe valores similares a los de músculos control 60 días luego de daño al nervio (Figura 13D), mientras el área de las placas motoras sólo presenta una disminución 5 días luego del daño, recuperando valores cercanos a los de músculos control tan pronto comienza la reinervación (Figura 13C). Otros parámetros postsinápticos, como el diámetro de la placa motora (Figura 13E) y la compactación postsináptica (Figura 13F), definida como el área de la placa motora ocupada por AChR (Jones y cols., 2016), disminuyen ligera y transitoriamente, exhibiendo valores cercanos a los de músculos control tres meses luego del

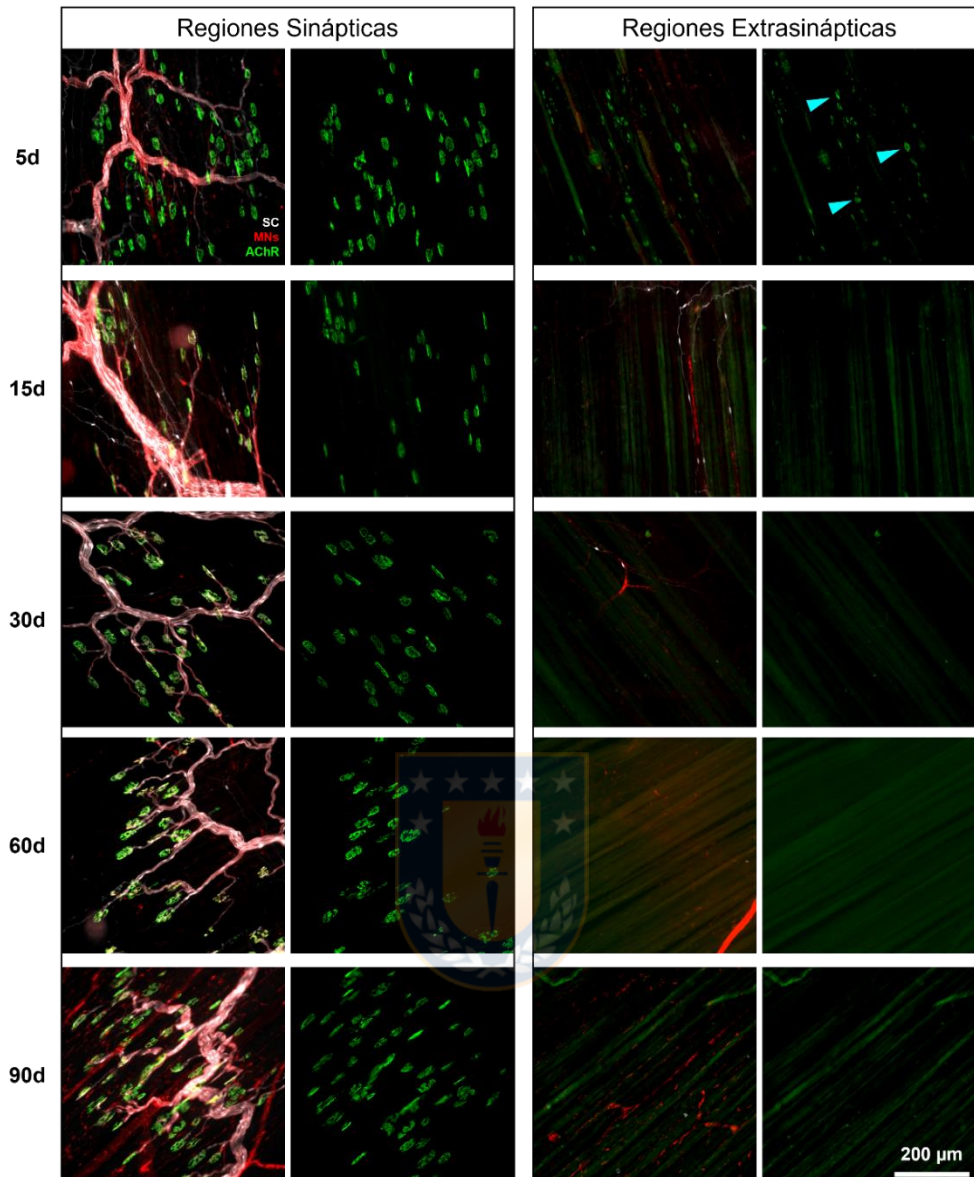


**Figura 13: Los parámetros morfológicos del dominio postsináptico no se recuperan inmediatamente luego de la reinervación.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 15 (triángulos verdes), 30 (triángulos naranjas), 60 (rombos amarillos), y 90 días (hexágonos rojos) por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL sin denervar (círculos grises). Se cuantificó al área el área (A), y el perímetro de los agregados del AChR (B), el área (C) y el perímetro de la placa motora (D), y el diámetro máximo de la placa motora (E). Con los datos de las áreas de los agregados del AChR y la placa motora, se calculó la compactación del dominio postsináptico (F). Las figuras en los extremos corresponden a esquemas del parámetro analizado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de una vía.

aplastamiento del nervio. Al igual que en el modelo degenerativo, durante la denervación por daño al nervio se observan agregados ectópicos del AChR (Figura 7); sin embargo, los agregados ectópicos observados en el modelo regenerativo (Figura 14, flechas de color cian) desaparecen en cuanto ocurre la reinervación y no se observan a los 15 días luego del daño al nervio (Figura 14). Estos resultados evidencian que la mayoría de los cambios morfológicos que ocurren en la UNM luego de la denervación son rescatados cuando ocurre la reinervación, aunque no de forma inmediata.

En el músculo *tibialis anterior*, la reinervación de los dominios postsinápticos de la UNM ocurre tres semanas luego del aplastamiento del nervio ciático (Magill y cols., 2007). Considerando que las distancias entre el sitio del daño al nervio y el músculo estudiado son distintas entre la evidencia previa y nuestro modelo de daño (nervio ciático y *tibialis anterior* en trabajos previos; nervio facial y LAL en este trabajo), y que la velocidad de regeneración axonal es la misma, es altamente probable que la reinervación de los dominios postsinápticos en nuestro modelo ocurra antes de tres semanas luego del daño al nervio, por lo que caracterizamos el período de tiempo en el que ocurre la reinervación en nuestro modelo de daño. Observamos que los dominios postsinápticos se encuentran denervados 5 días luego del daño, lo que se evidencia por la falta de marcaje del axón motor en aposición a los agregados del AChR. A los 7 días luego del aplastamiento del nervio, los axones regenerados contactan al músculo, mientras que a los 9 días luego del daño, los axones regenerados cubren parcialmente a los agregados del AChR. Finalmente, a los 11 días luego del daño, se observa que los axones motores inervan a los dominios postsinápticos (Figura 15A). Al cuantificar el porcentaje de



**Figura 14: Los agregados del AChR ectópicos desaparecen cuando ocurre la reinervación de los dominios postsinápticos.**

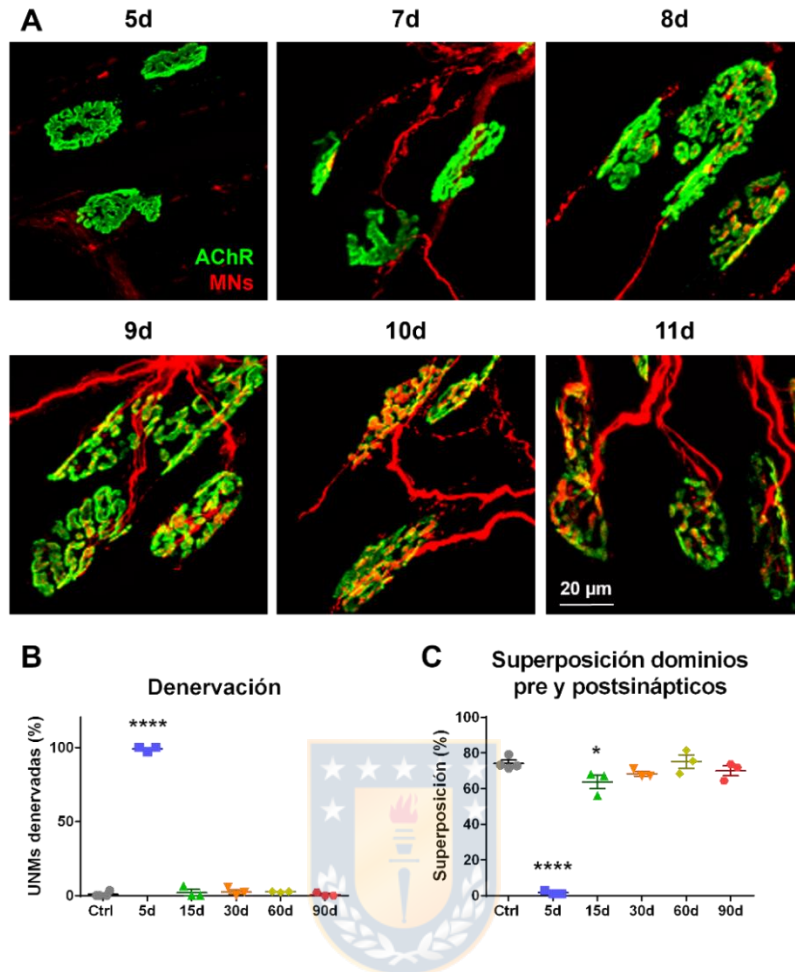
Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron identificadas mediante el marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde) por microscopía de epifluorescencia. Imágenes representativas de regiones sinápticas (columna de la izquierda) y extrasinápticas (columna de la derecha) de músculos LAL 5, 15, 30, 60 y 90 días luego de daño al nervio. Se observan agregados ectópicos (cabezas de flechas cian). En los paneles de la izquierda de cada columna se observa solo el canal de los AChR. Barra= 200  $\mu$ m.

UNMs denervadas (dominios sinápticos sin contacto de un axón motor), corroboramos la denervación total 5 días luego de daño y la reinervación completa del músculo LAL a partir de los 15 días luego del daño (Figura 15B). Por otra parte, al cuantificar la superposición entre dominios pre- y postsinápticos, se observó una recuperación de porcentajes similares a los de músculos control un mes luego del daño (Figura 15B). Estos resultados muestran que, en el músculo LAL, la reinervación de la sinapsis neuromuscular comienza a ocurrir alrededor de dos semanas y se completa alrededor de cuatro semanas posteriores al daño.

#### **5.1.5. La UNM presenta adaptaciones morfológicas luego de la reinervación**

Se ha descrito que, posterior a la denervación, los AChRs disminuyen su tiempo de estadía en la membrana, disminuyendo con ello la estabilidad del dominio postsináptico (Bruneau y Akaaboune, 2006; Haddix y cols., 2018). Con el fin de estudiar la estabilidad de los dominios postsinápticos del músculo LAL denervado, se realizó el ensayo de doble  $\alpha$ -BTX (Pérez y cols., 2019). Para ello, los AChR se marcaron *in vivo* con una dosis no saturante de  $\alpha$ -BTX conjugada a un primer fluoróforo (AlexaFluor 488, verde, BTX-1) y después de la disección, los músculos se incubaron con  $\alpha$ -BTX conjugada a un segundo fluoróforo (AlexaFluor 555, roja, BTX-2). Utilizando microscopía confocal, los agregados de AChR se clasificaron como "estables" si las intensidades de fluorescencia de la BTX-1 y la BTX-2 eran similares, o como "inestables" si la intensidad de fluorescencia de la BTX-2 era significativamente más alta. Teniendo en cuenta que después de la denervación



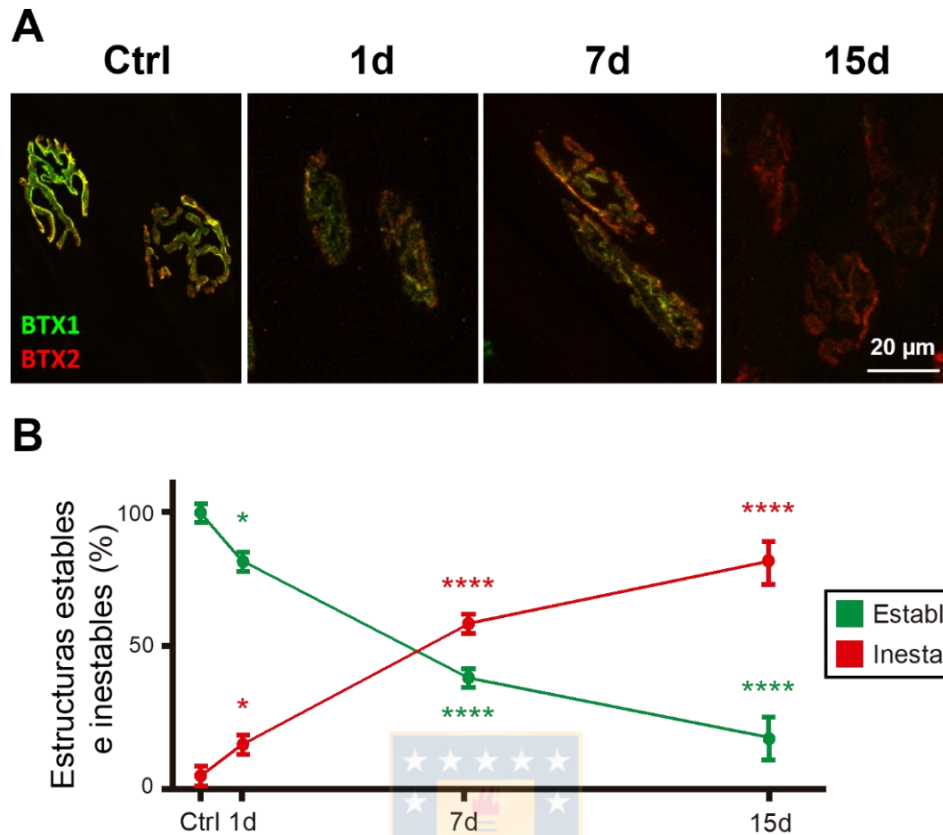


**Figura 15: En el músculo LAL la reinervación comienza una semana luego del aplastamiento del nervio.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron identificadas mediante el marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), y de los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde) por microscopía confocal. **(A)** Imágenes representativas de las UNMs de músculos LAL 5, 7, 8, 9, 10 y 11 días luego del daño al nervio. Barra= 20  $\mu$ m. Se cuantificó el número de dominios postsinápticos sin contacto de axones motores **(B)** y se calculó la superposición entre los aparatos pre y postsinápticos **(C)** 5 (cuadrados azules), 15 (triángulos verdes), 30 (triángulos naranjas), 60 (rombos amarillos), y 90 días (hexágonos rojos) luego del aplastamiento del nervio. Como control se utilizaron músculos LAL sin denervar (círculos grises). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de una vía.

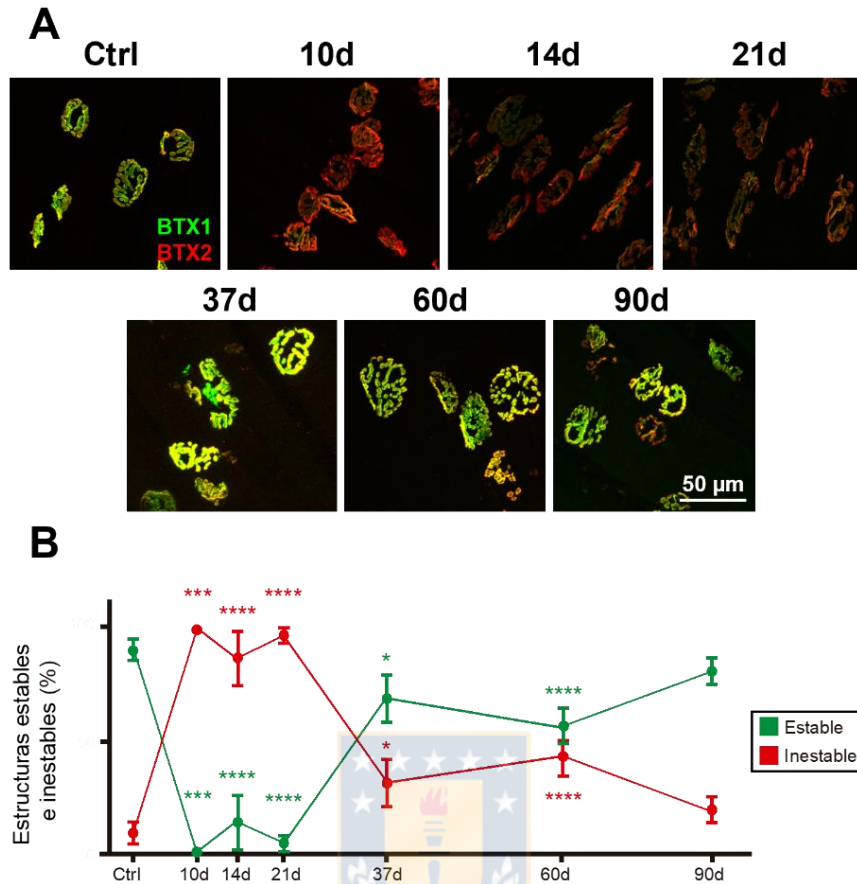
crónica los dominios postsinápticos pierden su morfología, lo que hace complejo distinguirlos (Figura 6), y que los AChR ectópicos alcanzan una proporción significativamente alta un mes después de la resección del nervio (Figura 7), realizamos estos experimentos en una ventana de tiempo que abarca hasta 15 días después de la resección del nervio (Figura 16). Los resultados muestran que en los músculos control, la mayoría de las estructuras postsinápticas se clasificaron como estables (Figura 16B). La proporción de estructuras postsinápticas estables disminuyó significativamente después de la denervación, de forma concomitante con un aumento de estructuras inestables (Figura 16B). De forma interesante, en el modelo regenerativo se observa que la proporción de dominios postsinápticos inestables aumenta de manera significativa entre 10 y 21 días después del daño al nervio (Figura 17). Si bien el porcentaje de dominios estables tiende a recuperarse 37 días después del aplastamiento del nervio, se observa un segundo incremento significativo en la proporción de dominios inestables 60 días luego del daño. Finalmente, a los 90 días, el porcentaje de estructuras inestables y estables es similar a la proporción de los músculos control sin lesión (Figura 17). Nuestros resultados revelan que la estabilidad postsináptica disminuye de forma significativa por la denervación crónica del músculo LAL. De forma interesante, la estabilidad postsináptica de la UNM solo se recupera tres meses después del daño.

Se ha descrito que la organización de los agregados del AChR se ve alterada en condiciones que afectan la integridad y función de la UNM (Kang y cols., 2014). Para analizar la organización de los dominios postsinápticos de la UNM de músculos LAL luego del daño al nervio, los dominios postsinápticos fueron clasificados en las



**Figura 16: La estabilidad de los AChR decae progresivamente y de forma inmediata luego de la resección del nervio.**

Músculos LAL fueron denervados por resección del nervio facial y la estabilidad del dominio postsináptico fue analizado mediante ensayo de doble  $\alpha$ -BTX, marcando inicialmente con  $\alpha$ -BTX conjugada con AlexaFluor 488 (verde, BTX-1), y después de siete días con  $\alpha$ -BTX conjugada con AlexaFluor 555 (rojo, BTX-2). **(A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de los dominios postsinápticos marcados con ambas  $\alpha$ -BTX, de músculos sin daño (Ctrl) y músculos 1, 7 y 15 días luego de la resección del nervio. Barra= 20  $\mu$ m. **(B)** Según la relación intensidad de fluorescencia de ambas BTXs los dominios postsinápticos fueron clasificados como estables (línea verde) o inestables (rojo). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) prueba de Mann-Whitney. Los asteriscos verdes y rojos muestran diferencias significativas entre estructuras estables e inestables, respectivamente, en comparación con sus respectivos controles.



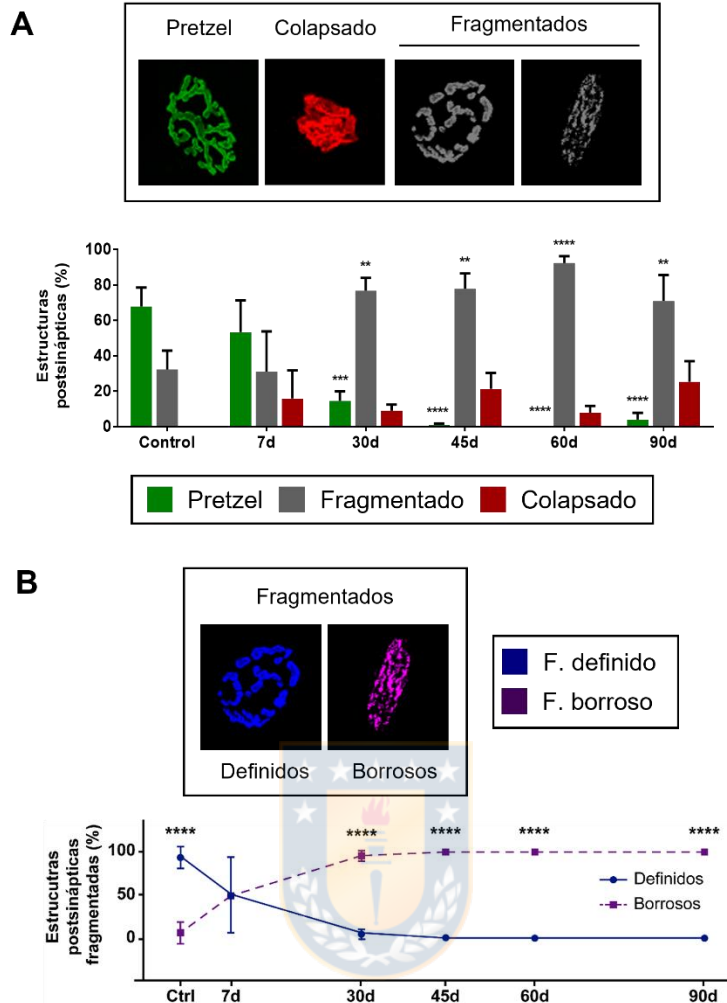
**Figura 17: La estabilidad de los AChR no se recupera de forma inmediata con la reinervación de los dominios postsinápticos.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y la estabilidad del dominio postsináptico fue analizado mediante ensayo de doble  $\alpha$ -BTX, marcando inicialmente con  $\alpha$ -BTX-AlexaFluor 488 (verde, BTX-1), y después de siete días con  $\alpha$ -BTX-AlexaFluor 555 (rojo, BTX-2). **(A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de los dominios postsinápticos marcados con ambas  $\alpha$ -BTX, de músculos sin daño (Ctrl) y músculos 10, 14, 21, 37, 60 y 90 días luego de el aplastamiento del nervio. Barra= 50  $\mu$ m. **(B)** Según la relación intensidad de fluorescencia de ambas BTXs los dominios postsinápticos fueron clasificados como estables (línea verde) o inestables (rojo). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) prueba de Mann-Whitney. Los asteriscos verdes y rojos muestran diferencias significativas entre estructuras estables e inestables, respectivamente, en comparación con sus respectivos controles.

tres morfologías más abundantes, las que corresponden a: pretzel maduro (morfología compleja con formas altamente ramificadas, en verde), estructuras colapsadas (dominios postsinápticos “encogidos”, sin ramificaciones visibles, en rojo) y estructuras fragmentadas (aparatos postsinápticos con 6 o más agregados distintivos de AChR o “fragmentos”, en gris) (Figura 18A).

Una semana después de la resección del nervio comienzan a observarse estructuras colapsadas (barras rojas), de forma concomitante con una disminución significativa de las estructuras tipo pretzel (barras verdes), resultando en la desaparición de estas últimas 45 días luego de la resección del nervio (Figura 18A). Luego de 30 días, la mayor proporción de dominios postsinápticos corresponden a estructuras fragmentadas (barras grises) (Figura 18A). De manera interesante, el análisis detallado de las estructuras fragmentadas permitió establecer dos subtipos de fragmentación, que de acuerdo con evidencia previa (Tremblay y cols., 2017) fueron clasificados como: *i) fragmentados definidos*, que exhiben fragmentos discretos (> 6), con bordes definidos (Figura 18B, en azul) y *ii) fragmentados borrosos*, que presentan múltiples fragmentos pequeños, con bordes poco definidos (que dificultan la cuantificación del número total de fragmentos) (Figura 18B, en morado). En el modelo de denervación irreversible, se observó una prevalencia significativa de morfologías postsinápticas fragmentadas borrosas desde 7 días luego del daño, donde alcanzaron cerca del 50%, mientras que a partir de 30 días luego del daño al nervio representaron el 95,75%  $\pm$  5,35 del total de morfologías postsinápticas fragmentadas (Figura 18B).

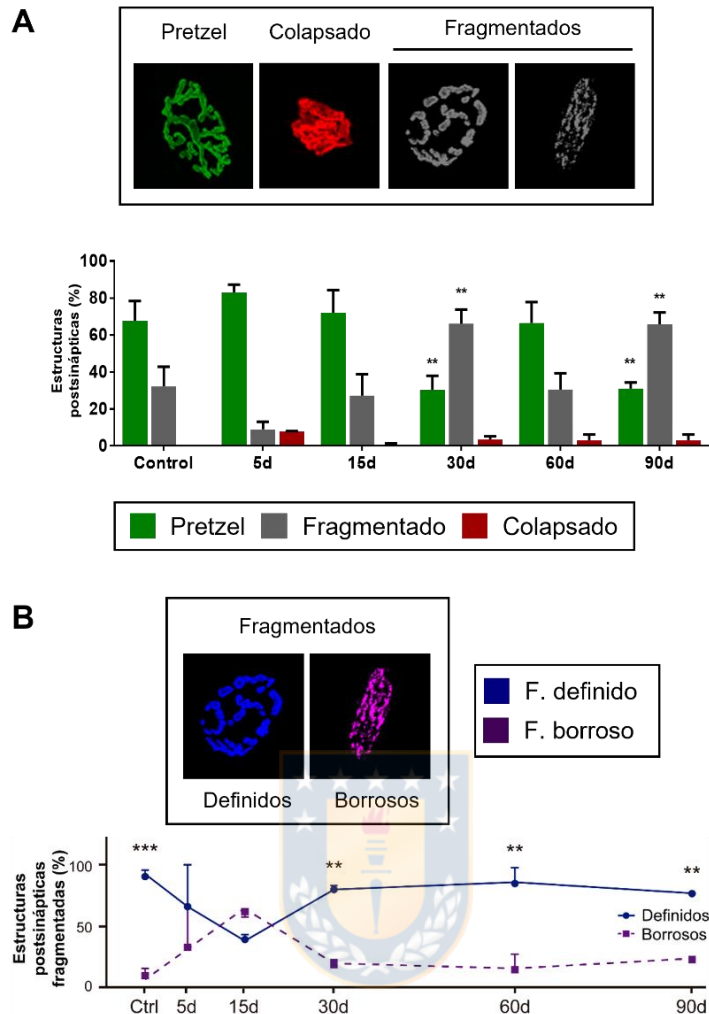
Para analizar la organización de los dominios postsinápticos de la UNM de músculos LAL luego del aplastamiento del nervio, los dominios postsinápticos



**Figura 18: Los dominios postsinápticos denervados crónicamente exhiben una fragmentación borrosa.**

Músculos LAL fueron denervados por resección del nervio facial y los dominios postsinápticos fueron analizados después de 7, 30, 45, 60 y 90 días. Como control se utilizaron músculos LAL sin denervar. **(A)** Las morfologías de los dominios postsinápticos se clasificaron en: tipo pretzel (en verde; primer panel), morfología colapsada (en rojo; segundo panel) y morfologías fragmentadas (en gris; paneles de la izquierda). **(B)** Las morfologías fragmentadas se subclasificaron en morfologías fragmentadas definidas (en azul; panel de la izquierda) (círculos azules; línea azul continua) y borrosas (en morado; panel de la derecha) (cuadrados morados; línea morada punteada). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ), prueba de ANOVA de dos vías.

fueron clasificados en: pretzel maduro (en verde), estructuras colapsadas (en rojo) y estructuras fragmentadas (en gris) (Figura 19A). En el paradigma experimental regenerativo, la morfología tipo pretzel maduro exhibe un comportamiento bifásico, disminuyendo su proporción de forma significativa a los 30 y 90 días luego del aplastamiento al nervio, exhibiendo una recuperación transitoria a los dos meses luego del daño (Figura 19A, barras verdes). Estos cambios se traducen en un comportamiento bifásico inverso de las estructuras fragmentadas (Figura 19A, barras grises). Notablemente, durante la reinervación de la UNMs (15 días luego del aplastamiento del nervio), existe una proporción similar entre estructuras fragmentadas definidas y borrosas; no obstante, se observa que, de forma contraria a lo observado en el modelo degenerativo, la proporción de estructuras fragmentadas definidas se vuelve significativamente mayor a tiempos posteriores de la reinervación del músculo LAL (Figura 19B). Para complementar la idea de que estos distintos tipos de fragmentación provienen de la degeneración y reinervación de la UNM, se analizó la estabilidad postsináptica en ambos tipos de estructuras fragmentadas. Se observa que las estructuras fragmentadas borrosas en ambos modelos son altamente inestables, dado por la mayor intensidad de fluorescencia de la tinción con BTX-2 reflejada en una mayor proporción de la relación de intensidad  $BTX2/BTX1$  (Figura 20A y B, gráficos de la derecha), mientras que las estructuras fragmentadas definidas de ambos modelos pueden ser clasificadas como estables, ya que se observa que la relación de intensidad  $BTX2/BTX1$  es cercana a 1 (Figura 20). Estos estudios revelan la existencia de distintos tipos de fragmentación de los dominios postsinápticos de la UNM, cuya proporción relativa



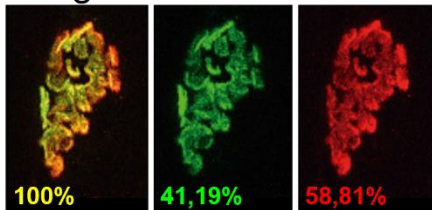
**Figura 19: A** tiempos prolongados luego de la reinervación los dominios postsinápticos tienen morfologías fragmentadas definidas.

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y los dominios postsinápticos fueron analizados después de 5, 15, 30, 60 y 90 días. Como control se utilizaron músculos LAL sin denervar. **(A)** Los dominios postsinápticos fueron clasificados en: tipo pretzel (en verde; primer panel), morfología colapsada (en rojo; segundo panel) y morfologías fragmentadas (en gris; paneles de la izquierda). **(B)** Las morfologías fragmentadas se subclasificaron en morfologías fragmentadas definidas (en azul; panel de la izquierda) (círculos azules; línea azul continua) y borrosas (en morado; panel de la derecha) (cuadrados morados; línea morada punteada). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), prueba de ANOVA de dos vías.

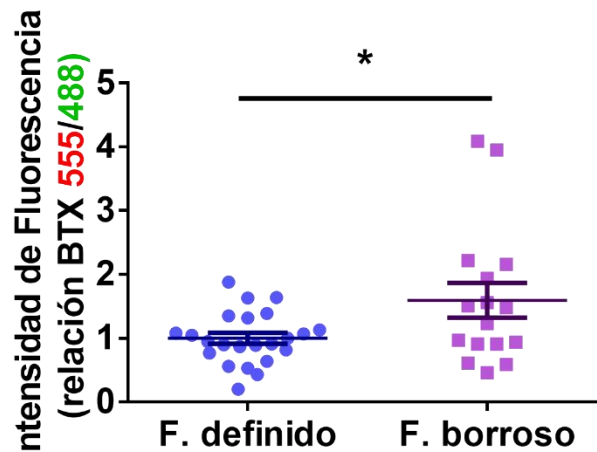
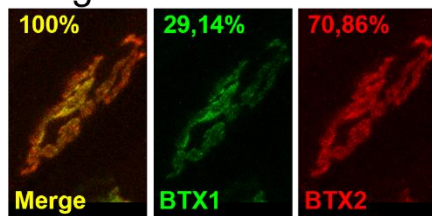


## A Modelo degenerativo – resección del nervio

Fragmentados definidos

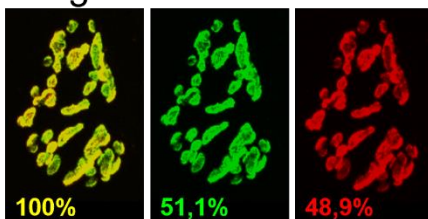


Fragmentados borrosos

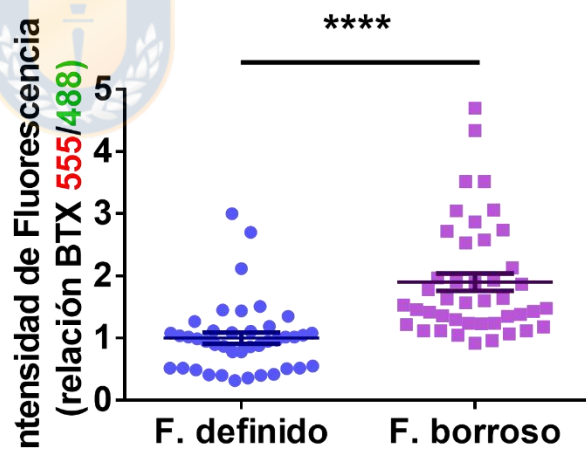
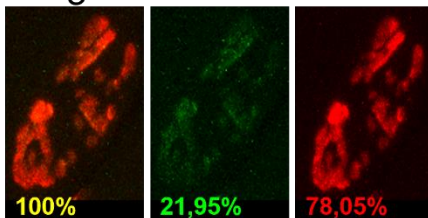


## B Modelo regenerativo – aplastamiento del nervio

Fragmentados definidos



Fragmentados borrosos

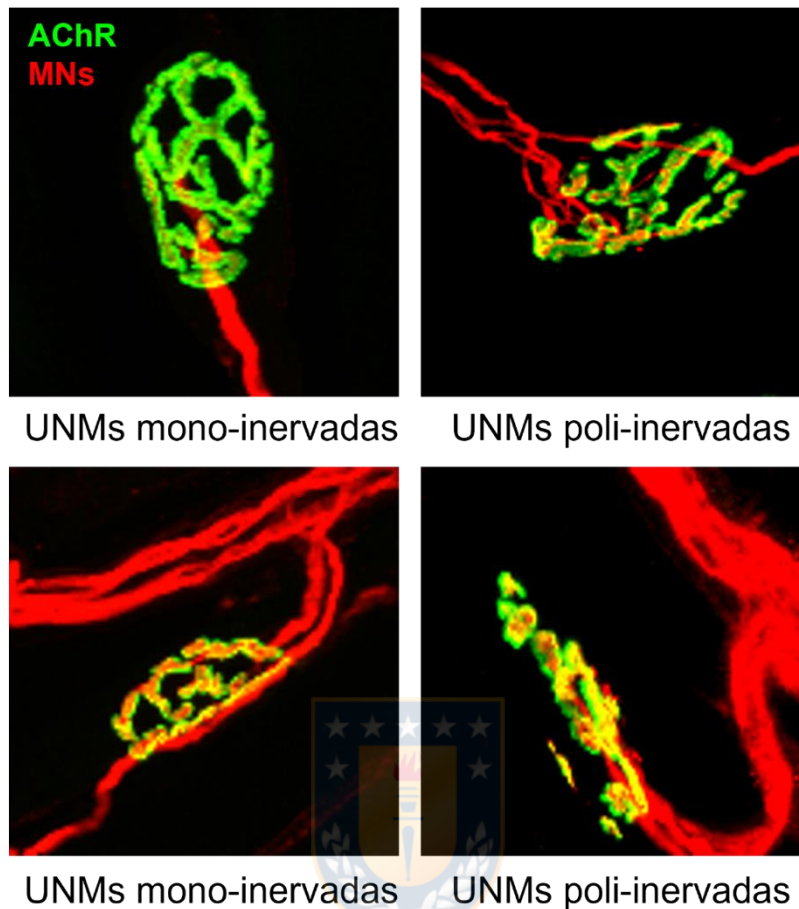


**Figura 20: Las estructuras postsinápticas fragmentadas definidas son estructuras estables y las estructuras postsinápticas fragmentadas borrosas son estructuras inestables.**

La estabilidad de los dominios postsinápticos fragmentados fue analizada mediante ensayo de doble  $\alpha$ -BTX, marcando inicialmente con  $\alpha$ -BTX-AlexaFluor 488 (verde, BTX-1), y después de siete días con  $\alpha$ -BTX-AlexaFluor 555 (rojo, BTX-2). Imágenes representativas de microscopía confocal de los dominios postsinápticos fragmentados definidos y borrosos de músculos luego de la resección **(A)** o del aplastamiento **(B)** del nervio. Se muestran canales de ambas BTXs juntas (primeros paneles), del canal de la BTX1 por separado (segundos paneles) y canal de la BTX2 por separado (terceros paneles). Barra= 50  $\mu$ m. Se cuantificó la relación entre la intensidad de fluorescencia de la BTX2 con la BTX1 (BTX 555/488) de los dominios postsinápticos clasificados como fragmentados definidos (círculos azules) y fragmentados borrosos (cuadrados morados) de músculos luego de la resección **(A)** o del aplastamiento **(B)** del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de n: 16-43 UNMs analizadas por tipo de morfología fragmentada y tipo de daño. (\*p < 0,05; \*\*\*\*p < 0,0001), prueba de Mann-Whitney.

puede correlacionarse con el potencial de reinervación y recuperación funcional del músculo.

Trabajos anteriores en músculos de las extremidades han mostrado la presencia de UNMs poli-inervadas durante la reinervación temprana (Magill y cols., 2007). Para evaluar esta posibilidad en la regeneración temprana de la UNM en el músculo LAL, se construyeron proyecciones 3D de los planos z obtenidos mediante microscopía confocal con el fin de visualizar claramente los axones que contactan a un dominio postsináptico. De esta forma, se observaron: UNMs mono-inervadas; UNMs poli-inervadas; UNMs mono-inervadas, en las que el dominio postsináptico parece ser contactado por dos axones al verlo en 2D pero que en la proyección 3D se identifica solo un axón; y UNMs poli-inervadas, en las que el dominio postsináptico parece ser contactado por un solo axón en 2D pero que la proyección 3D revela más de un axón (Figura 21). De forma similar a investigaciones anteriores, se observa que durante la reinervación temprana del músculo LAL existe un aumento significativo en la proporción de dominios postsinápticos poli-inervados comparados con el control (Control  $4,64 \pm 3,55\%$ ; regenerado a 15 días,  $34,30 \pm 13,01\%$ ;  $***p < 0,001$ , prueba ANOVA de una vía). De manera interesante, un porcentaje similar de UNMs poli-inervadas continúa observándose 3 meses luego del aplastamiento del nervio ( $36,25 \pm 1,88\%$ ) (Figura 22B). Al analizar la morfología de los dominios postsinápticos poli-inervados, se observa que inicialmente la mayor proporción de dominios poli-inervados presentan morfología tipo pretzel (Figura 22C, barras verdes), lo que cambia a un mayor porcentaje de dominios poli-inervados fragmentados 30 y 90 días luego del daño al nervio (Figura 22C, barras



**Figura 21: El análisis de las UNMs mediante proyecciones 3D permite detectar el número de axones motores que inervan un dominio postsináptico.**

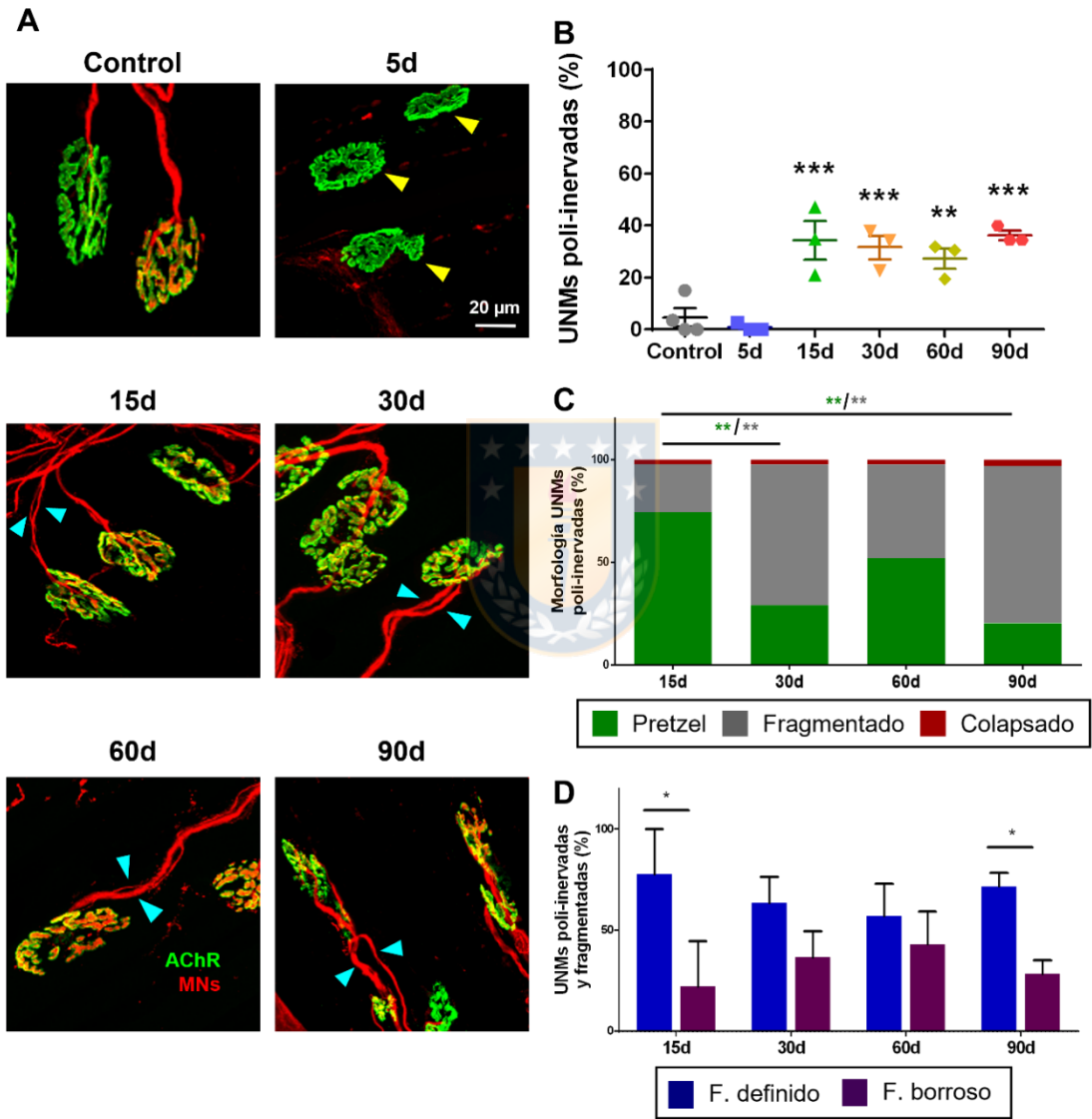
Mediante la construcción de proyecciones 3D se pudieron detectar: UNMs mono-inervadas, con un axón contactando los dominios postsinápticos (panel superior izquierdo); UNMs poli-inervadas, con más de un axón contactando el dominio postsináptico (panel superior derecho); UNMs mono-inervadas que parecen inervadas por dos axones motores en la imagen en 2D (panel inferior izquierdo); y UNMs poli-inervadas que parecen inervadas por un solo axón motor en la imagen 2D (panel inferior derecho).

grises). De los dominios postsinápticos poli-inervados y con morfología fragmentada, la mayor diferencia estadísticamente significativa corresponde a dominios fragmentados definidos tanto a 15 como a 90 días luego del daño, observándose una tendencia a mayor proporción de fragmentados definidos durante los otros tiempos analizados (Figura 22D, barras azules).

En conjunto, nuestros resultados indican que algunos parámetros morfométricos de la UNM, como el área de los agregados del AChR, el área del terminal nervioso, el diámetro de la placa motora y la estabilidad postsináptica, se alteran inmediatamente luego de la denervación y permanecen alterados hasta después de la reinervación de la UNM. Además, otros parámetros morfométricos, incluidos la morfología de las estructuras postsinápticas y la poli-inervación de los dominios postsinápticos, parecen permanecer irreversiblemente alterados, lo que sugiere que el daño al nervio conduce a una respuesta adaptativa de la UNM luego del daño.

#### **5.1.6. Recuperación funcional de la transmisión sináptica neuromuscular después de la reinervación de la placa terminal.**

Para examinar si los cambios observados tanto en la morfología como en la estabilidad de la UNM después de la denervación y reinervación tienen impacto en la transmisión sináptica, se realizó el registro intracelular de fibras musculares en preparados *ex vivo* de músculos LAL a distintos tiempos luego del aplastamiento del nervio.

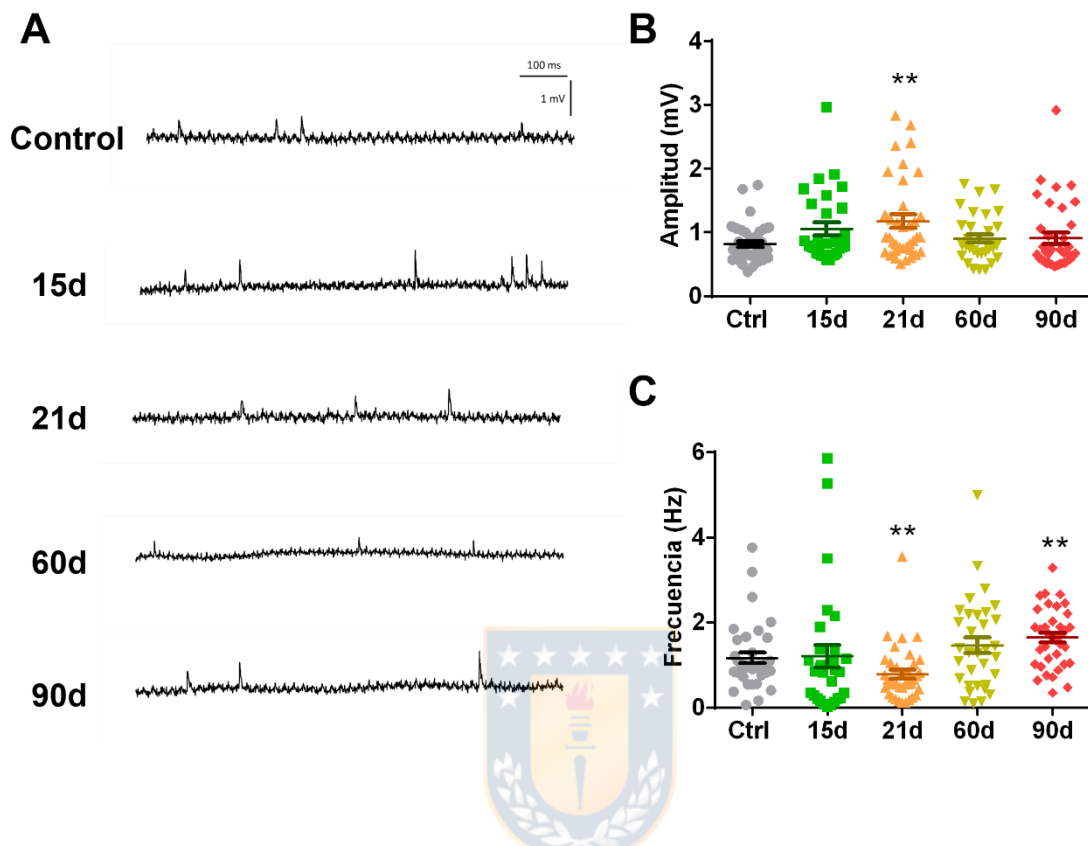


**Figura 22: La poli-inervación se mantiene luego de la reinervación de la UNM en el músculo LAL.**

Músculos LAL fueron denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron identificadas mediante el marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), y de los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde) por microscopía confocal. **(A)** Imágenes representativas de las UNMs de músculos LAL control y músculos 5, 15, 30, 60 y 90 días luego del daño al nervio. Se observan dominios postsinápticos denervados (cabezas de flechas amarillas) y dominios postsinápticos poli-inervados (cabezas de flechas cian). Barra= 20  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de las UNMs poli-inervadas en músculos LAL de ratones control (círculos grises) y músculos 5 (cuadrados azules), 15 (triángulos verdes), 30 (triángulos naranjas), 60 (rombos amarillos) y 90 días (hexágonos rojos) luego del aplastamiento del nervio. **(C)** De las UNMs poli-inervadas, se analizó el tipo de morfología que presentaban, tipo pretzel (verde), fragmentadas (gris) y colapsadas (rojo). **(D)** Se analizó el tipo de morfología fragmentada de las UNMs poli-inervadas, estructuras postsinápticas fragmentadas definidas (barras azules) y fragmentadas borrosas (barras púrpuras). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) prueba ANOVA de una vía (B) y ANOVA de dos vías (C, D).

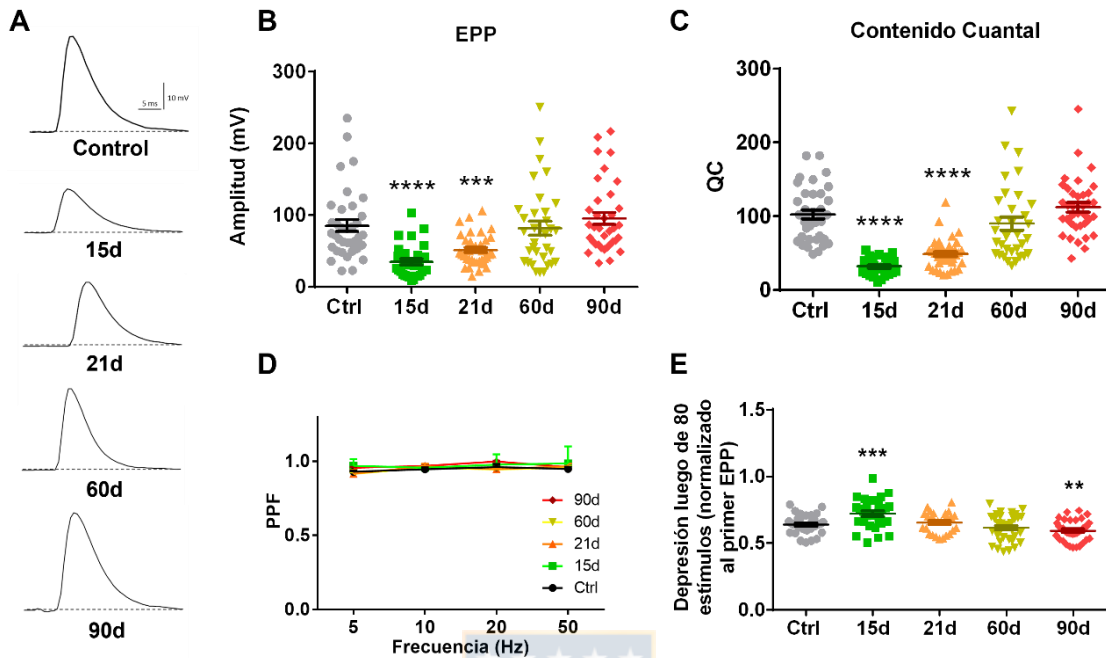
Se analizaron los potenciales de placa en miniatura (mEPP) y los potenciales de placa evocados (EPP); con estos resultados se calculó el tamaño del contenido cuantal (QC, el número de cuantas liberadas por potencial de acción) por el método directo. Además, se analizaron los posibles cambios en la plasticidad a corto plazo (facilitación por pulsos pareados, PPF, y depresión) durante estímulos repetitivos. La amplitud media de los potenciales de placa espontáneos (mEPP) aumentó 21 días después de la lesión (Figura 23A, 23B), mientras la frecuencia de los mEPP disminuyó a los 21 días y aumentó a los 90 días (Figura 23A, 23C). Por otra parte, la amplitud de los potenciales de placa evocados (EPP) se redujo significativamente 15 ( $34,64 \pm 4,37$  mV; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , prueba de Mann-Whitney) y 21 días ( $51,23 \pm 3,53$  mV; \*\*\* $p < 0,001$ , prueba de Mann-Whitney) después del aplastamiento del nervio, en comparación con los músculos control ( $85,21 \pm 8,12$  mV) (Figura 24A, 24B). La amplitud de los EPP evocados recuperó valores similares a músculos control solo dos meses después de la lesión (Figura 24A, 24B). Estos resultados correlacionaron con nuestras observaciones cualitativas de la recuperación del movimiento del pabellón auricular de los animales luego del daño. De manera similar, la cuantificación de los cuantos liberados por potencial de acción (contenido cuantal) mostró una disminución 15 y 21 días después del daño al nervio, recuperando valores similares a músculos control 60 días después de la lesión nerviosa (Figura 21C). No se observaron diferencias en la PPF a frecuencias entre 5 y 50 Hz entre músculos control y músculos analizados a los 15, 21, 60 y 90 días después del daño al nervio (Figura 24D), sugiriendo que no existen diferencias en las probabilidades de liberación presináptica. Por otra parte, la depresión sináptica, relaciona la amplitud promedio de los primeros 10 EPP con la amplitud promedio de





**Figura 23: No existen cambios significativos en los parámetros de los mEPP luego de la reinervación de la UNM en el músculo LAL.**

Se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares de preparaciones *ex vivo* de músculos LAL control (círculos grises) y de músculos LAL 15 (cuadrados verdes), 21 (triángulos naranjos), 60 (triángulos amarillos) y 90 días (rombos rojos) después del aplastamiento del nervio. **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los mEPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y la frecuencia **(C)** de los mEPP. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (\*\* $p < 0,01$ ) prueba de Mann-Whitney.



**Figura 24: La transmisión sináptica de la UNM no se recupera de forma inmediata con la reinervación de los dominios postsinápticos.**

Se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares de preparaciones *ex vivo* de músculos LAL control (círculos grises) y de músculos LAL 15 (cuadrados verdes), 21 (triángulos naranjos), 60 (triángulos amarillos) y 90 días (rombos rojos) después del aplastamiento del nervio. **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los EPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y se calculó el contenido cuantál **(C)** de los EPP. Se analizó la facilitación por pulsos pareados **(D)** de estímulos a frecuencias de 5, 10, 20 y 50 Hz. **(E)** Se cuantificó la depresión sináptica luego de 80 estímulos a 50 Hz. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) prueba de Mann-Whitney (B, C, E) y ANOVA de dos vías (D).

los últimos 10 EPP, aumentó levemente poco después de la reinervación de la UNM (Figura 24E). En resumen, nuestros hallazgos revelan que, aunque los modelos degenerativo y regenerativo de daño al nervio resultan en alteraciones morfológicas y funcionales de la UNM, algunos de ellos se recuperan de manera eficiente después de la reinervación. Otros parámetros, que incluyen el área de agregados de AChR, el área del terminal nervioso, el diámetro de la placa terminal y la estabilidad postsináptica, solo se recuperan 90 días después de la lesión nerviosa. Es importante destacar que la poli-inervación y la fragmentación de la UNM permanecieron alteradas por largos períodos de tiempo posteriores a la reinervación. A pesar de las consecuencias a largo plazo observadas después de la reinervación a corto plazo, la transmisión sináptica de la UNM de músculos reinervados se recupera a niveles comparables a los músculos control 60 días después de la lesión por aplastamiento del nervio, lo que sugiere que las alteraciones morfológicas observadas en la UNM de músculos reinervados corresponden a mecanismos adaptativos del proceso regenerativo.

En su conjunto los resultados descritos permitieron establecer las alteraciones morfológicas de la UNM del músculo LAL usando un modelo de daño por aplastamiento del nervio. Adicionalmente, se describió el tiempo en el que ocurren los cambios morfológicos, así como también el tiempo en el que ocurre la recuperación funcional de la UNM. Considerando estos resultados, a continuación, se analizaron las consecuencias de la activación e inhibición de la vía de señalización Wnt en la regeneración de la UNM del músculo LAL.

## **5.2. Estudiar el efecto de la activación e inhibición farmacológica de la señalización Wnt canónica sobre la morfología de los tres componentes celulares y la función durante la regeneración de la UNM del músculo LAL**

### **5.2.1. La vía de señalización Wnt canónica se activa con *Andrographolide***

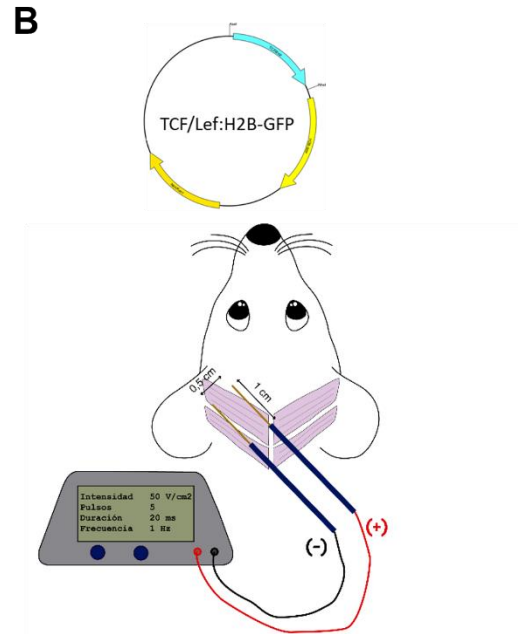
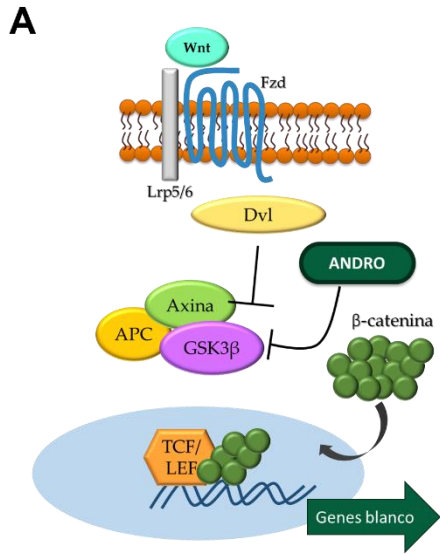
En trabajos previos se observó que la vía de señalización Wnt canónica se activa en los núcleos musculares subsinápticos luego de la denervación del músculo (Kurimoto y cols., 2015). Sin embargo, se desconoce si la activación de la vía Wnt canónica regula positiva o negativamente la regeneración de la UNM. Para determinar los efectos de la vía de señalización Wnt canónica sobre la regeneración de la UNM, se activó la vía de señalización durante la regeneración de la UNM del músculo LAL usando una aproximación farmacológica, y se analizó la recuperación morfológica y funcional luego del aplastamiento del nervio facial.

La vía Wnt canónica se activó usando el fármaco *Andrographolide* (ANDRO), que actúa como un inhibidor competitivo de ATP de la quinasa Gsk3 $\beta$ , induciendo la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma, su translocación al núcleo y la interacción con los factores de transcripción TCF/Lef lo que activa la transcripción de genes blanco de la vía Wnt canónica (Tapia-Rojas y cols., 2015) (Figura 25A). Para comprobar la activación de la vía Wnt canónica se utilizó el vector reportero TCF/Lef:H2B-GFP, que comanda la expresión nuclear de la proteína de fusión H2B-GFP bajo el control de un promotor que contiene sitios de unión para los factores TCF/Lef (Ferrer-Vaquero y cols., 2010) (Figura 25B). El vector reportero se incorporó

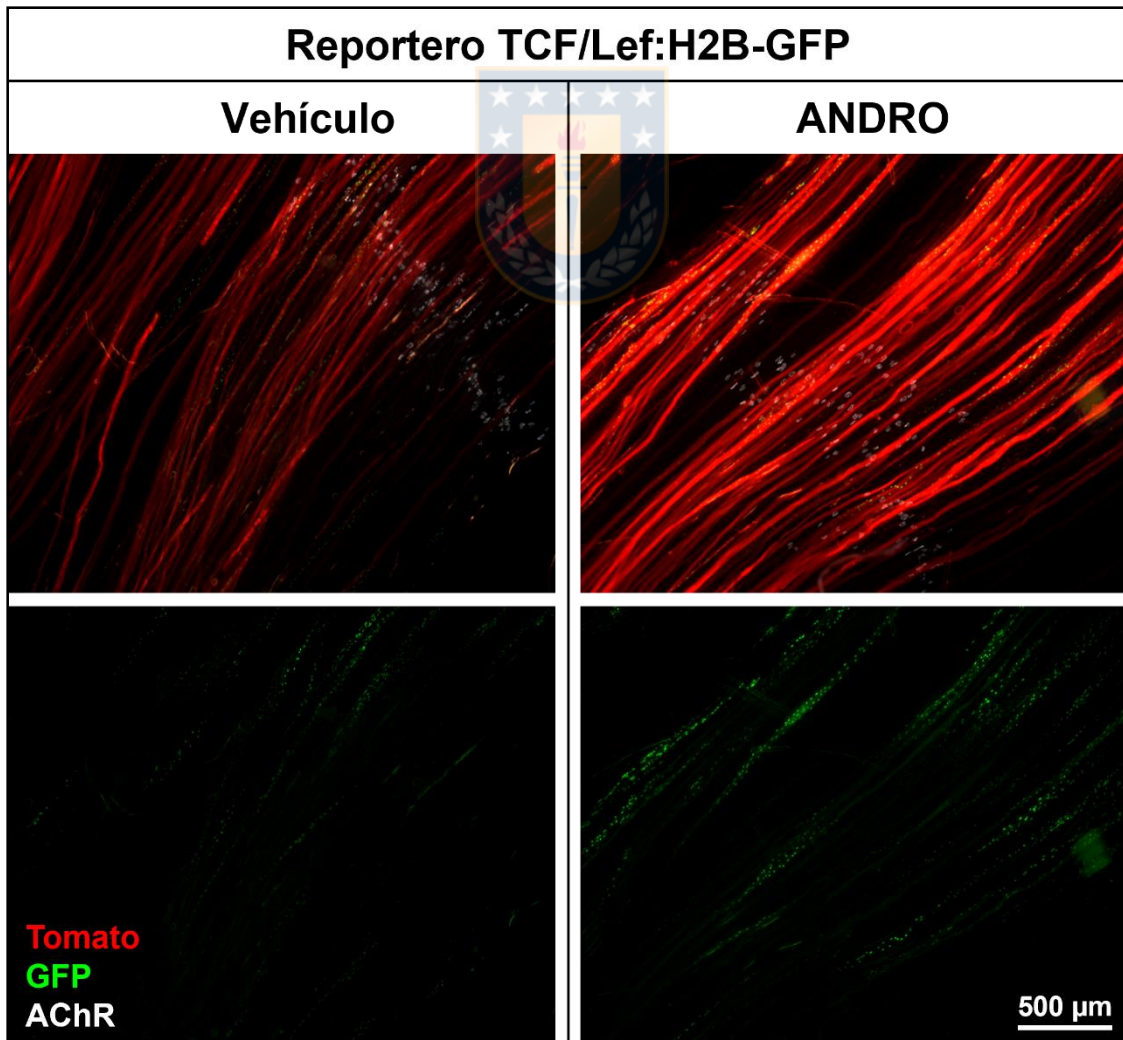
al músculo LAL mediante la transfección por electroporación *in vivo* utilizando un protocolo estándar de 5 pulsos con una duración de 20 ms cada uno a una frecuencia de 1 Hz y ajustando el campo eléctrico a 50 V/cm<sup>2</sup> (Ojeda y cols., 2020) (ver materiales y métodos, sección 4.4) (Figura 25B). Utilizando una concentración de 4 µg/µL de vector reportero TCF/Lef:H2B-GFP, se co-electroporó con 4 µg/µL del vector pCMV/tdTomato que codifica para la proteína fluorescente roja tdTomato. Una semana luego de la electroporación, los ratones fueron sometidos a inyecciones subcutáneas con solución vehículo o con ANDRO durante 2 semanas, 3 dosis a la semana. Los resultados muestran una alta proporción de fibras musculares que expresan la proteína tdTomato, evidenciando una alta eficiencia de electroporación (Figura 25C, paneles superiores). En el músculo LAL tratado con ANDRO existe un aumento en el número de núcleos positivos para GFP en comparación con los músculos tratados con vehículo (Figura 25C, paneles inferiores). Los resultados indican que el tratamiento con ANDRO es suficiente para activar la vía de señalización canónica.

### **5.2.2. La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM retrasa la reinervación sin alterar su morfología**

A continuación, se activó la vía de señalización Wnt canónica durante la regeneración de la UNM, mediante la siguiente aproximación experimental: dosis de ANDRO o de vehículo (DMSO) a una concentración de 1 mg/kg (de ratón) disueltas en solución fisiológica (suero fisiológico) fueron incorporadas mediante



**C**



**Figura 25: ANDRO activa la vía Wnt canónica, medido por el reportero TCF/Lef:H2B-GFP.**

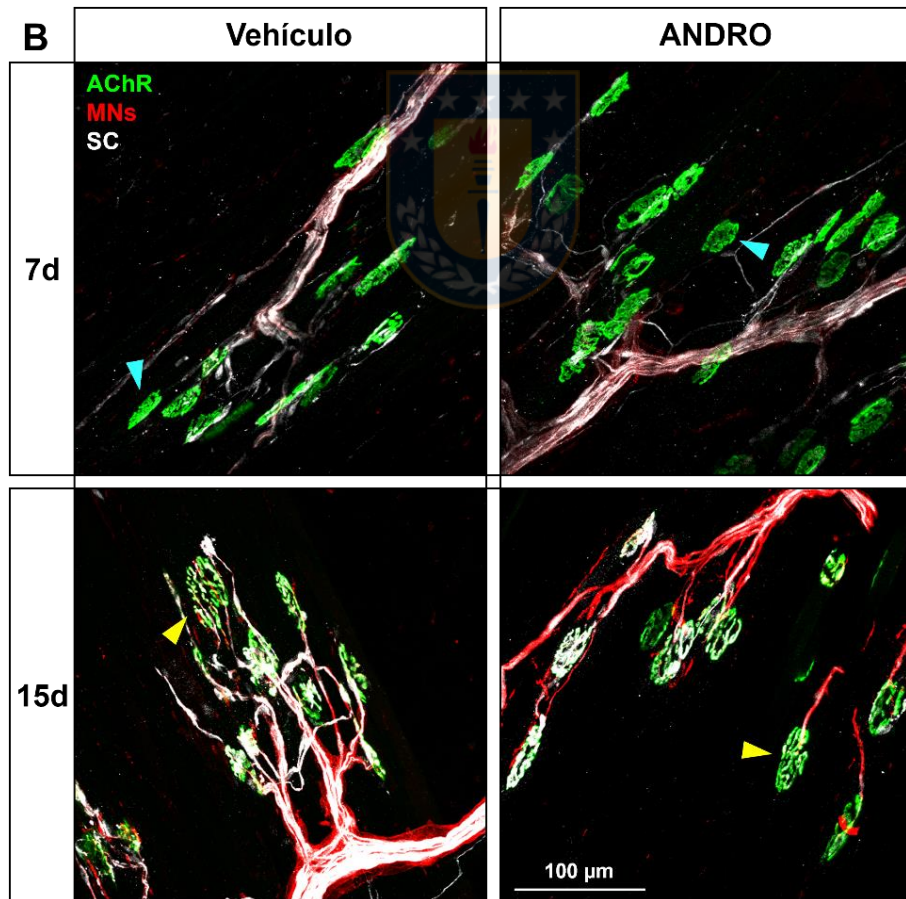
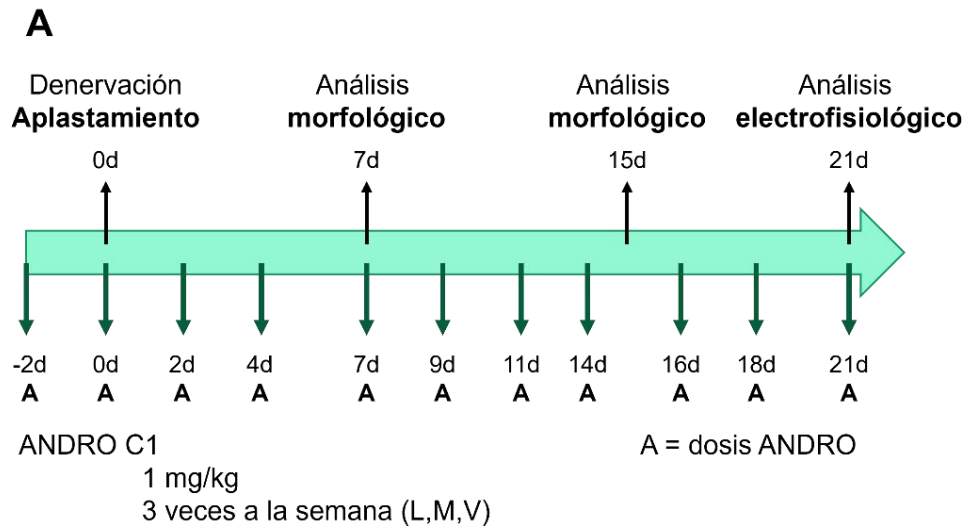
Músculos LAL fueron transfectados con el vector reportero de la vía Wnt canónica y tratados con ANDRO. **(A)** El activador farmacológico de la vía Wnt canónica, ANDRO, es un inhibidor de la quinasa Gsk3 $\beta$  lo que resulta en la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y la translocación al núcleo donde interacciona con los factores de transcripción TCF/Lef, resultando en la transcripción de genes blanco de la vía Wnt canónica. **(B)** Esquema de la electroporación del músculo LAL utilizando un protocolo de 5 pulsos cuadrados de 50 V/cm y 20 ms de duración a una frecuencia de 1Hz. Los músculos LAL fueron co-electroporados *in vivo* con plasmido pCMV/tdTomato que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato y plasmido reportero TCF/Lef:H2B-GFP. **(C)** Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia de músculos LAL electroporados tratados con vehículo (paneles de la izquierda) o con ANDRO (paneles de la derecha). Se observan las fibras musculares electroporadas (positivas para Tomato; rojo), núcleos positivos para GFP (verde) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; blanco). Los paneles inferiores muestran sólo el canal de GFP. Barra= 500  $\mu$ m

inyecciones craneales subcutáneas directamente sobre el músculo LAL. El tratamiento farmacológico se inició dos días antes de la denervación del músculo LAL derecho mediante el aplastamiento del nervio. Luego del daño al nervio, las inyecciones de ANDRO se realizaron tres veces a la semana (lunes, miércoles, viernes) por 7 o 15 días para el análisis morfológico de la UNM por medio de inmunofluorescencia (Figura 26A).

Como fue observado anteriormente (Figura 15), 7 días luego del aplastamiento al nervio algunos de los axones motores regenerados han contactado a los dominios postsinápticos denervados, mientras que a los 15 días luego del daño la totalidad de UNMs han sido reinervadas, pero el porcentaje de superposición entre los dominios pre y postsinápticos aun no recupera valores similares a los de músculos control. Por lo tanto, se analizó la morfología de la UNM a 7 y 15 días luego del daño al nervio, para observar posibles diferencias durante la denervación o luego de la reinervación de la UNM al activar la vía Wnt canónica. Se observan en ambas condiciones, músculos tratados con ANDRO o con vehículo, dominios postsinápticos denervados a los 7 días (cabezas de flecha color cian) y UNMs reinervadas a los 15 días luego del daño (cabezas de flecha color amarillo) con morfologías similares (Figura 26B).

Para analizar con más detalle las consecuencias de la activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM, se cuantificaron parámetros morfométricos de la UNM durante la denervación (7 días luego del daño) y cuando existe reinervación de la UNM (15 días luego del daño). Para saber si la activación de la vía Wnt canónica regula la reinervación de la UNM se cuantificó el porcentaje de UNMs reinervadas, aquellas en las que el axón motor hace contacto con el





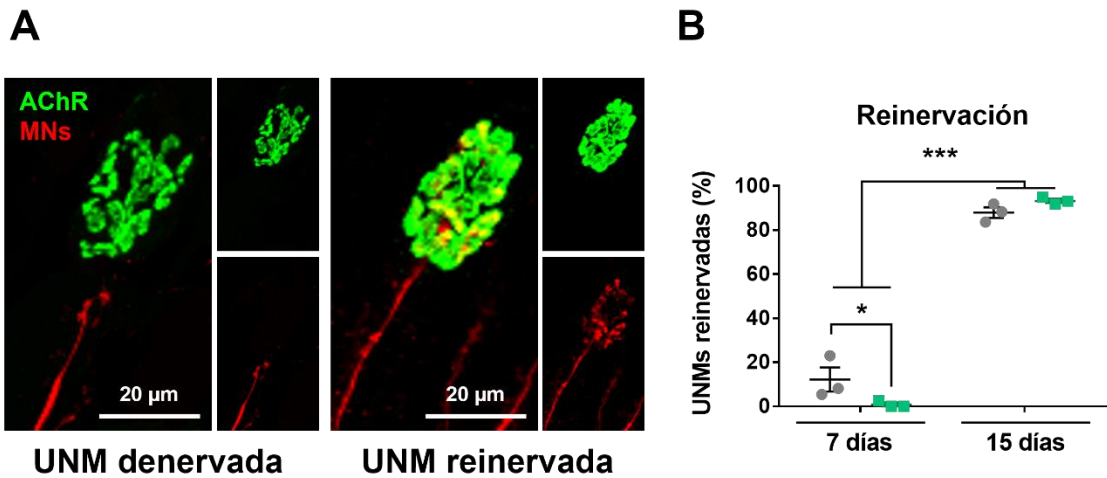
**Figura 26: La morfología global de la UNM no exhibe cambios con la activación de la vía Wnt canónica durante su regeneración.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO durante la regeneración de la UNM luego del aplastamiento del nervio. **(A)** Se trató con ANDRO con dosis de concentración de 1 mg/kg (de ratón). El tratamiento con ANDRO comenzó dos días antes del aplastamiento del nervio, luego del daño al nervio se trató 3 veces a la semana por 7, 15 o 21 días. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de las UNMs de músculos LAL 7 (paneles superiores) y 15 días (paneles inferiores) luego del aplastamiento del nervio tratados con ANDRO (paneles de la derecha) o con vehículo (paneles de la izquierda). Se observan los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). Las flechas cian señalan dominios postsinápticos denervados y las flechas amarillas dominios postsinápticos inervados. Barra= 100  $\mu$ m.

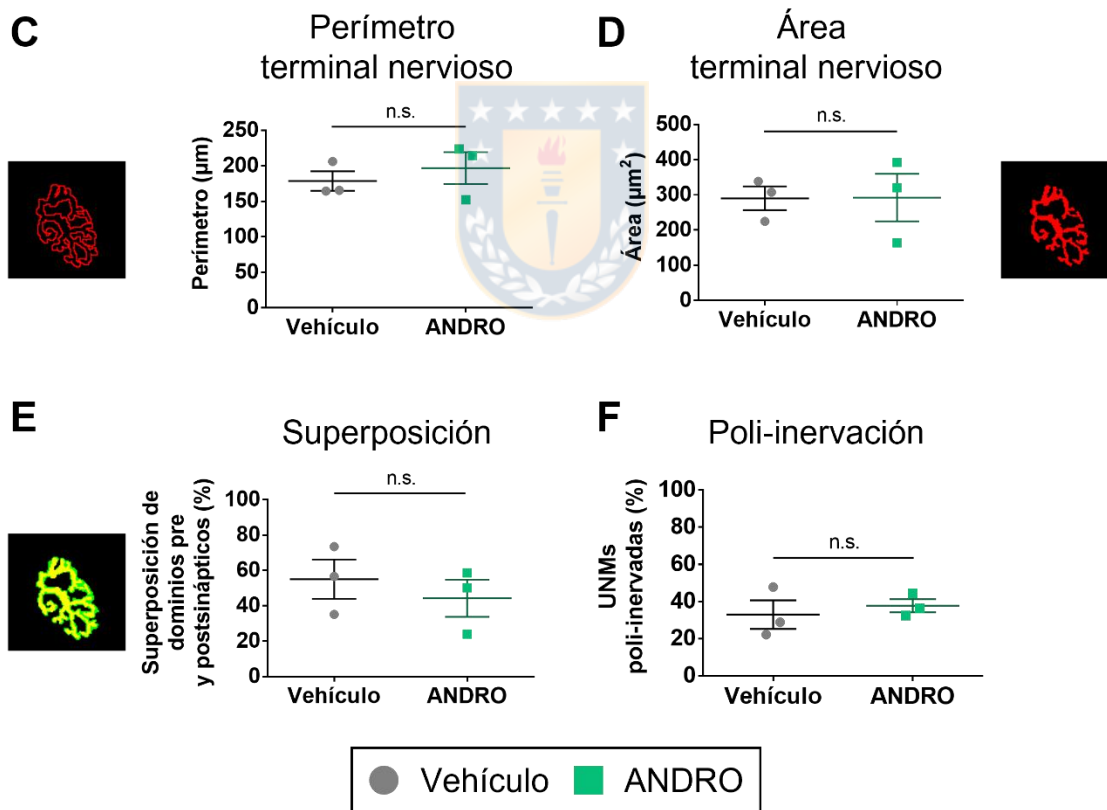
dominio postsináptico (Figura 27A). Los resultados muestran que existe una disminución significativa del porcentaje de UNMs reinervadas en los músculos LAL tratados con ANDRO 7 días luego del daño ( $0,85 \% \pm 0,85$ ) al comparar con los músculos LAL tratados con vehículo ( $13,02 \% \pm 6,31$ ) (Figura 27B). En contraposición, el porcentaje de UNM reinervadas es similar a los 15 días luego del daño al nervio (Figura 27B). No existen diferencias significativas al analizar parámetros morfométricos del terminal nervioso, específicamente perímetro y área, 15 días luego del daño (Figura 27C, 27D). Tampoco se observan diferencias en otros parámetros como la superposición entre los dominios pre y postsinápticos, ni en la proporción de UNMs poli-inervadas 15 días luego del daño (Figura 27E, 27F). Estos resultados indican que la activación de la vía Wnt canónica altera negativamente la reinervación temprana de los dominios postsinápticos.

Al analizar el comportamiento de las tSC al activar la vía Wnt canónica durante la regeneración, y de forma similar a lo que ocurre en la regeneración sin tratamientos con fármacos (Figura 12), no se observan diferencias entre el número promedio de tSC por UNM ni en el porcentaje de UNMs con proyecciones de tSC fuera de las regiones sinápticas (Figura 28). No existen diferencias en el comportamiento de las tSC al activar la vía Wnt canónica durante la denervación y la reinervación de la UNM.

Posteriormente, se cuantificaron parámetros morfométricos del dominio postsináptico 7 y 15 días luego del daño, analizando los agregados del AChR como también la placa motora. No existen diferencias significativas en el perímetro o en

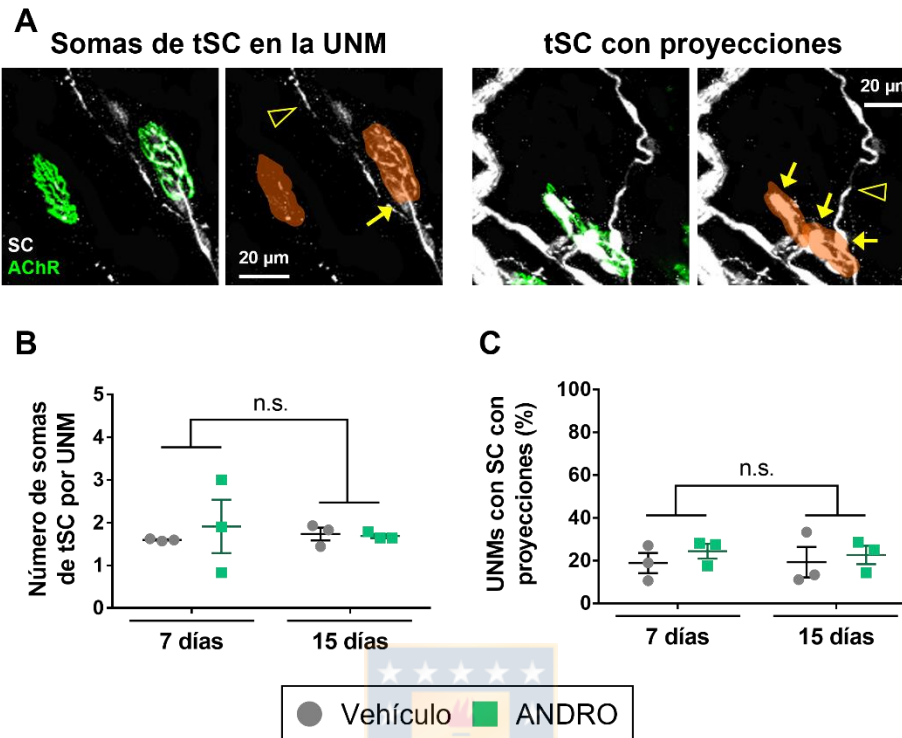


**Parámetros presinápticos 15 días luego del daño**



**Figura 27: La activación de la vía Wnt canónica retrasa los primeros contactos entre los axones regenerados y los dominios postsinápticos.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). **(A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de dominios postsinápticos sin contacto de axones motores (panel izquierdo) y dominios postsinápticos siendo contactados por al menos un axón motor (panel derecho). Se observan los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). En paneles de menor tamaño de la derecha se muestran canales de los dominios postsinápticos (paneles superiores; verde) y de los axones motores (paneles inferiores; rojo) por separado. Barra= 20  $\mu$ m. **(B)** Se cuantificó la proporción de UNMs inervadas a 7 y 15 días luego del aplastamiento del nervio. Se cuantificó el perímetro **(C)** y el área del terminal nervioso **(D)**, la superposición entre los dominios pre y postsinápticos **(E)** y la proporción de UNMs poli-inervadas **(F)** 15 días luego del aplastamiento del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (n.s.= diferencias no significativas, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), prueba de ANOVA de dos vías (B), test Mann-Whitney (C, D, E, F).



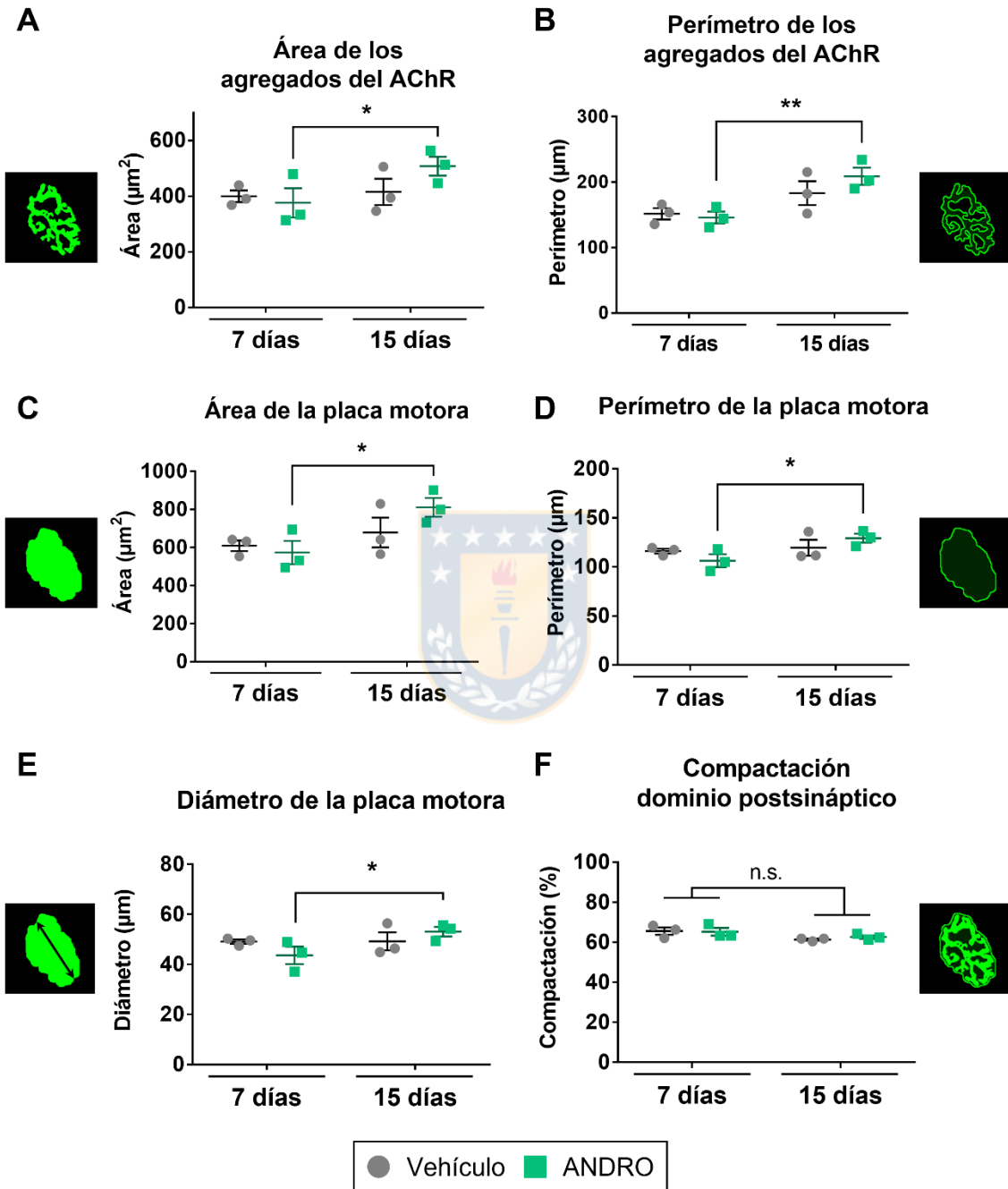
**Figura 28: La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM no gatilla en cambios morfológicos de las tSC.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). Las UNM fueron identificadas por marcaje de las tSC (S100B, blanco) y de los AChRs ( $\alpha$ -BTX; verde). **(A)** Imágenes representativas y cuantificaciones **(B, C)** de las tSC cubriendo el terminal nervioso (flecha amarilla) **(B)** y de tSC emitiendo proyecciones fuera de la región sináptica (cabeza de flecha amarilla vacía) **(C)**. Barra= 20  $\mu$ m. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (n.s.= diferencias no significativas), prueba de ANOVA de dos vías.

el área de los agregados del AChR. Tampoco se observan diferencias en el perímetro, área o diámetro de la placa motora, ni en la compactación del dominio postsináptico 7 días luego del daño (Figura 29). De manera similar, 15 días luego del daño no existen diferencias significativas en el perímetro de los agregados del AChR, ni en el perímetro o diámetro de la placa motora, o en la compactación del dominio postsináptico (Figura 29).

Al analizar la fragmentación de los dominios postsinápticos después de activar la vía Wnt canónica se observa que no existen diferencias en el número de fragmentos, en el índice de fragmentación, ni en el área de los fragmentos (Figura 30A, 30B, 30C, 30D). Al analizar las morfologías de los dominios postsinápticos, se observó un aumento en la proporción de las morfologías fragmentadas 15 días luego del daño en ambas condiciones, aun cuando no existen diferencias entre las morfologías de músculos tratados con vehículo o con ANDRO (Figura 30E). De manera interesante, se observa la aparición discreta de morfologías tipo fragmentadas borrosas en los músculos tratados con ANDRO a ambos tiempos (Figura 30F). No existen diferencias morfológicas significativas en los dominios postsinápticos al activar la vía Wnt canónica durante la denervación de la UNM o durante períodos cortos luego de su reinervación.

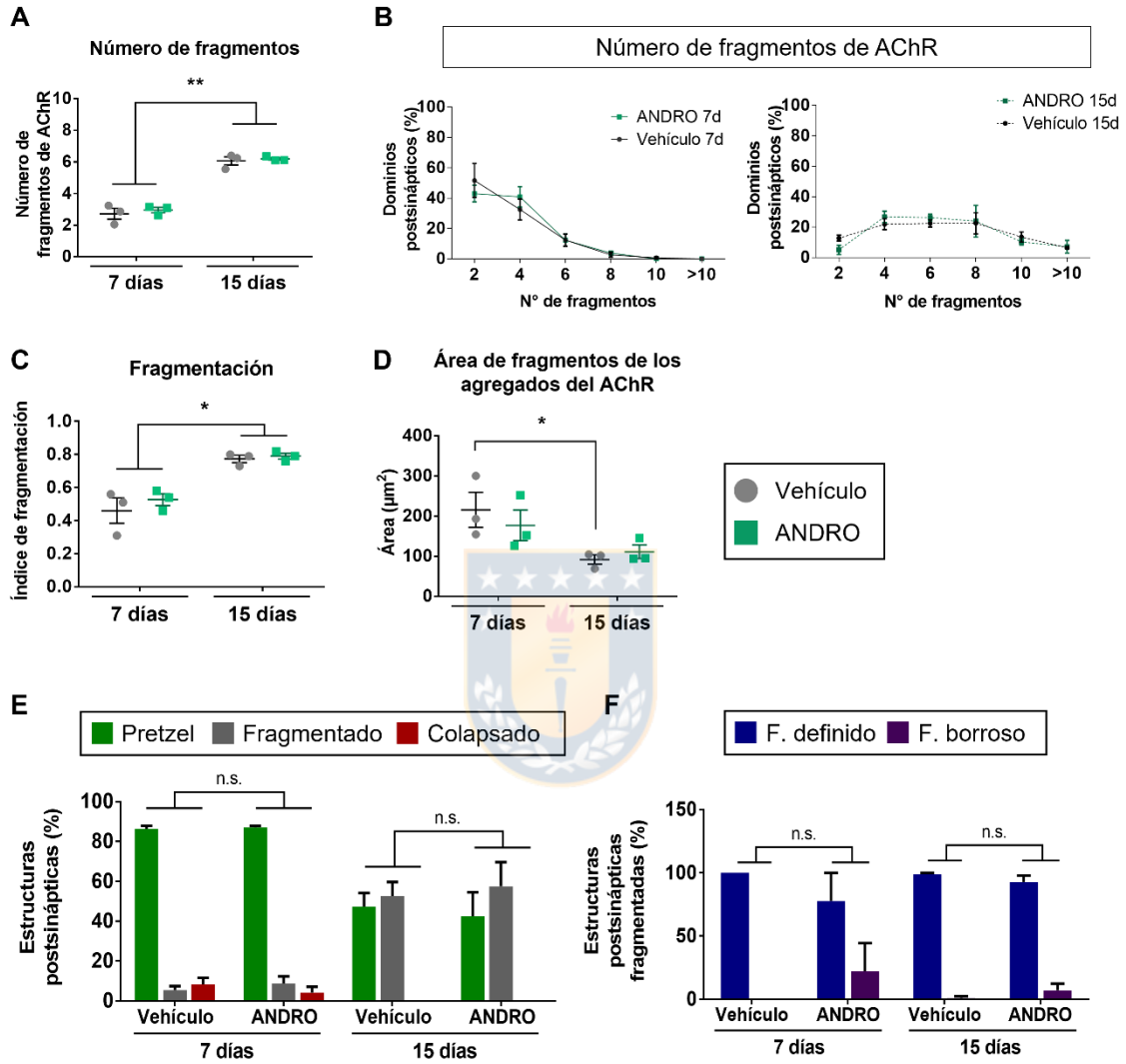
De manera conjunta, estos resultados indican que la activación de la vía Wnt canónica no afecta significativamente la morfología de la UNM durante la denervación o a tiempos cortos luego de la reinervación. Sin embargo, la activación de la vía Wnt canónica retrasa el primer contacto del axón motor con los dominios postsinápticos denervados.





**Figura 29: No existen cambios en los parámetros morfológicos del dominio postsináptico al activar la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). Se cuantificó al área **(A)**, y el perímetro de los agregados del AChR **(B)**, el área **(C)** y el perímetro de la placa motora **(D)**, y el diámetro máximo de la placa motora **(E)**. Con los datos de las áreas de los agregados del AChR y la placa motora, se calculó la compactación del dominio postsináptico **(F)**. Las figuras en los extremos corresponden a esquemas del parámetro analizado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por tiempo y condición. (n.s.= diferencias no significativas, \*p < 0,05; \*\*p < 0,01), prueba de ANOVA de dos vías.



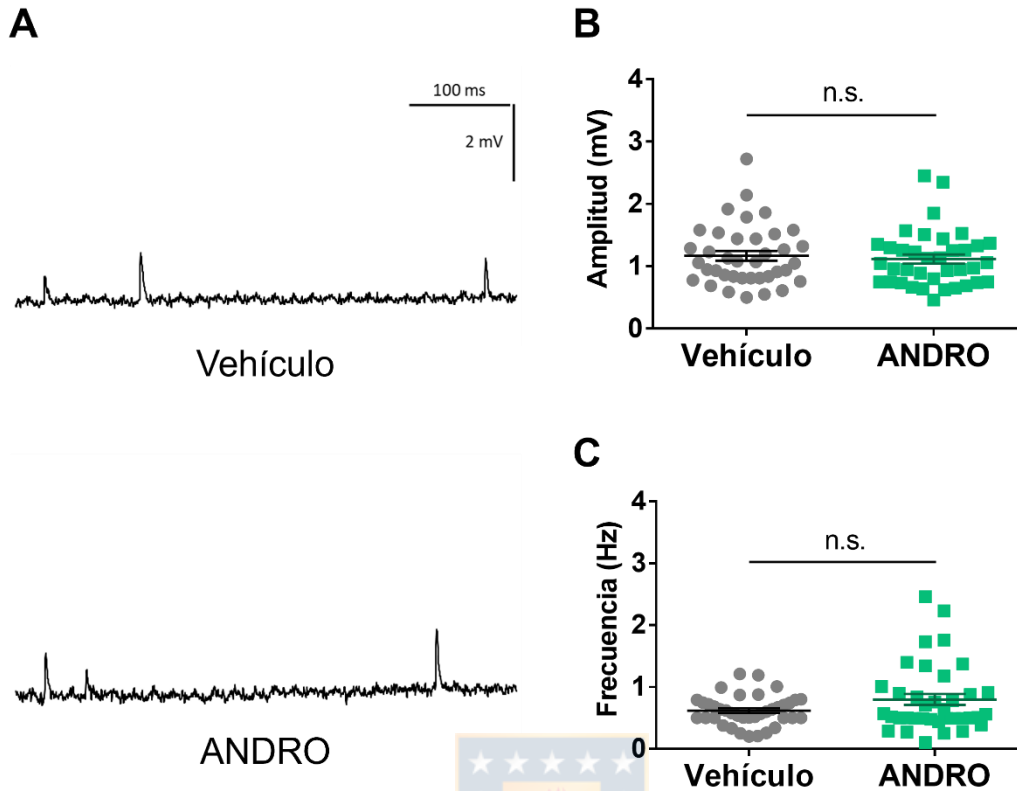
**Figura 30: La activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM no gatilla cambios en la fragmentación de los dominios postsinápticos.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO, denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo. Se cuantificó el número promedio de fragmentos de los dominios postsinápticos **(A)** y la distribución del número de fragmentos **(B)** en músculos tratados con vehículo (círculos grises) o ANDRO (cuadrados verdes). Se calculó el índice de fragmentación de los dominios postsinápticos **(C)**, y el área promedio de los fragmentos de los dominios postsinápticos **(D)**. Según su morfología, los dominios postsinápticos fueron clasificados en: tipo pretzel (barras verdes), colapsados (barras rojas) y fragmentados (barras grises) **(E)**. A su vez las morfologías fragmentadas se subclasificaron en morfologías fragmentadas definidas (barras azules) y fragmentadas borrosas (barras moradas). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (n.s.= diferencias no significativas; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ), prueba de ANOVA de dos vías.

### **5.2.3. La activación de la vía Wnt canónica provoca defectos en la recuperación funcional de la UNM luego de daño al nervio**

El análisis de la recuperación funcional de la UNM del músculo LAL realizado luego del aplastamiento del nervio mostró que la transmisión sináptica se recupera entre 21 a 60 días luego del daño al nervio (Figura 24). Considerando los tiempos previamente observados de la recuperación funcional, se analizó la transmisión sináptica de la UNM a los 21 días luego del aplastamiento del nervio activando la vía Wnt canónica mediante el protocolo previamente descrito (Figura 26). De esta manera, se analizaron las amplitudes de EPP y mEPP, así como el contenido cuantal en ausencia de contracción muscular. El análisis de la amplitud promedio y frecuencia de las mEPP no indica diferencias significativas en comparación con UNMs control (Figura 31).

Utilizando una frecuencia de estimulación del nervio facial de 0,5 Hz se obtuvieron respuestas evocadas (EPPs) durante un período de 200 segundos. Se muestran trazos representativos de los EPP de las UNMs tratadas con ANDRO o con vehículo (Figura 32A). De manera interesante, existe una disminución significativa de la amplitud de los EPP ( $35,46 \pm 2,65$  mV) y del QC ( $33,69 \pm 2,05$ ) de las UNMs tratadas con ANDRO, en comparación a las UNMs tratadas con vehículo ( $51,05 \pm 3,49$  mV;  $47,16 \pm 2,62$  agrega la estadística) (Figura 32B, 32C). Para determinar si existen cambios en la plasticidad sináptica, se analizó la PPF y la depresión sináptica utilizando frecuencias de estimulación de 0,5 – 10 – 20 y 50 Hz. Los resultados muestran una disminución significativa en la PPF de los estímulos a 10 Hz de las fibras musculares tratadas con ANDRO frente a las fibras musculares



**Figura 31: La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios con la activación de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

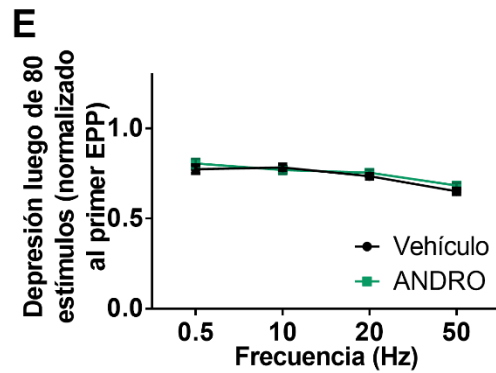
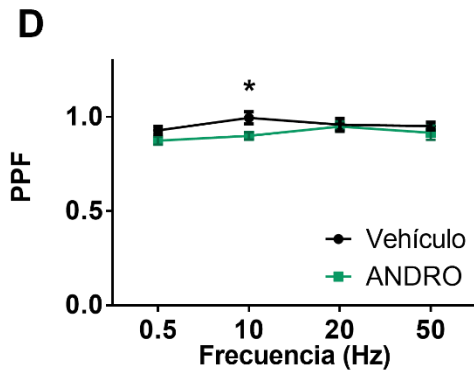
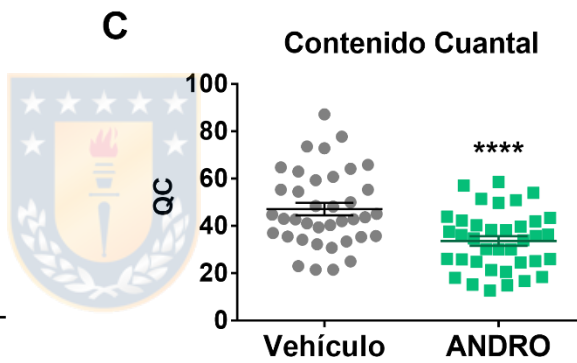
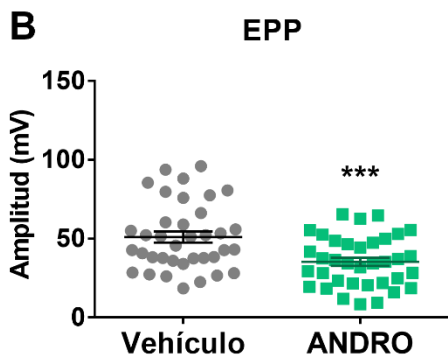
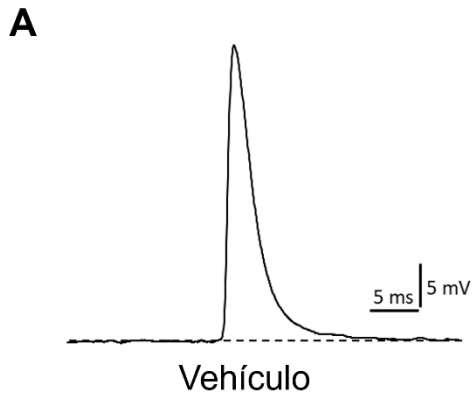
Músculos LAL fueron tratados con ANDRO (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares 21 días después del daño al nervio. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los mEPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y la frecuencia **(C)** de los mEPP. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (n.s.= diferencias no significativas) prueba de Mann-Whitney.

control (Figura 32D). No se detectaron diferencias en la depresión sináptica luego de 80 estímulos en ninguna de las frecuencias (Figura 32E). Estos resultados indican que la vía de señalización Wnt canónica afecta negativamente la recuperación de la transmisión sináptica de la UNM durante su regeneración.

#### **5.2.4. Un aumento en la dosis de *Andrographolide* resulta en alteraciones en el axón motor regenerado**

Los resultados anteriores muestran que, aunque la activación de la vía Wnt canónica no altera la morfología de la UNM, sí afecta negativamente la recuperación de la transmisión sináptica durante la regeneración de la UNM. Para analizar en mayor profundidad dichas respuestas, se realizó un segundo análisis de la morfología durante la regeneración de la UNM usando una dosis mayor de ANDRO (ANDRO[2], 5 mg/kg). Se utilizó la misma aproximación experimental anterior, analizando la morfología de la UNM 7 y 15 días luego del daño en presencia de una activación de la vía Wnt canónica mediante el tratamiento con ANDRO[2] desde dos días antes del daño al nervio (Figura 33A). La dosis de ANDRO[2] o de vehículo (DMSO) a una concentración de 5 mg/kg (de ratón) fueron incorporadas mediante inyecciones craneales subcutáneas directamente sobre el músculo LAL tres días a la semana (Figura 33A).

En ambas condiciones, se observan los dominios postsinápticos denervados a los 7 días (cabezas de flecha color cian) y UNMs reinervadas a los 15 días luego del daño (cabezas de flecha color amarillo) con morfologías similares entre sí (Figura 33B). Al analizar parámetros morfométricos de los dominios postsinápticos,

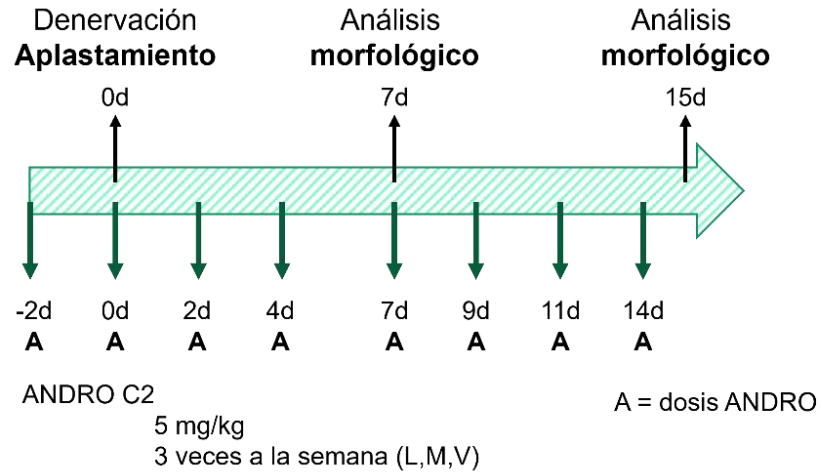


**Figura 32: La activación de la vía Wnt canónica resulta en defectos en la recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL.**

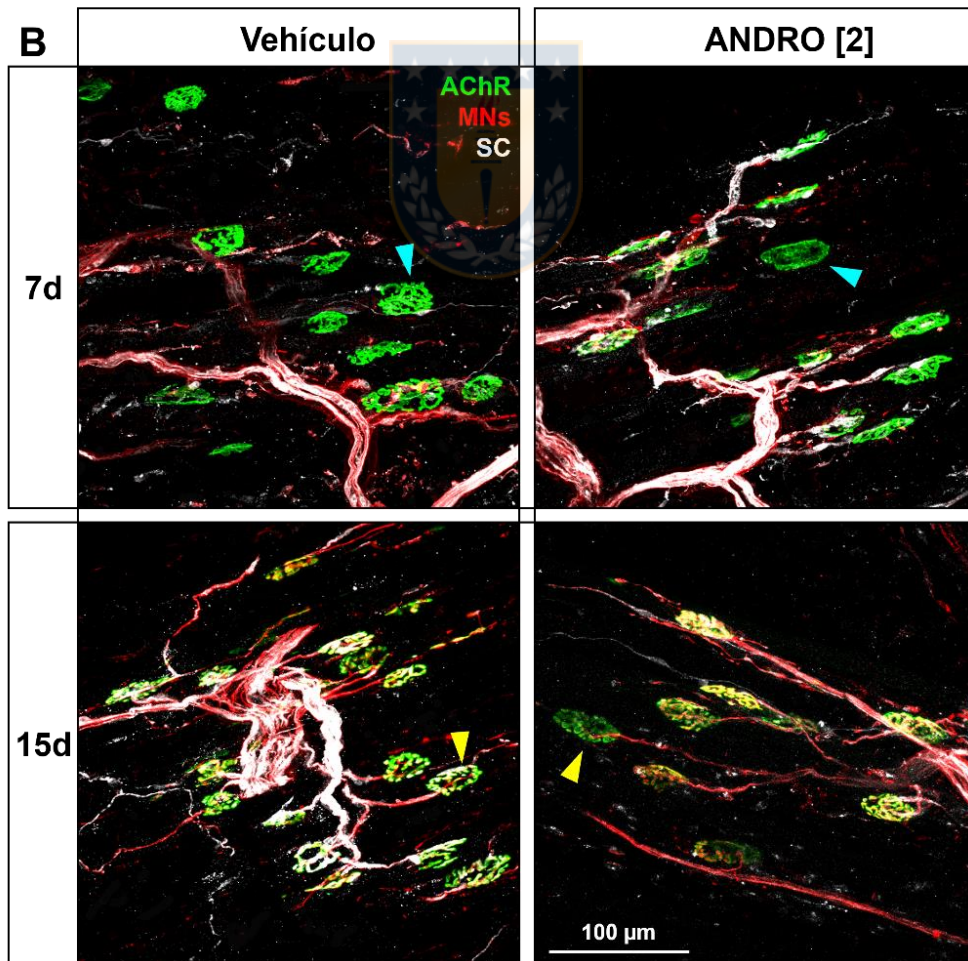
Músculos LAL fueron tratados con ANDRO (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares 21 días después del daño al nervio. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los EPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y se calculó el contenido cuantál **(C)** de los EPP. **(D)** Se analizó la facilitación por pulsos pareados de estímulos a frecuencias de 5, 10, 20 y 50 Hz. **(E)** Se cuantificó la depresión sináptica luego de 80 estímulos a 5, 10, 20 y 50 Hz. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001) prueba de Mann-Whitney (B, C) y ANOVA de dos vías (D, E).



**A**



**B**



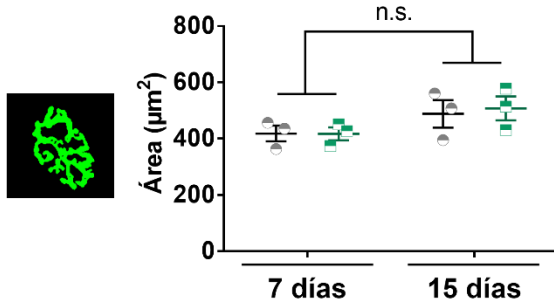
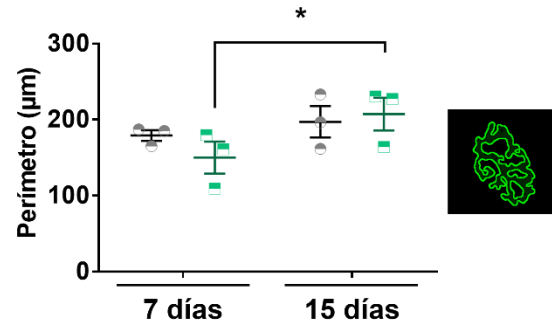
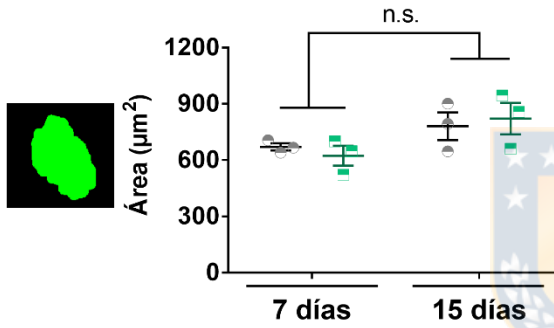
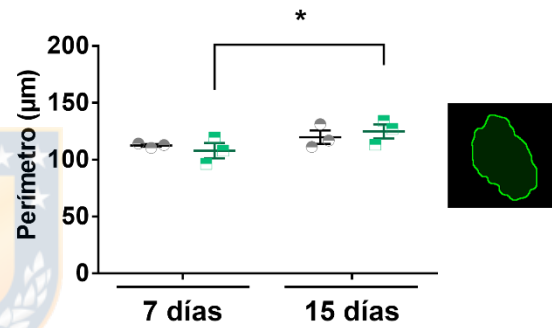
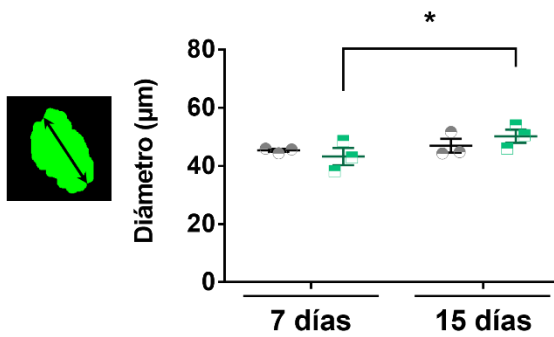
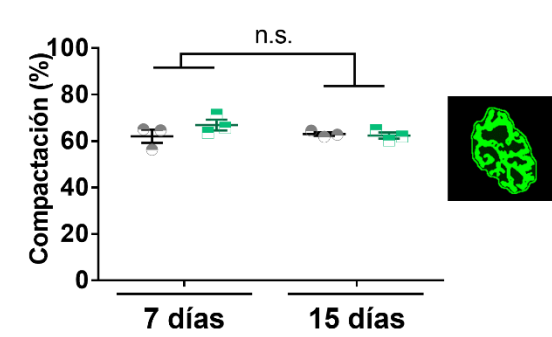
**Figura 33: La morfología global de la UNM no exhibe cambios al utilizar una dosis de ANDRO de 5 mg/kg durante la regeneración de la UNM.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO a concentraciones mayores (ANDRO[2]) durante la regeneración de la UNM luego del aplastamiento del nervio. **(A)** Se utilizaron dosis de ANDRO de 5 mg/kg (de ratón) y el tratamiento comenzó dos días antes del aplastamiento del nervio, para luego tratar 3 veces por la semana por 7 o 15. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de las UNMs de músculos LAL 7 (paneles superiores) y 15 días (paneles inferiores) luego del daño, tratados con ANDRO[2] (paneles de la derecha), o tratados con vehículo (paneles de la izquierda). Se observan los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). Las flechas cian señalan dominios postsinápticos denervados y las flechas amarillas dominios postsinápticos inervados. Barra= 100  $\mu$ m.

se observó que no existen diferencias significativas al activar la vía Wnt canónica en el perímetro o en el área de los agregados del AChR. Tampoco se observan diferencias en el perímetro, área o diámetro de la placa motora, ni en la compactación del dominio postsináptico 7 o 15 días luego del daño (Figura 34).

Al analizar parámetros de fragmentación del dominio postsináptico, no se observan diferencias en el número de fragmentos, en el índice de fragmentación, o en el área de los fragmentos. El análisis cuantitativo de la morfología de los dominios postsinápticos mostró un aumento en la proporción de las morfologías fragmentadas 15 días luego del daño en ambas condiciones, aun cuando no se observaron diferencias entre las morfologías de músculos tratados con vehículo o con ANDRO[2] (Figura 35E). De manera interesante, se observa la aparición de morfologías tipo fragmentadas borrosas en ambas condiciones (Figura 35F), tal como se observó en los resultados de la regeneración luego del aplastamiento del nervio (Figura 19C), podría indicar la inestabilidad de los dominios postsinápticos la cual se mantiene luego de ocurrida la reinervación. Estos resultados indican que no existen diferencias morfológicas significativas en los dominios postsinápticos al activar la vía Wnt canónica durante la denervación de la UNM o durante períodos cortos luego de su reinervación.

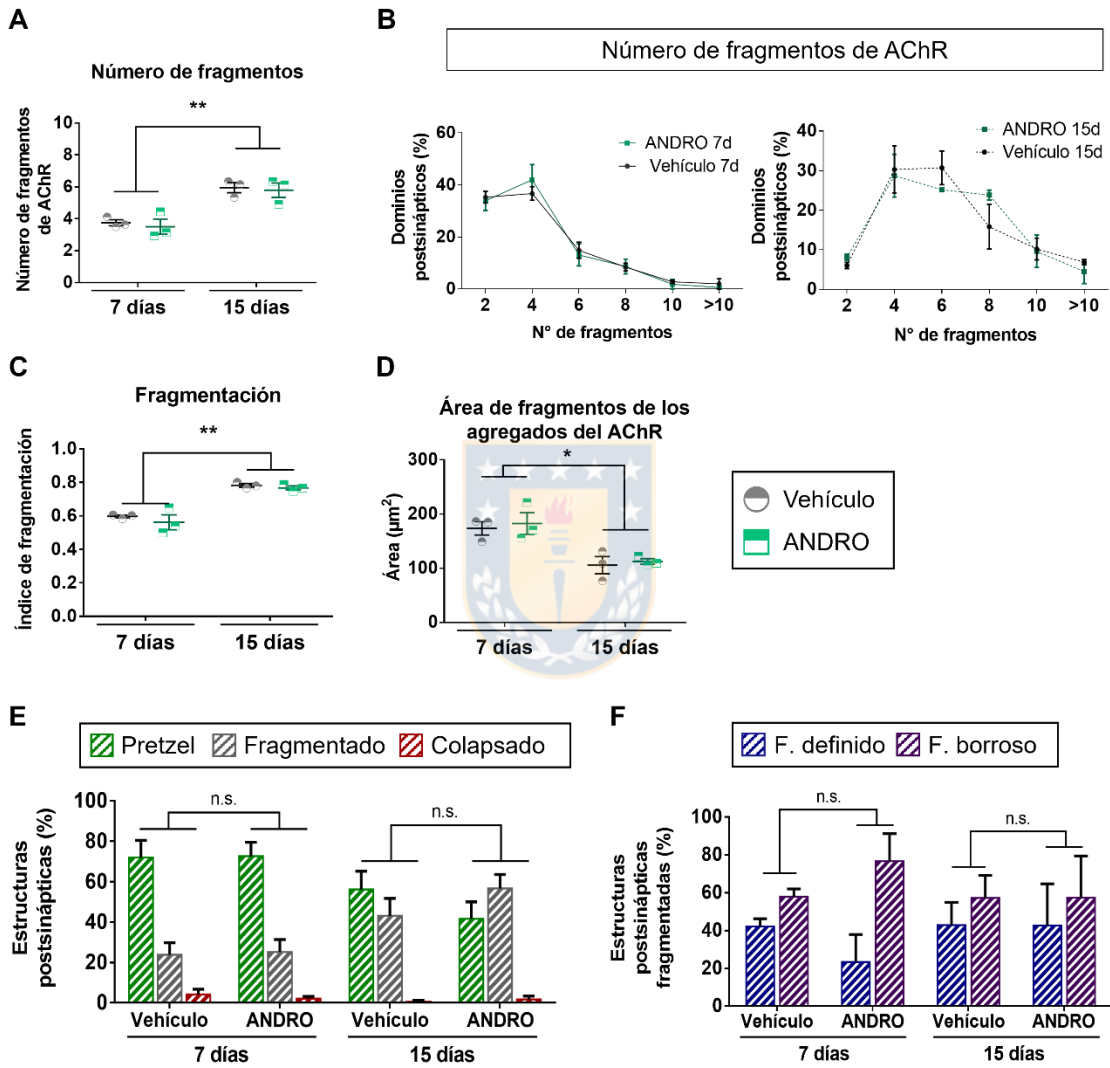
La cuantificación del porcentaje de UNMs reinervadas mostró una disminución significativa en los músculos LAL tratados con ANDRO[2] 7 días luego del daño al comparar con los músculos LAL tratados con vehículo (Figura 36A), fenotipo que revierte 15 días luego del daño al nervio. Los análisis no arrojan diferencias significativas en los parámetros morfométricos del terminal nervioso 15 días luego

**A****Área de los agregados del AChR****B****Perímetro de los agregados del AChR****C****Área de la placa motora****D****Perímetro de la placa motora****E****Diámetro de la placa motora****F****Compactación dominio postsináptico**

● Vehículo    ■ ANDRO

**Figura 34: No existen cambios en los parámetros morfológicos del dominio postsináptico al utilizar una concentración de ANDRO de 5 mg/kg durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO[2] (cuadrados verdes), denervados por aplastamiento del nervio facial y las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). Se cuantificó área **(A)**, y perímetro de los agregados del AChR **(B)**, área **(C)** y perímetro de la placa motora **(D)**, diámetro máximo de la placa motora **(E)** y se calculó la compactación del dominio postsináptico **(F)**. Las figuras en los extremos corresponden a esquemas del parámetro analizado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones por tiempo. (n.s.= diferencias no significativas; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*\*p < 0,0001), prueba de ANOVA de una vía.



**Figura 35: El tratamiento con una concentración de ANDRO de 5 mg/kg no gatilla cambios en la fragmentación de los dominios postsinápticos durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

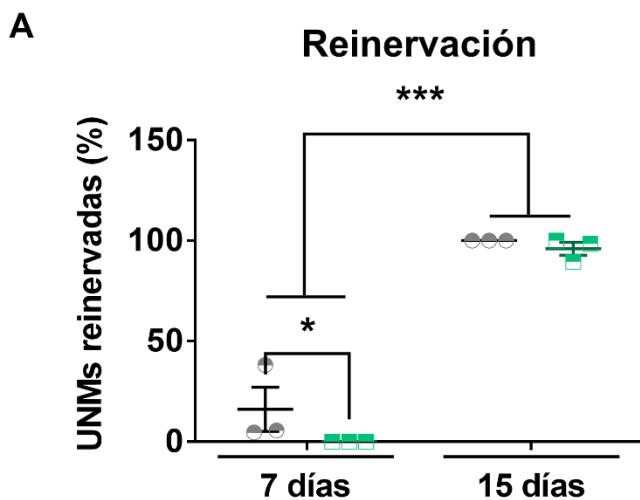
Músculos LAL fueron tratados con ANDRO[2] y denervados por aplastamiento del nervio facial. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo. Las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. Se cuantificó el número promedio de fragmentos de los dominios postsinápticos **(A)** y la distribución del número de fragmentos **(B)** en músculos tratados con vehículo (círculos grises) o ANDRO (cuadrados verdes). Se calculó el índice de fragmentación de los dominios postsinápticos **(C)**, y el área promedio de los fragmentos de los dominios postsinápticos **(D)**. **(E)** Según su morfología, los dominios postsinápticos fueron clasificados en: tipo pretzel (barras verdes diagonales), colapsados (barras rojas diagonales) y fragmentados (barras grises diagonales). A su vez las morfologías fragmentadas se subclasificaron en morfologías fragmentadas definidas (barras azules diagonales) y fragmentadas borrosas (barras moradas diagonales). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (n.s.= diferencias no significativas; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ), prueba de ANOVA de dos vías.

del daño (Figura 36B, 36C), como tampoco en otros parámetros morfológicos, como la superposición entre los dominios pre y postsinápticos o en la proporción de UNMs poli-inervadas (Figura 36D, 36E). Estos resultados indican que la activación de la vía Wnt canónica altera negativamente la reinervación temprana de los dominios postsinápticos.

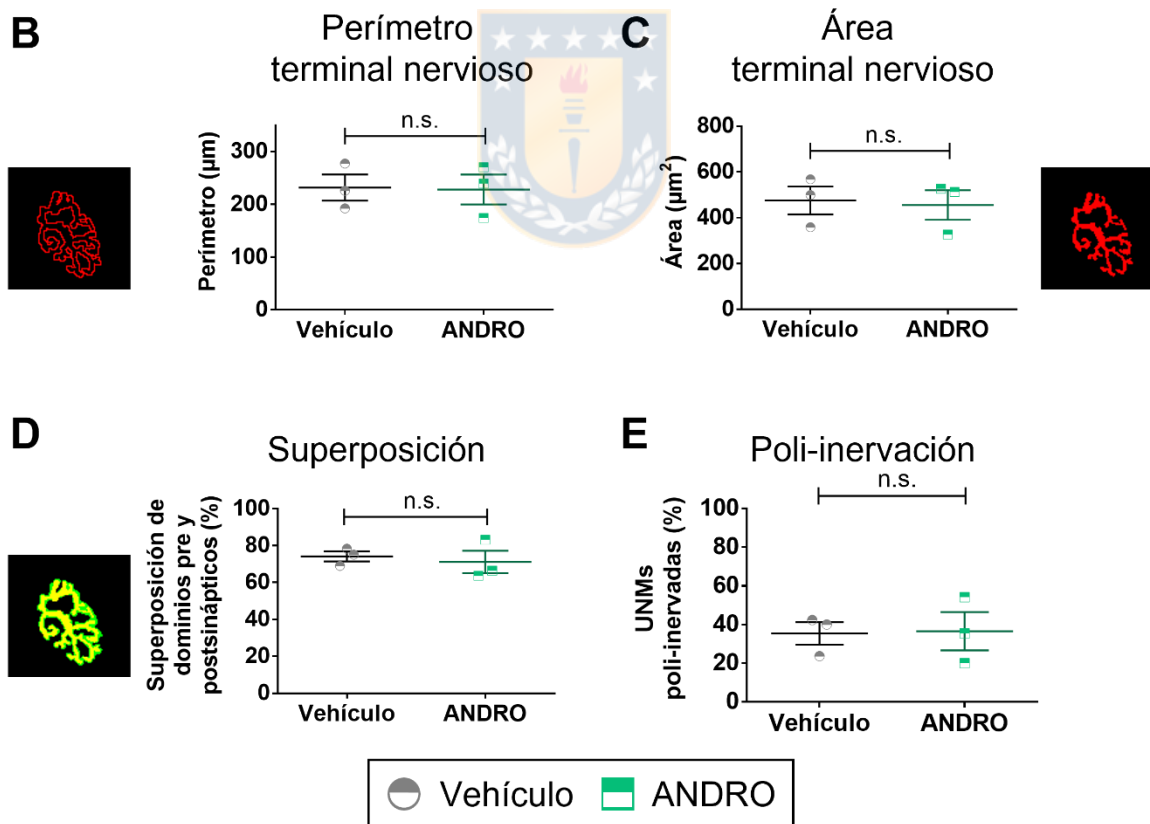
Los experimentos de activación de la vía Wnt canónica con ANDRO no arrojaron diferencias morfológicas, pero sí en los primeros contactos de los axones regenerados en ambas concentraciones de la droga. Adicionalmente, se encontraron defectos en la amplitud de los EPP y en el QC. Dado que las alteraciones observadas podrían dar cuenta de defectos en la regeneración axonal y/o en la diferenciación de los conos de crecimiento axonal a terminales nerviosos, se analizó con mayor detalle el dominio presináptico, cuantificando el diámetro axonal en UNMs reinervadas 15 días luego del daño. Los datos fueron expresados en un histograma de distribución de abundancia de diámetros axonales. Los resultados muestran que en los músculos tratados con ANDRO existe un incremento significativo de la abundancia de axones de diámetros pequeños ( $1,5 \mu\text{m}$ ;  $36,4\% \pm 7,31$ ) en comparación a las UNMs de músculos control ( $11,92\% \pm 2,39$ ). Concordantemente, las UNMs tratadas con ANDRO presentan una disminución significativa en la proporción de axones de mayor calibre ( $2,5 \mu\text{m} = 19,11\% \pm 6,07$ ;  $3 \mu\text{m} = 2,00\% \pm 1,03$ ), en comparación a las UNMs de músculos control ( $2,5 \mu\text{m} = 32,55\% \pm 2,08$ ;  $3 \mu\text{m} = 16,66\% \pm 3,57$ ) (Figura 37).

En conjunto con los resultados obtenidos con la primera concentración de ANDRO utilizada, estos datos muestran que al activar la vía Wnt canónica, la reinervación de los dominios postsinápticos se retrasa, lo que correlaciona con una



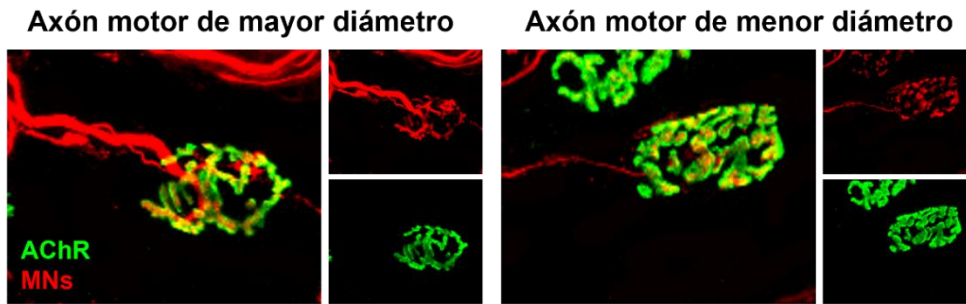
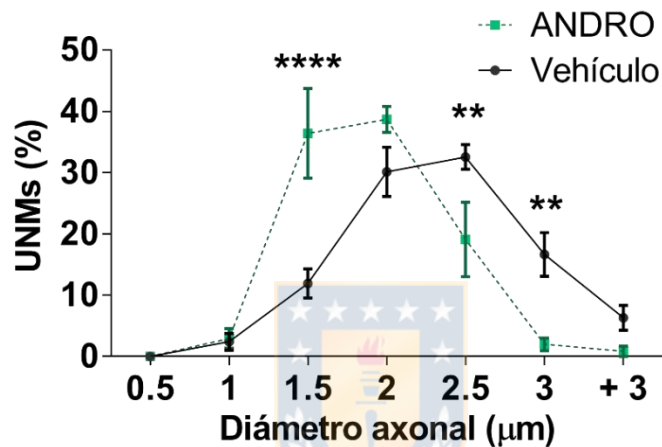


**Parámetros presinápticos 15 días luego del daño**



**Figura 36: La activación de la vía Wnt canónica, usando concentraciones de ANDRO de 5 mg/kg, también retrasa los primeros contactos entre los axones regenerados y los dominios postsinápticos.**

Músculos LAL fueron tratados con ANDRO[2] (cuadrados verdes) y denervados por aplastamiento del nervio facial. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). Las UNM fueron analizadas después de 7 y 15 días por microscopía confocal. **(A)** Se cuantificó la proporción de UNMs inervadas a 7 y 15 días luego del aplastamiento del nervio. Se cuantificó el perímetro **(B)** y el área del terminal nervioso **(C)**, la superposición entre los dominios pre y postsinápticos **(D)** y la proporción de UNMs poli-inervadas **(E)** 15 días luego del aplastamiento del nervio. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (n.s.= diferencias no significativas, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ), prueba de ANOVA de dos vías (B), test Mann-Whitney (C, D, E, F).

**A****B**

**Figura 37: La activación de la vía Wnt canónica resulta en una disminución del diámetro axonal durante la regeneración de la UNM.**

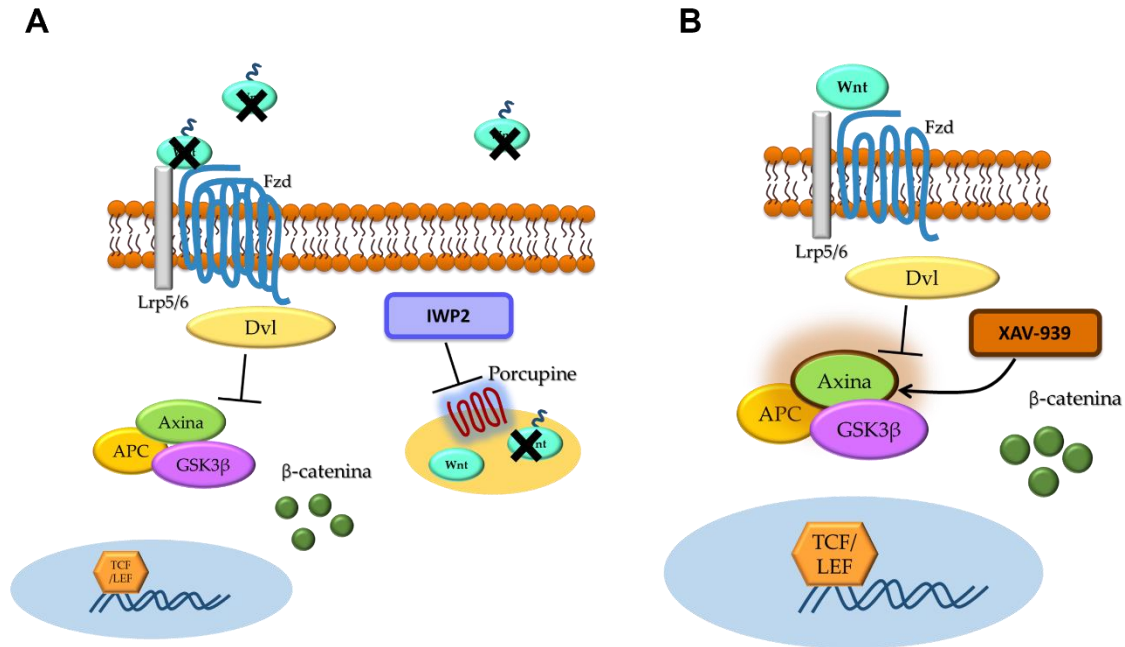
Músculos LAL fueron tratados con ANDRO[2] (líneas verdes discontinuas y cuadrados verdes) y denervados por aplastamiento del nervio facial. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (líneas y círculos negros). **(A)** Imágenes representativas de microscopía confocal de UNMs inervadas por axones motores de diámetro mayor ( $> 2,5 \mu\text{m}$ ) y UNMs inervadas por axones motores de diámetros menores ( $< 2 \mu\text{m}$ ). Las UNM fueron identificadas por marcaje de los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). **(B)** Se cuantificaron los diámetros axonales y se expresaron en un histograma de distribución. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 ratones por condición. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) prueba de ANOVA de dos vías.

disminución de parámetros funcionales de transmisión sináptica.

#### **5.2.5. El bloqueo de la secreción de ligandos Wnt mejora algunos parámetros de la transmisión sináptica de la UNM luego de daño al nervio**

Los hallazgos de los efectos de la activación de la vía Wnt canónica en la regeneración de la UNM sugieren que esta vía de señalización regula negativamente la recuperación de la UNM luego de daño al nervio. Para corroborar esta idea, como primera aproximación, se analizaron las consecuencias del bloqueo farmacológico de la secreción de los ligandos Wnt, inhibiendo todas las vías Wnt. Se utilizó la droga IWP-2 (*Inhibitor of Wnt Production 2*), que actúa bloqueando la palmitoilación de los ligandos Wnt mediada por Porcn. Dado que la palmitoilación de los ligandos Wnt es esencial para su secreción y señalización, la droga IWP-2 actúa inhibiendo todas las vías de señalización Wnt al bloquear el procesamiento y secreción de los ligandos Wnt (Guo y cols., 2017) (Figura 38B).

El tratamiento farmacológico con IWP-2 o vehículo (DMSO, control) se llevó a cabo mediante inyecciones craneales subcutáneas directamente sobre el músculo LAL a una concentración de 0,15 mg/kg (de ratón) en solución fisiológica. El tratamiento farmacológico inició dos días antes de la denervación del músculo LAL derecho (aplastamiento del nervio facial). Luego del daño al nervio, las inyecciones de IWP-2 se realizaron tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) por 21 días para el análisis funcional por medio de registro intracelular (Figura 39A).



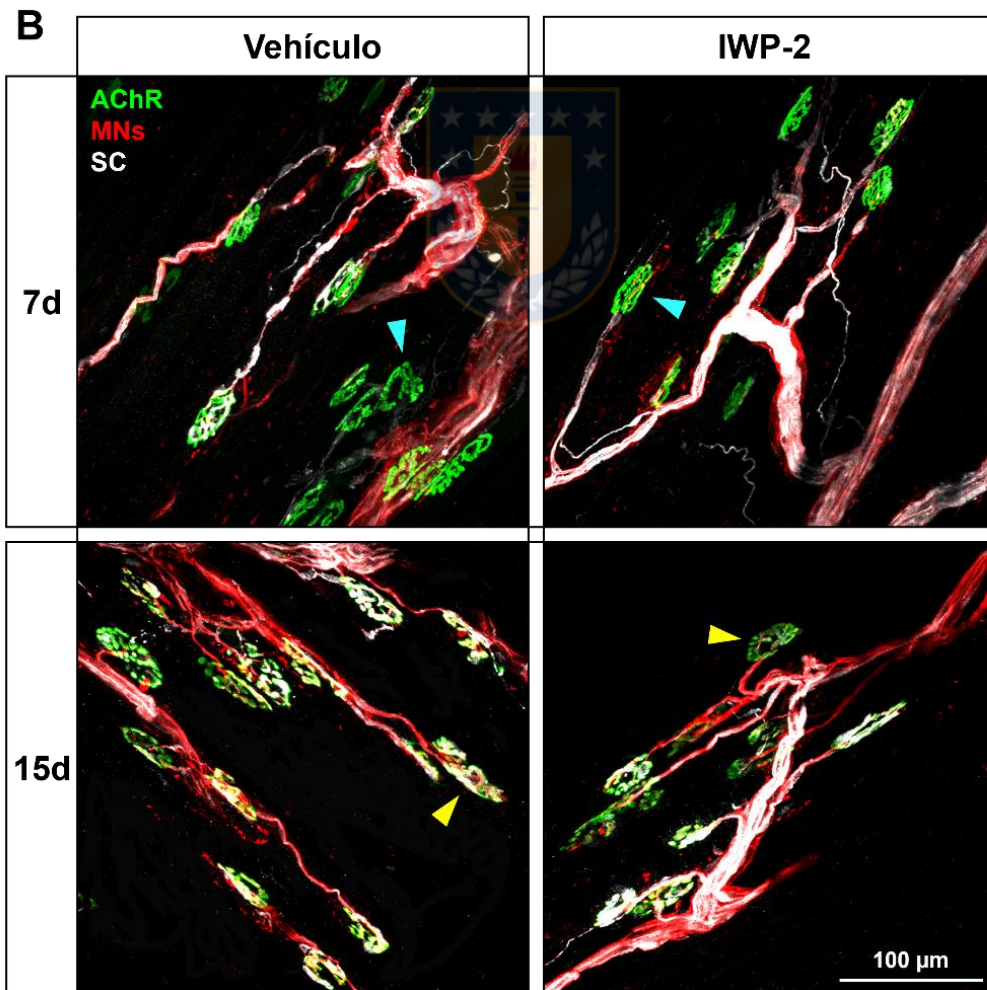
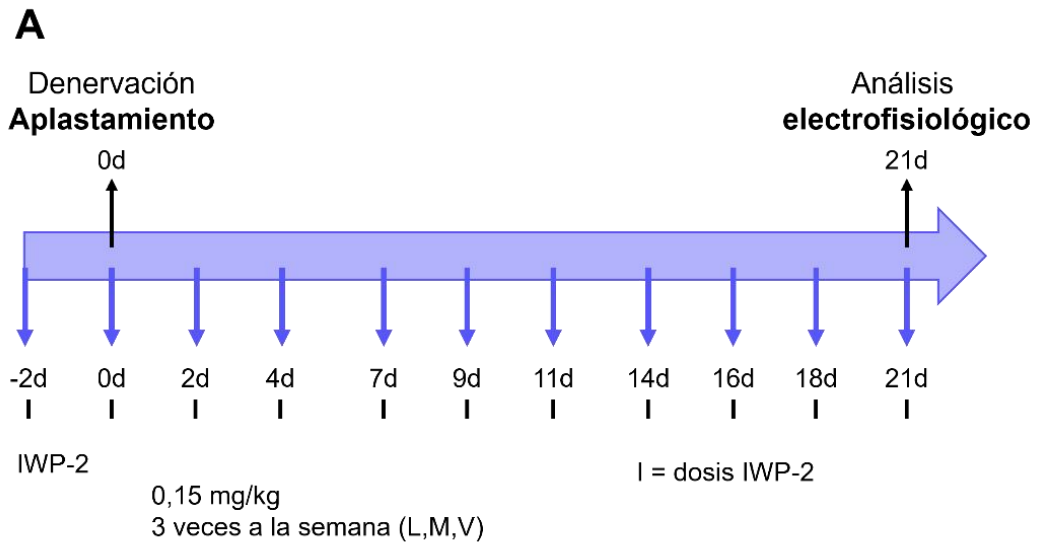
**Figura 38: Las drogas IWP2 y XAV-939 inhiben la vía de señalización Wnt a través de mecanismos distintos.**

Mecanismos de acción de los fármacos inhibitorios de la vía Wnt IWP2 y XAV-939. **(A)** El fármaco IWP2 inhibe la O-aciltransferasa Porcupine que palmitoila a los ligandos Wnt. Sin la palmitoilación los ligandos Wnt permanecen secuestrados en el retículo endoplasmático inhibiendo así todas las vías de señalización Wnt. **(B)** El fármaco XAV-939 causa el incremento de los niveles proteicos de Axina mediante la unión a proteínas tankirasas, estabilizadoras de Axina. El incremento de Axina gatilla el aumento de la degradación de  $\beta$ -catenina y la represión de la transcripción de genes blanco de la vía Wnt canónica.

Adicionalmente, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal para generar proyecciones de máxima intensidad de planos z de los músculos tratados con IWP2 o con vehículo 7 y 15 días luego del daño (Figura 39B). Tanto las UNMs tratadas con IWP-2 o las UNMs control se encuentran denervadas a los 7 días luego del daño (cabezas de flecha color cian), mientras que 15 días luego del daño existe una reinervación de los dominios postsinápticos (cabezas de flecha color amarillo) y morfologías similares entre ambas condiciones (Figura 39B).

A los 21 días luego del aplastamiento del nervio se analizaron las amplitudes de EPP y mEPP, así como el contenido cuantal, en ausencia de contracción muscular. Al analizar la amplitud promedio de los mEPP, se observa una tendencia discreta de una disminución al tratar con IWP-2. Por otra parte, el análisis de la frecuencia de las mEPP no indica diferencias significativas al inhibir la secreción de los ligandos Wnt (Figura 40).

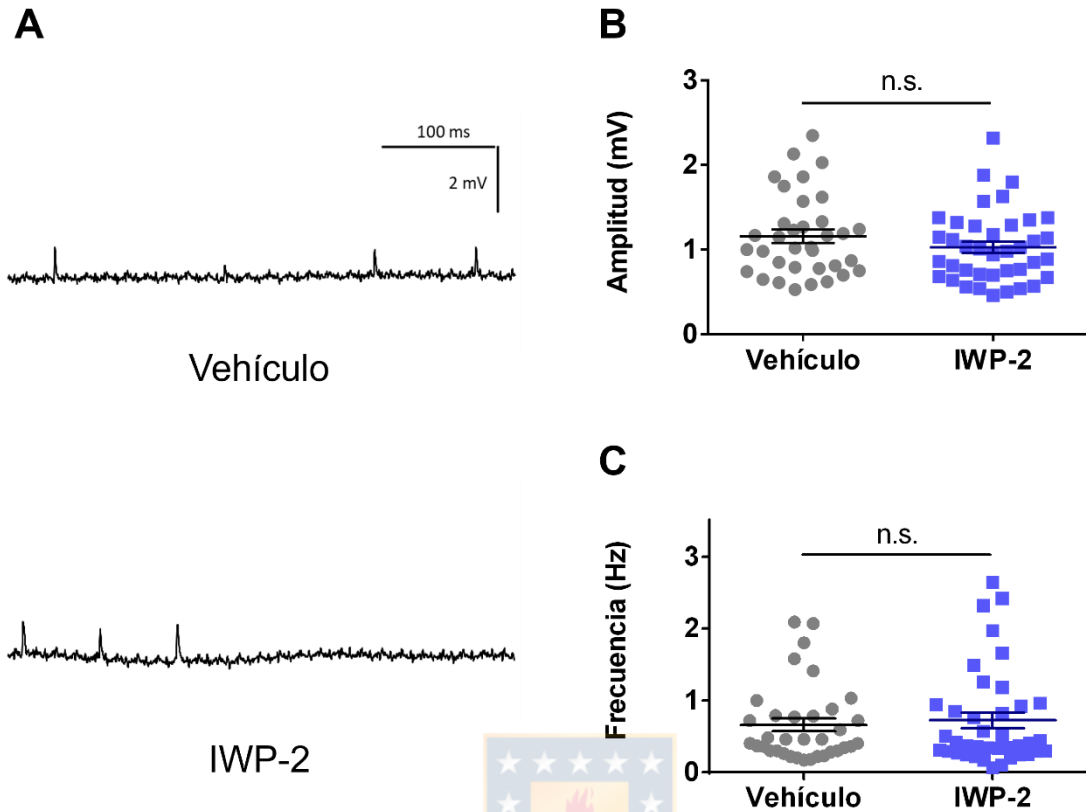
Utilizando una frecuencia de estimulación del nervio facial de 0,5 Hz se obtuvieron los EPPs. Se muestran trazos representativos de los EPP de las UNMs tratadas con IWP-2 o con vehículo (Figura 41A). Los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los valores promedio de las amplitudes de los EPP de fibras musculares tratadas con XAV o vehículo (Figura 41B). Por otra parte, al calcular el tamaño del contenido cuantal mediante el método directo, se observa un aumento en las fibras musculares tratadas con IWP-2 ( $42,38 \pm 2,30$ ) en comparación con músculos control ( $35,75 \pm 2,74$ ). Estos resultados podrían indicar una mayor cantidad de vesículas liberadas por cada potencial de acción evocado, sin embargo, se debe considerar la discreta disminución de la amplitud de los mEPP. Al analizar la plasticidad sináptica, si bien no se observan diferencias en la



**Figura 39: La morfología global de la UNM no exhibe cambios al inhibir la secreción de ligandos Wnt durante su regeneración.**

Músculos LAL fueron tratados con IWP-2 durante la regeneración de la UNM luego del aplastamiento del nervio. **(A)** Se utilizaron dosis de 0,15 mg/kg (de ratón) de IWP-2, y como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo. El tratamiento farmacológico comenzó dos días antes del aplastamiento del nervio, y luego del daño al nervio se trató 3 veces a la semana por 7, 15 o 21 días. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de las UNMs de músculos LAL 7 (paneles superiores) y 15 días (paneles inferiores) luego del aplastamiento del nervio tratados con IWP-2 (paneles de la derecha) o con vehículo (paneles de la izquierda). Se observan los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). Las flechas cian señalan dominios postsinápticos denervados y las flechas amarillas dominios postsinápticos inervados. Barra= 100  $\mu$ m.





**Figura 40: La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios al inhibir secreción de ligandos Wnt durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

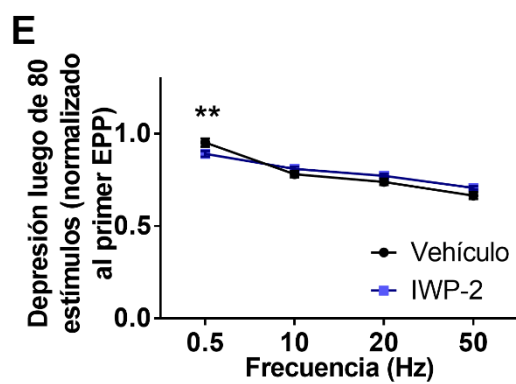
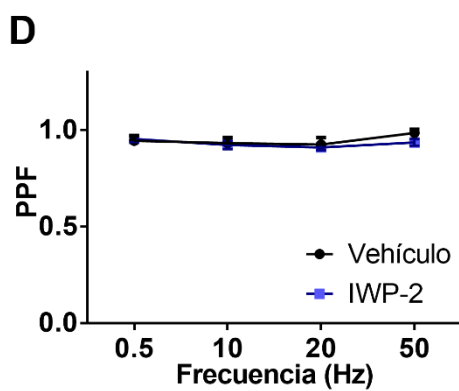
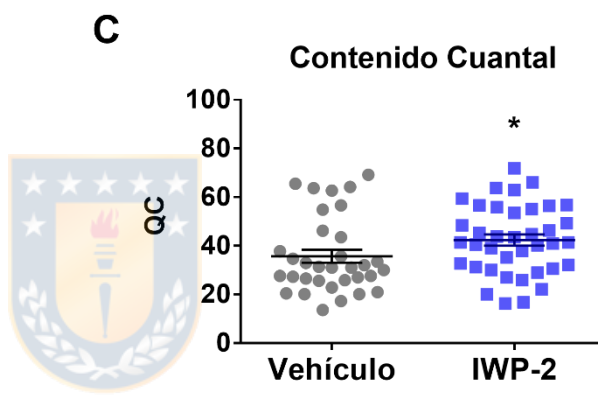
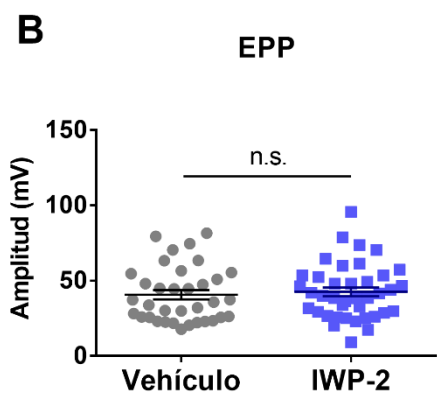
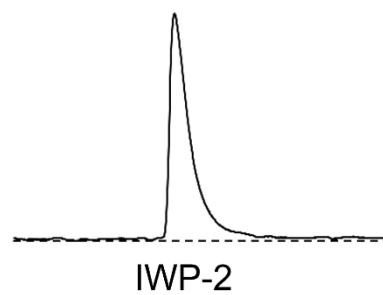
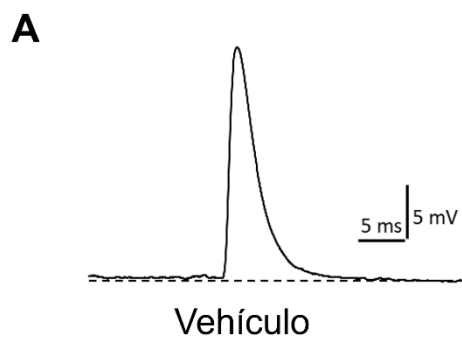
Preparaciones *ex vivo* de los músculos LAL tratados con IWP-2 (cuadrados azules) 21 días luego del aplastamiento del nervio fueron analizados a través de registro electrofisiológico intracelular. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). **(A)** Se obtuvieron trazas representativas de los mEPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y la frecuencia **(C)** de las mEPP. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (n.s.= diferencias no significativas) prueba de Mann-Whitney.

PPF en ninguna de las frecuencias utilizadas (Figura 41D), los resultados no muestran cambios significativos en la depresión sináptica al inhibir la secreción de los ligandos Wnt (Figura 41E). Estos resultados sugieren que algunos de los parámetros de la transmisión sináptica obtienen mejores resultados al inhibir la secreción de los ligandos Wnt durante la denervación y la reinervación de la UNM.

#### **5.2.6. La inhibición de la vía Wnt canónica mejora la recuperación funcional de la UNM luego de daño al nervio**

El tratamiento farmacológico para la inhibición de todas las vías Wnt, no resulta en una mejora significativa de la transmisión sináptica. Para saber si el efecto positivo de la inhibición de la vía Wnt canónica sobre la regeneración de la UNM es exclusivo de esta vía Wnt, se usó una aproximación farmacológica para la inhibición específica de la vía Wnt canónica. Se utilizó la droga XAV-939, la que estabiliza a Axina en el complejo Gsk3 $\beta$ /Axina/APC, permitiendo la fosforilación de  $\beta$ -catenina, gatillando con ello su degradación, inhibiendo así la vía de señalización Wnt canónica (Sakata y Chen, 2011) (Figura 38A).

La incorporación de XAV-939 (XAV) o de vehículo (DMSO 4 % + aceite de maíz) se llevó a cabo mediante inyecciones craneales subcutáneas directamente sobre el músculo LAL a una concentración de 0,05 mg/kg (de ratón). El tratamiento farmacológico se inició dos días antes de la denervación del músculo LAL derecho (por aplastamiento del nervio facial). Luego del daño al nervio, las inyecciones de XAV se realizaron tres veces a la semana (lunes, miércoles y viernes) por 21 días para el análisis funcional por medio de registro intracelular (Figura 42A).



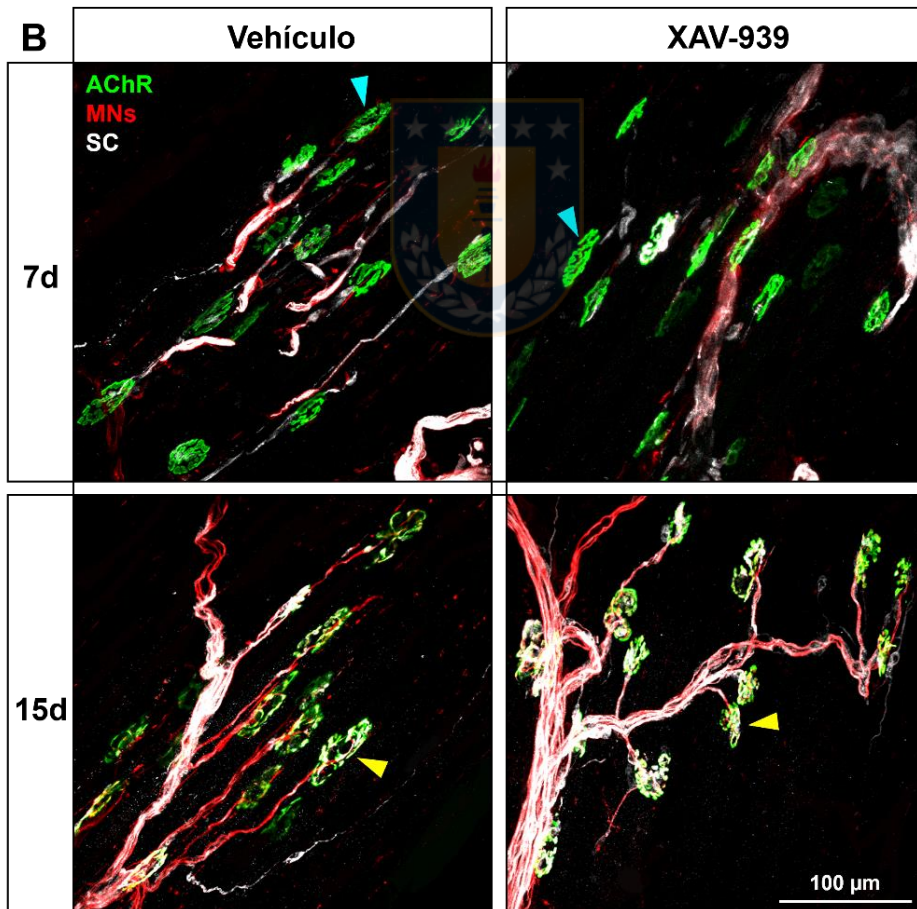
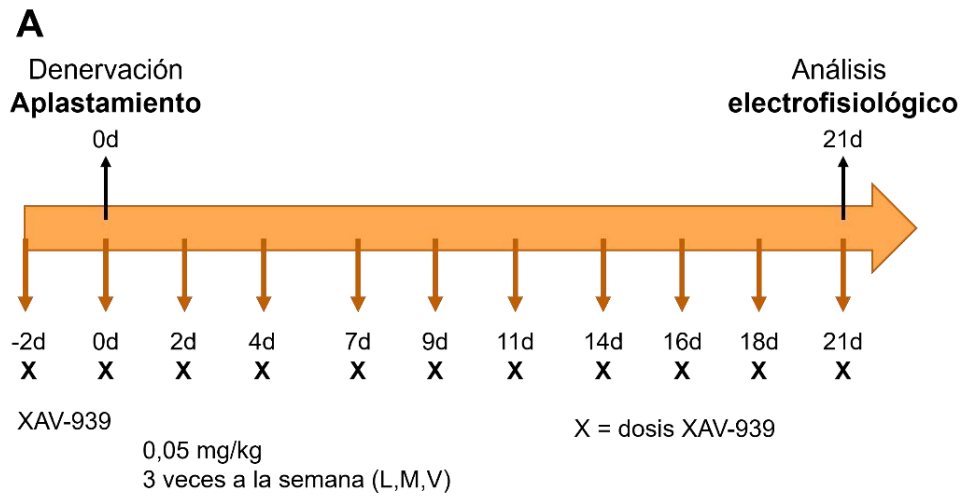
**Figura 41: La inhibición de la secreción de ligandos Wnt resulta en mejoras en la recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL.**

Preparaciones *ex vivo* de los músculos LAL tratados con IWP-2 (cuadrados azules) 21 días luego del aplastamiento del nervio fueron analizados a través de registro electrofisiológico intracelular. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises y cuadrados negros). **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los EPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y se calculó el contenido cuantál **(C)** de los EPP. **(D)** Se analizó la facilitación por pulsos pareados de estímulos a frecuencias de 5, 10, 20 y 50 Hz. **(E)** Se cuantificó la depresión sináptica luego de 80 estímulos a 5, 10, 20 y 50 Hz. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (n.s.= diferencias no significativas; \*p < 0,5; \*\*p < 0,01) prueba de Mann-Whitney (B, C) y ANOVA de dos vías (D, E).

Adicionalmente, se obtuvieron imágenes mediante microscopía confocal para generar proyecciones de máxima intensidad de planos z de los músculos tratados con XAV o con vehículo 7 y 15 días luego del daño (Figura 42B). Tanto las UNMs tratadas con XAV como las UNMs control se encuentran denervadas a los 7 días luego del daño (cabezas de flecha color cian), mientras que 15 días luego del daño existe una reinervación de los dominios postsinápticos (cabezas de flecha color amarillo) y morfologías similares entre ambas condiciones (Figura 42B).

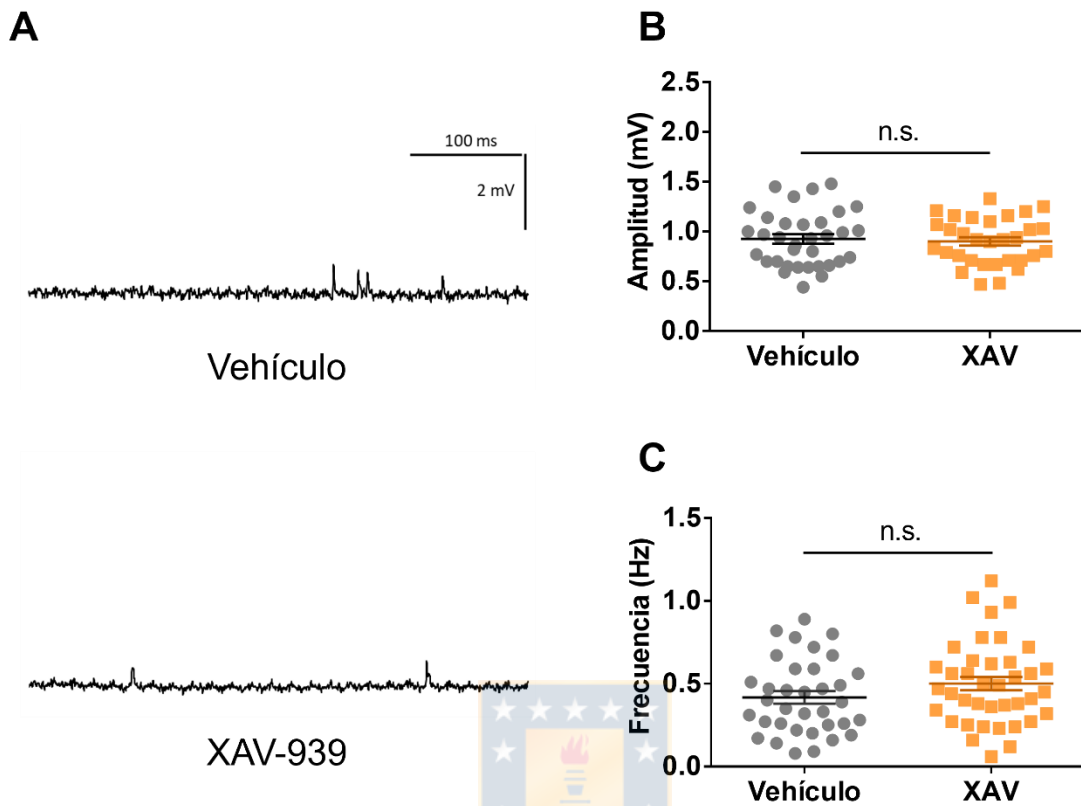
A los 21 días luego del aplastamiento del nervio se analizaron las amplitudes de EPP y mEPP, así como el contenido cuantal, en ausencia de contracción muscular. El análisis de la amplitud promedio y de la frecuencia de las mEPP no indica diferencias significativas en ninguno de estos parámetros en comparación con UNMs control (Figura 43).

Utilizando una frecuencia de estimulación del nervio facial de 0,5 Hz se obtuvieron respuestas evocadas (EPPs) durante 200 segundos. Se muestran trazos representativos de los EPP de las UNMs tratadas con XAV o con vehículo (Figura 44A). Los resultados muestran que el valor promedio de la amplitud de EPP de fibras musculares tratadas con XAV ( $50,10 \pm 4,96$  mV) es significativamente mayor a la amplitud de los EPP en músculos de animales control ( $41,71 \pm 3,51$  mV) (\*p < 0,03; test-t) (Figura 44B). Por otra parte, no existen diferencias en el tamaño del contenido cuantal al inhibir la vía de señalización Wnt canónica. Para determinar si existen cambios en la plasticidad sináptica, se analizó la PPF y la depresión sináptica utilizando frecuencias de estimulación de 0,5 – 10 – 20 y 50 Hz. No se observan diferencias en la PPF en ninguna de las frecuencias utilizadas (Figura 44D



**Figura 42: La morfología global de la UNM no exhibe cambios al inhibir la vía Wnt canónica durante su regeneración.**

Músculos LAL fueron tratados con XAV-939 durante la regeneración de la UNM luego del aplastamiento del nervio. **(A)** Se utilizaron dosis de 0,05 mg/kg (de ratón) de XAV-939. El tratamiento con XAV-939 comenzó dos días antes del aplastamiento del nervio, y luego del daño al nervio se trató 3 veces a la semana por 7, 15 o 21 días. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de las UNMs de músculos LAL 7 (paneles superiores) y 15 días (paneles inferiores) luego del aplastamiento del nervio tratados con XAV-939 (paneles de la derecha) o con vehículo (paneles de la izquierda). Se observan los axones y terminales motores (anti SV2/2H3; rojo), las células de Schwann (anti S100B; blanco) y los AChR ( $\alpha$ -BTX; verde). Las flechas cian señalan dominios postsinápticos denervados y las flechas amarillas dominios postsinápticos inervados. Barra= 100  $\mu$ m.



**Figura 43: La liberación espontánea de vesículas sinápticas no presenta cambios al inhibir la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM del músculo LAL.**

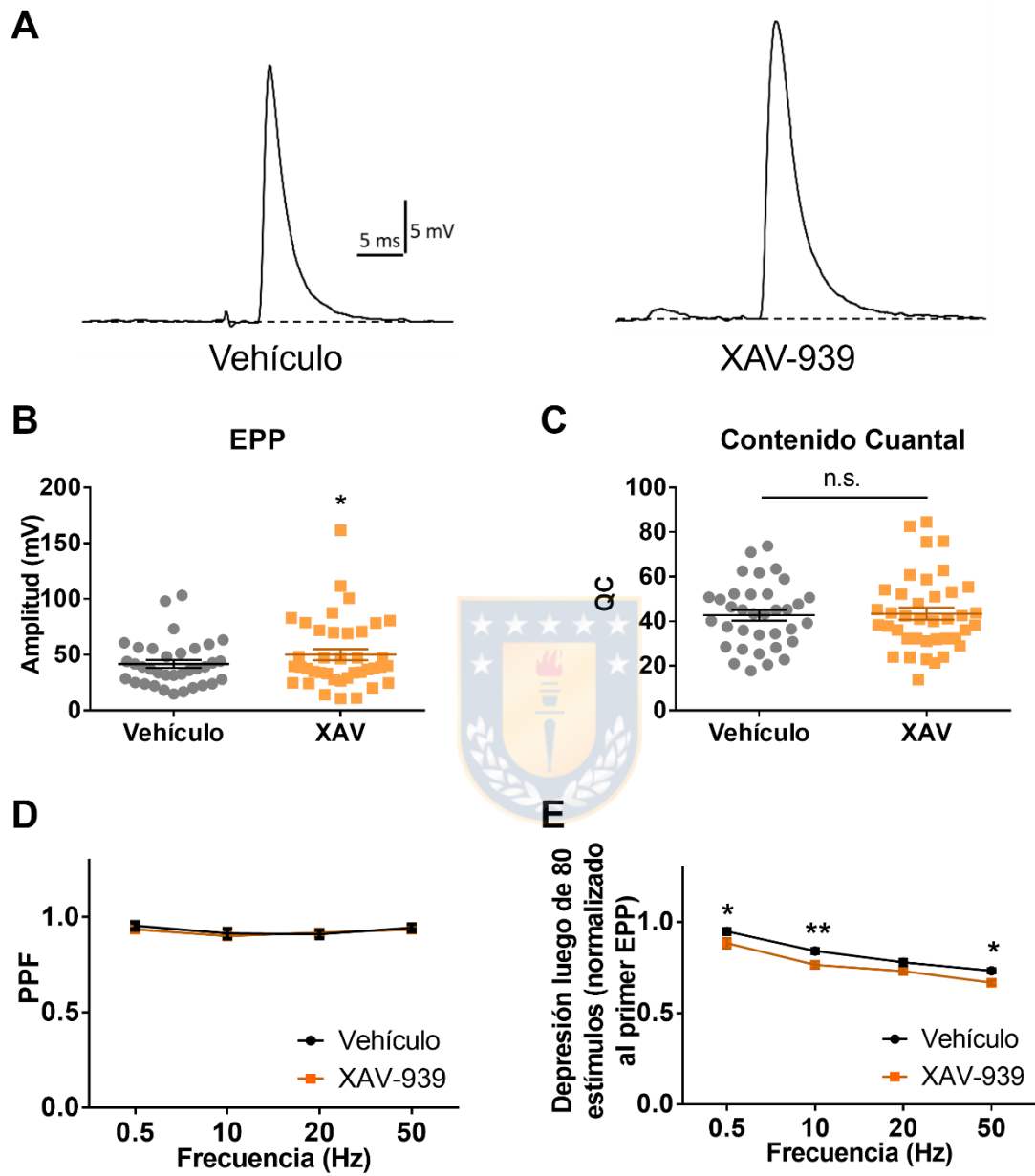
Músculos LAL fueron tratados con XAV-939 (círculos naranjos), denervados por aplastamiento del nervio facial y se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares 21 días después del daño al nervio. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises). **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los mEPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y la frecuencia **(C)** de los mEPP. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (n.s.= diferencias no significativas) prueba de Mann-Whitney.



). La inhibición de la vía Wnt estimula la recuperación funcional de la UNM luego del daño por aplastamiento del nervio.

En su conjunto, nuestros resultados muestran que la vía Wnt canónica regula negativamente la recuperación de la transmisión sináptica de la UNM, posiblemente por el retraso en la regeneración axonal y el restablecimiento de terminal nerviosas maduras.





**Figura 44: La inhibición de la vía Wnt canónica resulta en una mejor recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM del músculo LAL.**

Músculos LAL fueron tratados con XAV-939 (cuadrados naranjos), denervados por aplastamiento del nervio facial y se realizaron registros electrofisiológicos intracelulares 21 días después del daño al nervio. Como control se utilizaron músculos LAL denervados tratados con vehículo (círculos grises y cuadrados negros). **(A)** Se obtuvieron trazos representativos de los EPP de un tren de estímulos de 0,5 Hz. Se cuantificó la amplitud **(B)** y se calculó el contenido cuantitativo **(C)** de los EPP. **(D)** Se analizó la facilitación por pulsos pareados de estímulos a frecuencias de 5, 10, 20 y 50 Hz. **(E)** Se cuantificó la depresión sináptica luego de 80 estímulos a 5, 10, 20 y 50 Hz. Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 3 por condición; n: número de fibras, 27-37 fibras por ratón. (n.s.= diferencias no significativas; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01) prueba de Mann-Whitney (B, C) y ANOVA de dos vías (D, E).

## 6. DISCUSIÓN

La UNM es la sinapsis responsable de la contracción muscular, por lo que su integridad es esencial para el movimiento voluntario de los vertebrados. La UNM puede verse dañada por patologías que afectan a los dominios pre- o postsinápticos, o por lesiones mecánicas a los nervios periféricos. Aunque el sistema nervioso periférico tiene mejores capacidades regenerativas que el SNC (Scheib y Höke, 2013), la recuperación de la función motora suele ser ineficiente en los seres humanos (Hoke, 2006; Alvites y cols., 2018). Algunas de las posibles explicaciones son las mayores distancias que los axones motores humanos deben recorrer durante su regeneración para reinervar a los músculos afectados, en comparación con los axones de modelos murinos (Hoke, 2006). Esta característica se ve potenciada si se considera que la velocidad de crecimiento axonal es similar o incluso más lenta en humanos que en roedores (Palispis y Gupta, 2017). Además, aunque se han realizado avances significativos en las técnicas microquirúrgicas empleadas para la reparación de nervios dañados en humanos, la recuperación de la función motora ha mostrado resultados que en general varían desde subóptimos a buenos (Choi y Raisman, 2002; Woollard y cols., 2021).

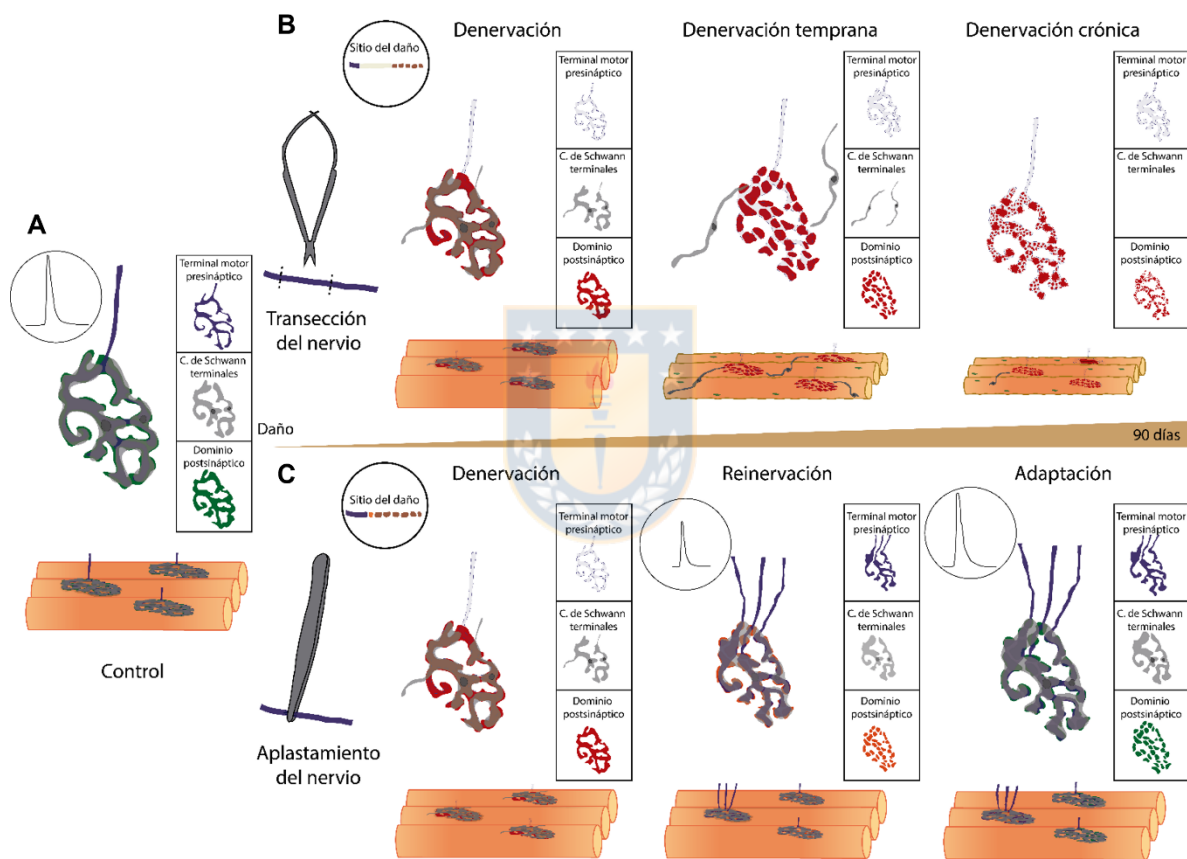
Es interesante destacar que estudios previos en modelos murinos utilizando paradigmas experimentales de denervación con reinervación tardía de la UNM, han demostrado que la reinervación de los dominios postsinápticos y la recuperación de la morfología de la UNM no se correlaciona con la recuperación de la función motora (Sakuma y cols., 2016). En este contexto, la mayoría de los enfoques terapéuticos para tratar lesiones nerviosas se han centrado en mejorar y acelerar la regeneración

axonal, pero pocos estudios se han centrado en la degeneración inicial de la sinapsis neuromuscular (Santosa y cols., 2018) y en la secuencia de eventos que subyacen a la regeneración de la UNM. En la primera parte de esta investigación, se caracterizaron las consecuencias a largo plazo tanto de la denervación crónica de la UNM como de la regeneración de la UNM a tiempos cortos, lo que permitió comparar los cambios morfológicos entre ambos modelos de daño. En este contexto, los hallazgos del presente trabajo de tesis muestran que algunos de los fenotipos morfológicos previamente asociados a UNMs defectuosas correlacionaron con una recuperación de la transmisión sináptica luego de la reinervación de la UNM. Así, la mantención de alteraciones morfológicas en la UNM durante el proceso regenerativo podría dar cuenta de mecanismos de adaptación de la UNM para recuperar su funcionalidad, tal como se ha sugerido en otras condiciones fisiológicas (Figura 45).



### **6.1. Morfología de los dominios postsinápticos frente a daño degenerativo y regenerativo**

De manera interesante, algunos de los cambios observados en este trabajo a largo plazo después de la reinervación también se han observado en las UNMs de otras condiciones fisiológicas y patológicas. Por ejemplo, varios estudios revelan que la regeneración de la UNM está acompañada de algunos eventos celulares y moleculares originalmente descritos en el desarrollo de la UNM (Magill y cols., 2007; Tapia y cols., 2012; Sakuma y cols., 2016; Zelada y cols., 2021). Durante la formación temprana de la sinapsis neuromuscular existe un pre-patrón de



**Figura 45: Adaptación morfológica de la UNM tras un daño degenerativo y regenerativo.**

**(A)** En la UNM de los músculos de control, el dominio postsináptico (verde) presenta una compleja morfología tipo pretzel, cubierta en su mayor parte por un único axón terminal presináptico (azul), y 2 a 3 tSC (gris) cubriendo el terminal nervioso. **(B)** Tras la resección del nervio (degeneración de la UNM), el segmento distal del axón es removido mediante la degeneración Walleriana (círculo), las tSC extienden proyecciones fuera de la región sináptica (panel central), el dominio postsináptico se denerva, se vuelve inestable y se fragmenta (rojo), aparecen agregados ectópicos de AChR a lo largo de la fibra muscular, y las fibras musculares sufren atrofia (panel central y derecho). **(C)** Luego del daño por aplastamiento del nervio (regeneración de la UNM), el segmento distal del axón es removido mediante la degeneración Walleriana (círculo) y el dominio postsináptico se denerva y se vuelve inestable (panel izquierdo). La reinervación da lugar sinapsis mono y poli-inervadas (panel central), mientras que la mayoría de los dominios postsinápticos se fragmentan y no recuperan la estabilidad observada en dominios postsinápticos de músculos control (dominio postsináptico naranja en el panel central). Tiempo después de la reinervación, una proporción significativa de las UNMs sigue siendo poli-inervada (~30%). Aunque los dominios postsinápticos recuperan su estabilidad, la mayoría de ellos siguen siendo fragmentados (panel derecho).

agregados del AChR, con morfología tipo placa y densidad uniforme en las fibras musculares, previo a su inervación. Algunos de estos agregados son posteriormente inervados y forman UNMs adultas, mientras otros son inducidos por los axones motores durante la inervación de las fibras musculares; por su parte, aquellos agregados del AChR que no son contactados por los axones motores desaparecen durante la sinaptogénesis neuromuscular (Flanagan-Steet y cols., 2005). Como se demostró anteriormente (Frank y cols., 1976; Lømo, 2003), observamos la aparición de agregados ectópicos del AChR con morfología tipo placa en las fibras musculares denervadas, los que desaparecen una vez que se logra la reinervación. Estos resultados son concordantes con experimentos que demuestran que la actividad motora neuronal y el consiguiente aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  del músculo inhiben la expresión de las subunidades de AChR, lo que permite el establecimiento y distribución de agregados de AChR específicamente en la región sináptica de la fibra muscular (Ferraro y cols., 2012). De forma interesante, en trabajos previos en los que se denervó y estimuló directamente el músculo *soleus* en ratas, se observó una disminución significativa del número de agregados ectópicos en comparación con los músculos sin estimulación eléctrica (Frank y cols., 1976). Esta evidencia corrobora la directa relación que existe entre la estimulación nerviosa de las fibras musculares y la expresión y agregación de AChR fuera de las regiones sinápticas.

En el presente estudio, observamos que la denervación de la UNM en ambos modelos de daño resultó en una disminución en el área de los agregados del AChR. En el caso del modelo de denervación crónica, la disminución del área de los dominios postsinápticos puede ser atribuido a la atrofia de las fibras musculares, que ocurre tan pronto como 7 días luego del daño la nervio (Zeman y cols., 2009;



Menorca y cols., 2013), tal como se observó en las imágenes de campo claro de los músculos LAL denervados. Sin embargo, en el modelo regenerativo, donde la reinervación de la UNM ocurre a tiempos cortos después del daño (11 días), la disminución del área de agregados del AChR se observó hasta dos meses después del daño. Si bien en este trabajo de tesis no se analizó el calibre de las fibras de los músculos LAL denervados, se ha descrito que la atrofia en los músculos ocurre a tiempos cortos luego de la denervación (7 días) y que la estimulación de músculos denervados aun por breves períodos de tiempo, es suficiente para revertir la atrofia muscular (Cisterna y cols., 2014). Lo anterior permite especular que la disminución del tamaño de los dominios postsinápticos en el modelo regenerativo podría tener otras causas adicionales a la atrofia muscular inicial. Así, si bien en ambos modelos de daño existen cambios morfológicos en los dominios postsinápticos, en el modelo regenerativo algunas alteraciones se revierten, mientras que otras permanecen por tiempos prolongados, sugiriendo que la UNM tiene mecanismos de adaptación morfológica luego de su regeneración. En este sentido, en esta tesis optamos experimentalmente por análisis más detallados de las diferencias entre los fenotipos de ambos modelos los que, especialmente a tiempos prolongados, podrían revelar las características morfológicas que subyacen a microambientes permisivos para la regeneración de la UNM.

## **6.2. Fragmentación de los dominios postsinápticos**

La fragmentación de los dominios postsinápticos en la UNM es una característica que se ha asociado con alteraciones de la UNM que ocurren en ciertas

condiciones patológicas (Pratt y cols., 2015; Cipriani y cols., 2018; Dobrowolny y cols., 2018; Villalón y cols., 2018), además de considerarse una característica distintiva de las UNMs envejecidas (Valdez y cols., 2010). Por ejemplo, seguido de la denervación de la placa motora, se desencadena una secuencia de eventos que dan como resultado una disminución de la vida media de los AChR de superficie, una reducción de su densidad y la consiguiente pérdida de regiones postsinápticas, lo que lleva a la fragmentación de las estructuras postsinápticas (Martinez-Pena y Akaaboune, 2021). En un trabajo anterior, donde se analizó la fragmentación, se describió cierta heterogeneidad en la clasificación de UNMs fragmentadas (Tremblay y cols., 2017), lo que sugiere que la aparición de fragmentación de las UNMs en diversas condiciones representa una variedad de fenotipos. En este sentido, nuestros análisis sobre la morfología y estabilidad de los dominios postsinápticos permitieron discriminar dos morfologías de UNM fragmentada: una definida y estable, observada principalmente tras la recuperación funcional, y una borrosa e inestable, predominante en las UNMs denervadas por resección del nervio facial, lo que sugiere que estas estructuras están relacionadas con la capacidad del dominio postsináptico para recuperar la funcionalidad tras la reinervación. De manera interesante, las morfologías fragmentadas definidas y estables corresponden a la mayor proporción de UNMs poli-inervadas (ver más adelante, sección 6.3). Así, la fragmentación definida-estable de la UNM causada por daño al nervio podría ser parte de un mecanismo adaptativo comparable al que ocurre durante el envejecimiento (Valdez y cols., 2010; Valdez y cols., 2012; Willadt y cols., 2016), ambos dirigidos a mantener la función motora.

Se ha argumentado que la fragmentación de la UNM podría aparecer en animales en cautiverio envejecidos debido a la rápida prolongación artificial de su esperanza de vida y la subsiguiente falta de mecanismos celulares adaptativos específicos para el envejecimiento que preserven la función motora (Robbins, 1992). Por el contrario, las UNMs humanas, significativamente más fragmentadas y de menor tamaño que las de ratón, casi no sufren cambios morfológicos a lo largo de su vida, permaneciendo estables independientemente del proceso de envejecimiento (Jones y cols., 2016). En músculos de ratas denervadas crónicamente, luego de 3, 6 y 9 meses se observan dominios postsinápticos altamente fragmentados y “encogidos” en comparación con dominios postsinápticos de músculos control (Mu y cols., 2018). Los autores de esta investigación proponen que la presencia de dominios postsinápticos, aun a tiempos prolongados de denervación del músculo, podría indicar que utilizando técnicas de microcirugía para reinervación tardía se lograría una recuperación funcional de la UNM (Mu y cols., 2018). Contrario a esta idea, evidencia previa obtenida en modelos murinos ha descrito que la reinervación tardía de fibras musculares (con UNMs con morfología de pretzel) no resulta en la recuperación de la función motora (Sakuma y cols., 2016). Sin embargo, un informe clínico reciente describió que músculos denervados por 5 meses en un paciente que sufrió una lesión nerviosa exhibían UNMs con morfología global normal, pero de menor tamaño respecto a los controles; de manera interesante, estas sinapsis recuperaron su función motora normal después de un año mediante trasplante nervioso (Chan y cols., 2020). Aunque la probabilidad de obtener resultados exitosos después de un daño al nervio es mayor en roedores que en humanos (Scheib y Höke, 2013), esta evidencia correlaciona la mayor

capacidad de resiliencia de la UNM del humano con su mayor fragmentación en condiciones normales. Considerando que las estructuras fragmentadas definidas-estables se encuentran en mayor proporción en el modelo regenerativo y se mantienen a tiempos prolongados luego de la reinervación y recuperación de la función motora, concluimos que dicho fenotipo específico de fragmentación podría ser una adaptación morfológica que permite que la reinervación de la UNM sea funcional.

### **6.3. Poli-inervación en el músculo LAL y recuperación de la transmisión sináptica**

En nuestro modelo de aplastamiento al nervio, la reinervación de los dominios postsinápticos ocurre más rápido que en modelos de aplastamiento del nervio ciático y análisis del músculo *tibialis anterior* (Magill y cols., 2007). Nuestros resultados revelan que la proporción de UNMs poli-inervadas permanece significativamente mayor hasta tres meses después del daño. Esta observación es consistente con experimentos que muestran que algunos músculos faciales mantienen un porcentaje significativamente mayor de UNMs poli-inervadas (~16%) después de la reinervación del músculo (Grosheva y cols., 2018). Mas aún, en algunas especies de ranas, existe un porcentaje significativo de fibras musculares poli-inervadas en estadio adulto (Herrera y Werle, 1990). Por otra parte, durante el desarrollo embrionario de la UNM, los agregados del AChR inmaduros, tipo placa, están principalmente poli-inervados, en contraste con los agregados maduros mono-inervados (Balice-Gordon y Lichtman, 1993). Estudios desarrollados durante

el período de maduración de la UNM se ha analizado la “fuerza” de los terminales nerviosos (definida por la cantidad de ACh liberada) de UNMs inmaduras poli-inervadas; dichos estudios han demostrado que la mayoría de las UNMs presentan un terminal nervioso más “fuerte” (Darabid, 2013 #265). La actividad sináptica de cada terminal nervioso es censada por las tSC, las que responden favoreciendo la permanencia de terminales nerviosos más “fuertes” (Darabid, 2013 #265), dando paso de UNMs poli-inervadas a mono-inervadas (Darabid, 2014 #181). De manera interesante, en algunas UNMs poli-inervadas no existe un terminal nervioso más “fuerte” que el otro y la estimulación de cualquiera de los axones que la inervan a una fibra muscular genera la misma respuesta en las tSC de la UNM poli-inervada (Darabid, 2013 #265). Esta similitud de la “fuerza” de la actividad sináptica en UNMs poli-inervadas durante el desarrollo podría explicar la correlación entre la persistencia de un porcentaje significativo de UNMs poli-inervadas con una recuperación funcional después de la regeneración de la UNM.

Nuestros resultados muestran que los dominios postsinápticos recientemente reinervados y poli-inervados corresponden a estructuras postsinápticas tipo pretzel, pero tanto un mes como tres meses luego del daño, las UNM poli-inervadas son principalmente de tipo fragmentado definido-estable, lo que sugiere una estrecha relación entre la poli-inervación persistente y la fragmentación postsináptica en la UNM.

Cabe mencionar que en este trabajo se evaluó la poli-inervación de la UNM mediante imágenes obtenidas por microscopía confocal en músculos teñidos por inmunohistoquímica, como se ha descrito en trabajos anteriores (Buffelli y cols.,

2002; Mech y cols., 2020). En este sentido, es importante destacar que se han extraído conclusiones más claras y definitivas a partir de experimentos realizados con animales transgénicos que poseen neuronas motoras que expresan diferentes proteínas fluorescentes (Tapia y cols., 2012). Aunque mejoramos nuestros análisis utilizando imágenes reconstruidas en 3D para distinguir a las UNMs que exhiben innervación múltiple, es posible que nuestro enfoque no discrimine eficazmente las ramificaciones axonales (provenientes de una misma neurona motora) de una verdadera poli-inervación (por axones de neuronas motoras distintas). A pesar de estas limitaciones experimentales, la idea de que el aumento de la poli-inervación o de las ramificaciones está relacionada con la fragmentación de la UNM como una respuesta funcional adaptativa después de la reinervación, está apoyada por nuestros experimentos funcionales que muestran que las fibras musculares reinervadas muestran una transmisión sináptica normal desde dos meses después de la lesión del nervio.

La hipótesis de que la fragmentación de la UNM está asociada a una disminución de la eficacia de la transmisión neuromuscular ha sido analizada al comparar músculos de animales de mediana edad (que presentan un 2,6% de sus UNMs altamente fragmentadas) con músculos de animales de edad avanzada (con un 22% de sus UNM altamente fragmentadas) (Willadt y cols., 2016). Al correlacionar los parámetros funcionales con el número de fragmentos de los dominios postsinápticos, los autores demostraron que las UNMs altamente fragmentadas de ratones envejecidos tenían una amplitud de corriente de potencial evocado (EPC) similar o incluso mayor que los de ratones de edad mediana (Willadt

y cols., 2016). A pesar de no haberse realizado en fibras musculares individuales, nuestros experimentos mostraron que la transmisión sináptica del músculo LAL, con cerca de un 80% de UNMs fragmentadas y más de un 30% de UNMs poli-inervadas, presentaba valores similares a los de los músculos control. En conjunto, estos hallazgos muestran que dos condiciones que resultan en un aumento en la fragmentación de la UNM –el envejecimiento y la reinervación de la UNM después de daño al nervio– se correlacionan con una transmisión sináptica normal, lo que refuerza la idea de que, más que un indicador del declive funcional de la UNM, esta alteración morfológica probablemente representa una respuesta adaptativa para la recuperación funcional de esta sinapsis. De forma interesante, un estudio comparativo ha demostrado que las UNMs del músculo LAL son particularmente resistentes al envejecimiento y a patologías (Valdez y cols., 2012). En este sentido, se desconoce si las UNMs de los músculos más activos o críticos para la movilidad de los organismos se adaptan de forma diferente a la denervación y la reinervación.

Es relevante mencionar que en este trabajo se evaluó la recuperación funcional (mediante registro intracelular) y los cambios morfológicos de la UNM en regiones de inervación distintas del músculo LAL, dadas las ventajas experimentales de cada región (Murray y cols., 2008; Arnold y cols., 2014; Ojeda, 2017). Sin embargo, cuando se analizó la posible relación entre la fragmentación y la poli-inervación de las UNM con la transmisión sináptica en una misma región de inervación, los resultados fueron idénticos, análisis que refuerzan el concepto de que la fragmentación y la poli-inervación de la UNM corresponderían a adaptaciones morfológicas para mantener la función de la sinapsis neuromuscular (Anexo 1).

#### **6.4. Células de Schwann terminales frente a daño degenerativo y regenerativo**

En el modelo de degeneración de la UNM de músculo LAL, el número de tSC por UNM disminuye significativamente y las SC (posiblemente tSC) en la periferia de la UNM aumentan su número para luego disminuir. Al respecto, en estudios realizados en ratas, en las que se transectó el nervio tibial, se observó que en períodos prolongados de tiempo sin que ocurriera regeneración axonal las SC de los segmentos distales del nervio tibial se volvían necróticas y el número de SC disminuyó significativamente, indicando que la denervación crónica resulta en la desaparición de las columnas de SC (bandas de Büngner) (Weinberg y Spencer, 1978). Por otra parte, en estudios previos realizados en conejos se observó que, en porciones distales de axones 26 meses luego de la resección del nervio, en la mayoría de los animales no se observan SC en los remanentes de las bandas de Büngner, pero en algunos animales se observan pequeños grupos de SC atrofiadas (Bradley y cols., 1998). De forma similar, estudios en ratas mostraron que la disminución de las SC correlacionaba con la existencia de pequeñas poblaciones de SC en porciones distales de axones intramusculares en músculos crónicamente denervados por más de 2 años (Dedkov y cols., 2002). En su conjunto, estos estudios revelan que la gran mayoría de las SC mueren si no son contactadas por axones en largos períodos de tiempo, lo que podría indicar que la disminución en el número de tSC que observamos en el presente trabajo de tesis es el resultado de la migración de las tSC fuera de la región sináptica y su posterior muerte celular.

Respecto a las tSC en el modelo de regeneración de la UNM, no encontramos diferencias significativas en la proporción de UNMs con proyecciones de tSC



durante la reinervación comparables a las observadas en los músculos de las extremidades posteriores después de una lesión por aplastamiento del nervio ciático (Reynolds y Woolf, 1992). Estos hallazgos podrían estar relacionados a que nuestro modelo corresponde a una lesión distal del nervio (próxima entre el sitio de daño y el músculo), lo que resulta en una reinervación más rápida que los modelos de daño en nervio ciático (lesión más proximal) (Magill y cols., 2007; Sakuma y cols., 2016). Lo anterior podría manifestarse en que las proyecciones de tSC están presentes por tiempos más cortos, considerando que los primeros contactos entre los axones motores y los dominios postsinápticos denervados ocurre a los 7 días luego del daño. Por otra parte, en estudios anteriores se ha demostrado que casi el 20% de las UNM de ratón adulto sin daño exhiben tSC con proyecciones (Hastings y cols., 2020), similar a lo que observamos en músculos control. De manera interesante, recientemente se ha reportado que la activación de las tSC disminuye a largo plazo luego de la reinervación de la UNM, evidenciando una memoria glial del daño en la UNM, que los autores de este trabajo asocian con un estado de alerta de las tSC luego del daño (Perez-Gonzalez, 2022 #266). Así, los cambios funcionales de las tSC descritos en trabajos previos podrían ser parte de un programa de adaptación de la UNM regenerada del que también podría ser parte la persistencia de UNMs poli-inervadas y fragmentadas en músculos LAL con recuperación funcional exitosa.

## **6.5. Efectos de la activación de la vía Wnt canónica en la reinervación de la UNM**

Los ligandos Wnt tienen distintos roles en la formación y maduración de la UNM (Henriquez y cols., 2008; Wang y cols., 2008; Jing y cols., 2009; Strohlic y cols., 2012; Li y cols., 2018). Se ha descrito que luego de la denervación de la UNM se activa la vía Wnt canónica en los núcleos subsinápticos (Kurimoto y cols., 2015). En el presente trabajo de tesis se observó que la activación farmacológica de la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM retrasa el contacto inicial de los dominios postsinápticos por axones motores regenerados. Adicionalmente, en UNMs reinervadas, la activación de la vía Wnt canónica resulta en axones motores de menor diámetro (Figura 46). Al respecto, estudios anteriores han descrito que la activación de la vía Wnt canónica, mediante la transfección con formas constitutivamente activas de  $\beta$ -catenina o el factor de transcripción Lef-1 (factor de transcripción de la familia TCF/Lef, blancos de la vía Wnt canónica) en explantes de neuronas de retina de ratón, inhibe significativamente el crecimiento de las neuritas (Ouchi y cols., 2005). Por otra parte, la transfección de estas células con formas dominantes negativas de  $\beta$ -catenina, que inhiben a la vía Wnt canónica, resulta en un aumento en el crecimiento de sus neuritas (Ouchi y cols., 2005). Adicionalmente, la activación de la vía de señalización Wnt canónica en células PC12 twnt (modelo celular de diferenciación neuronal que expresa constitutivamente Wnt-1), inhibe el crecimiento de neuritas inducido por NGF (Chou y cols., 2000). En base a esta evidencia, es posible sugerir que la activación de la vía Wnt canónica regula negativamente el crecimiento de proyecciones neuronales.

Respecto a los posibles mecanismos que regulen los efectos negativos observados en este trabajo de tesis, se debe considerar que para que ocurra la regeneración axonal es necesaria la extensión del axón, a través de la elongación de los microtúbulos, que está acoplada a la formación de lamelipodios de actina en los conos de crecimiento presentes en el extremo distal del axón (Bloom y Morgan, 2011). En cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal se reportó la formación de un complejo local de Gsk3 $\beta$ /Axina/ $\beta$ -catenina que participa en los mecanismos de colapso del cono de crecimiento gatillados por la Semaforina 3A (Hida y cols., 2012). Adicionalmente, se ha descrito que tanto el incremento como la disminución en la actividad de Gsk3 $\beta$  (quinasa que fosforila a  $\beta$ -catenina y gatilla su degradación, inhibiendo a la vía Wnt canónica) inhibe el crecimiento axonal mediante la regulación de la estabilidad de los microtúbulos a través la proteína CLASP (Hur y cols., 2011). En estos estudios, se inhibió Gsk3 $\beta$  y se observó una disminución significativa en el largo axonal de neuronas corticales (Hur y cols., 2011). De forma interesante, se ha descrito que la expresión de Dvl (proteína citoplasmática que inhibe la fosforilación de  $\beta$ -catenina, activando la vía Wnt canónica) en cultivos neuronales estabiliza a los microtúbulos en los conos de crecimiento (Ciani y cols., 2004). Sin embargo, esta actividad de Dvl no es dependiente de  $\beta$ -catenina o de los factores de transcripción TCF/Lef (blancos de la vía Wnt canónica); más aún, la expresión de  $\beta$ -catenina constitutivamente activa en cultivos neuronales disminuyó el número de microtúbulos estables (Ciani y cols., 2004). Por lo tanto, la disminución de UNMs reinervadas que observamos al activar la vía Wnt canónica podría deberse a un bloqueo en la protrusión de los microtúbulos (posiblemente estables) en el cono de crecimiento de los axones regenerados.

Contrario a lo reportado en esta investigación, trabajos previos han descrito que la activación de la vía de señalización Wnt canónica estimula el crecimiento axonal (Lucas y cols., 1998; Lambert y cols., 2016; Garcia y cols., 2018). De manera interesante, estudios en pez cebra han mostrado que la regeneración axonal luego de daño en la médula espinal requiere de la activación de la vía de señalización Wnt canónica (Wehner y cols., 2017). No obstante, se observó que la activación de la vía Wnt canónica es requerida en células que no corresponden a neuronas ni glías para la recuperación funcional eficiente. Es más, solo se describe que la activación de la vía Wnt canónica es requerida en el sitio de daño para el establecimiento del puente neuronal en la región dañada de la médula espinal (Wehner y cols., 2017). Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización Wnt canónica actúa en distintas regiones y tipos celulares, e incluso podría actuar en distintas ventanas de tiempo, para ejercer efectos pro regenerativos de la UNM.

Otro de los posibles efectos de la vía de señalización Wnt sobre la regeneración axonal tiene relación con sus efectos proinflamatorios. Si bien los efectos de las señales inflamatorias sobre la regeneración axonal son variados (Garcia y cols., 2018), se ha descrito que en modelos de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, el incremento de  $\beta$ -catenina en microglía está asociado a condiciones proinflamatorias patológicas (Halleskog y cols., 2011). Mediante análisis de expresión de genes, se observó que Wnt3a, que estabiliza a  $\beta$ -catenina en cultivos de microglía, incrementa la expresión de genes de respuesta inmune proinflamatoria (Halleskog y cols., 2011). Así, el incremento de factores proinflamatorios promovido por la activación de la vía Wnt canónica durante la

regeneración de la UNM podría de igual manera afectar negativamente la regeneración de los axones motores.

En base a esta evidencia, la activación de la vía Wnt canónica en el axón motor podría gatillar los defectos en el terminal nervioso que observamos a través de distintos mecanismos de acción que resulten en el retraso de la regeneración axonal. De manera interesante, se ha descrito que durante el desarrollo embrionario se expresan moléculas en las fibras musculares que regulan de forma retrógrada la diferenciación presináptica (Yumoto y cols., 2012). Al respecto, se ha reportado que la expresión de  $\beta$ -catenina constitutivamente activa en fibras musculares durante la formación de la UNM resulta en defectos en la diferenciación presináptica, aumentos en la arborización de los axones motores y desfasciculación (Wu y cols., 2012). Adicionalmente, en ratones en los que se silenció la expresión de  $\beta$ -catenina de forma específica en las fibras musculares, se observó una longitud mayor de las ramificaciones axonales secundarias (Li y cols., 2008). Estos hallazgos indican que la activación de la vía Wnt canónica en las fibras musculares tiene efectos negativos sobre la diferenciación y el crecimiento de los axones motores. En base a estos hallazgos y a los resultados de la presente investigación, es posible sugerir que los defectos en el terminal nervioso gatillados por la activación de la vía de señalización Wnt canónica podrían ser causados tanto directamente por la activación de la vía Wnt canónica en las neuronas motoras y alteraciones en el crecimiento axonal, como por la activación de la vía Wnt canónica en las fibras musculares y mecanismos de regulación retrógrada de los dominios postsinápticos sobre el terminal nervioso.

## **6.6. Efectos de la activación de la vía Wnt canónica en el dominio postsináptico**

En el presente trabajo de tesis, la activación de la vía Wnt durante la regeneración de la UNM no induce cambios en la morfología de los dominios postsinápticos. Lo contrario fue observado en trabajos anteriores, en los que el tratamiento con Wnt3a o la sobreexpresión de  $\beta$ -catenina en cultivos de miotubos C2C12 resulta en una disminución del número y del área de los agregados del AChR (Wang y cols., 2008). En roedores, el tratamiento con Wnt3a resulta en agregados del AChR de menor tamaño y más fragmentados; adicionalmente, se reporta una disminución en los niveles proteicos de rapsina (Wang y cols., 2008). Estos hallazgos podrían indicar que la vía Wnt canónica interfiere con la agregación de los AChR en la membrana postsináptica. Al respecto, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio, se ha utilizado el mismo protocolo de doble  $\alpha$ -BTX que se utilizó en el presente trabajo para analizar la estabilidad de los agregados del AChR al activar la vía de señalización Wnt con LiCl (Zelada y cols., 2021), un inhibidor de la quinasa Gsk3 $\beta$  usado como activador de la vía Wnt canónica (Klein y Melton, 1996; Hedgepeth y cols., 1997; Wang y cols., 2008; Vallée y cols., 2021). En UNM inervadas tratadas con LiCl existe una disminución en el recambio de los AChR de superficie, indicando una mayor estabilidad de los dominios postsinápticos (Zelada y cols., 2021). De manera interesante, al tratar músculos denervados con LiCl, se observa un aumento en el recambio de los AChR, existe mayor incorporación de receptores nuevos a la membrana, así como también un aumento de los receptores de superficie totales (Zelada y cols., 2021). Estos resultados indican una mayor inestabilidad de los dominios postsinápticos denervados al activar la vía Wnt

canónica. En base a estos hallazgos, especulamos que la activación de la vía Wnt canónica resulta en un aumento en la inestabilidad de los agregados del AChR, que no altera la morfología global de los dominios postsinápticos. Sin perjuicio de lo anterior, una interesante posibilidad es que la inestabilidad de los dominios postsinápticos podría de alguna manera regular mecanismos retrógrados sobre el dominio presináptico.

### **6.7. Efectos de la vía de señalización Wnt sobre las SC**

Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo no revelan cambios significativos en el comportamiento de las SC al activar la vía de señalización Wnt canónica, se ha descrito la participación de esta vía de señalización durante la diferenciación de las SC; tanto ligandos como receptores de la vía Wnt son expresados durante el desarrollo embrionario (Grigoryan, 2015 #262). En experimentos de silenciamiento de  $\beta$ -catenina se observó que el proceso de clasificación axonal (la mielinización de los axones durante el desarrollo embrionario) se ve retrasado significativamente (Grigoryan, 2013 #263). De forma interesante, se ha reportado que luego de lesiones desmielinizantes en la médula espinal la activación de la vía Wnt canónica inhibe la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos y la reparación luego del daño (Fancy, 2009 #264). Si bien la evidencia en daño se reportó en el CNS, estos resultados permiten sugerir que la activación de la vía Wnt canónica podría actuar de forma similar sobre las células gliales del SNP (SC) retrasando la re-mielinización y contribuyendo al

retraso en la reinervación de la UNM, como se observó en el presente trabajo de tesis.

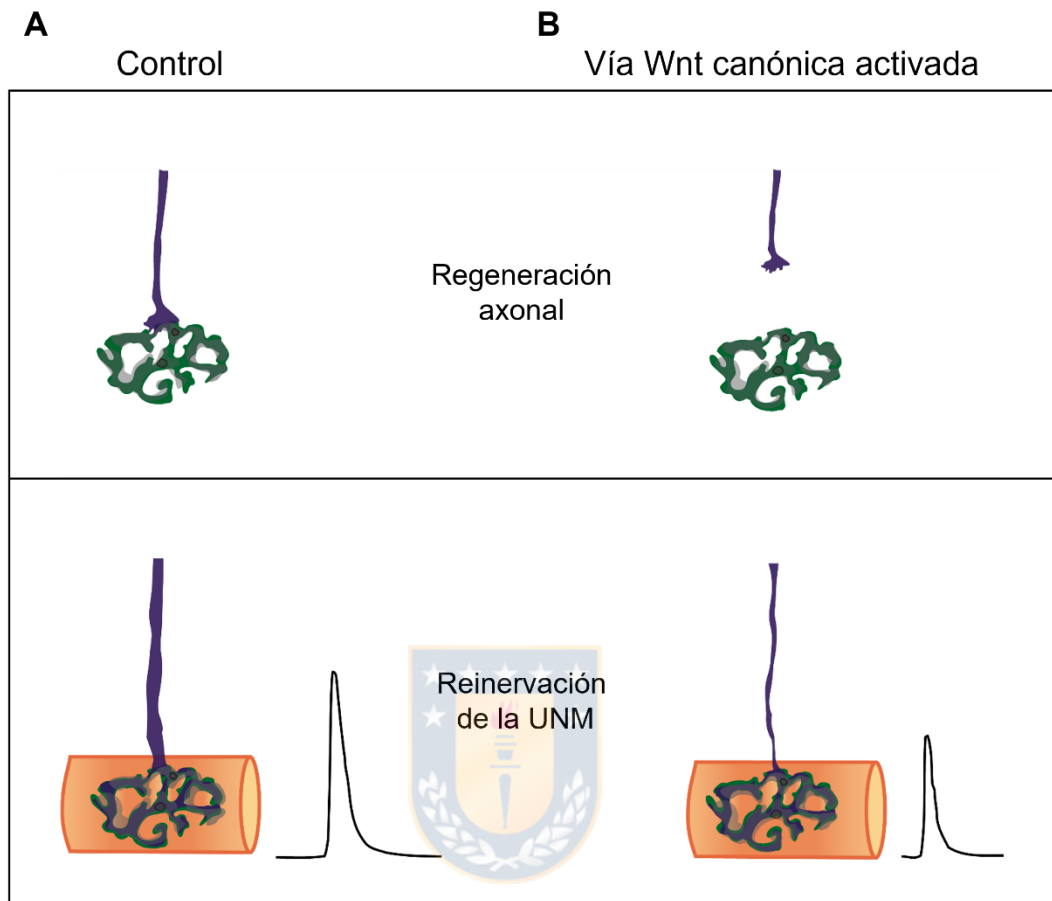
### **6.8. Efectos de la vía de señalización Wnt sobre la recuperación funcional de la UNM**

Una vez que ocurre la reinervación de los dominios postsinápticos, no observamos diferencias en el porcentaje de aposición entre el terminal nervioso y los agregados del AChR al activar la vía de señalización Wnt. En experimentos en los que se ha retrasado la reinervación de los dominios postsinápticos luego del daño mecánico al nervio, la reinervación de la UNM resulta en la recuperación de la morfología similar a la de UNMs controles, pero no resulta en una recuperación de la función motora (Sakuma y cols., 2016). En los resultados de la presente investigación, una vez que ocurre la reinervación de los dominios postsinápticos, no se observan diferencias en la morfología de la UNM al activar la vía de señalización Wnt canónica. Considerando que la recuperación de la morfología no es indicativa de la recuperación funcional, se analizó la recuperación de la transmisión sináptica al activar la vía Wnt canónica durante la regeneración de la UNM.

De forma similar a los experimentos de reinervación tardía de la UNM (Sakuma y cols., 2016), observamos defectos en la transmisión sináptica en músculos tratados con ANDRO (Figura 46). La disminución de la amplitud de las EPP y el tamaño del QC sugieren una menor liberación de vesículas sinápticas, dada por un menor número de vesículas en el terminal nervioso o bien por defectos en su exocitosis (Slater, 2015). Durante la diferenciación del terminal nervioso en la maduración de



la UNM, el cono de crecimiento axonal contiene relativamente pocas vesículas sinápticas, lo que resulta en potenciales de placa débiles y que están por debajo del umbral necesario para generar potenciales de acción muscular; al diferenciarse el terminal nervioso y aumentar el número de vesículas y con esto el contenido cuantal, los dominios presinápticos pueden gatillar potenciales de acción musculares (Sanes y Lichtman, 1999). Considerando que en este trabajo se observan defectos en la transmisión sináptica, retrasos en la reinervación y diámetros axonales menores, sugerimos que la activación de la vía Wnt canónica no solo retrasa la reinervación sino también la diferenciación presináptica que resulta en la conversión de un cono de crecimiento a un terminal presináptico. Al respecto, se ha descrito que el tratamiento con NGF y FGF (factores de crecimiento que diferencian cultivos de neuronas) de células PC12 que expresan constitutivamente Wnt-1 no resulta en la expresión de marcadores de diferenciación neuronal (Shackleford y cols., 1993). Estos hallazgos sugieren que la activación de la vía de señalización Wnt inhibe el programa de diferenciación neuronal, lo que podría explicar las deficiencias en la transmisión sináptica que observamos en las UNM regeneradas tratadas con ANDRO. Análisis de la ultraestructura de la UNM permitirán corroborar si existen defectos en la diferenciación presináptica del terminal motor regenerado al activar la vía Wnt canónica. Cabe mencionar que, en la dirección contraria a esta interpretación, en ratones mutantes donde la expresión de  $\beta$ -catenina fue silenciada de forma específica en las fibras musculares se reporta disminución en la frecuencia de las mEPP, lo que los autores atribuyen a defectos en la liberación de vesículas desde el terminal nervioso (Wu y cols., 2012).



**Figura 46: La vía Wnt canónica regula negativamente la regeneración de la UNM**

**(A)** Durante la regeneración de la UNM del músculo LAL, los primeros contactos de los axones regenerados con los dominios postsinápticos ocurren a los siete días luego del aplastamiento del nervio. Luego de 15 días del daño al nervio, todos los dominios postsinápticos se encuentran reinervados y existe transmisión sináptica.

**(B)** Al activar la vía Wnt canónica los primeros contactos entre los axones regenerados y los dominios postsinápticos se retrasan. En UNMs reinervadas, 15 días luego del daño, los axones motores son más delgados y existen defectos en la transmisión sináptica en comparación con UNMs reinervadas tratadas con vehículo.

### **6.8.1. Efectos de la inhibición de la vía de señalización Wnt sobre la recuperación funcional de la UNM**

Dado que la vía de señalización Wnt tiene efectos negativos sobre la regeneración de la UNM, como una aproximación para encontrar un posible blanco terapéutico para la regeneración de la UNM, se inhibió la vía de señalización Wnt utilizando también una aproximación farmacológica. Primeramente, se utilizó un inhibidor de la secreción de todos los ligandos Wnt y se observaron mejoras en algunos de los parámetros funcionales analizados, pero la mayor parte no muestra cambios en relación con el control. Más aún, la amplitud de los mEPP presenta una disminución discreta que podría explicarse por alteraciones del dominio post sináptico, tales como cambios en la densidad de los receptores, inestabilidad de los receptores o pérdida de regiones de los agregados del AChR (Muniak y cols., 1982). Estos efectos aparentemente opuestos de la inhibición de la secreción de ligandos Wnt son concordantes con los efectos reportados en cultivos de células musculares que fueron tratadas con distintos ligandos Wnt, donde se observaron efectos variados sobre la agregación de los AChR (Zhang y cols., 2012). Más aun, se han descrito efectos contrarios de los distintos ligandos sobre la diferenciación de la UNM (Henriquez y cols., 2008; Wang y cols., 2008; Jing y cols., 2009; Strohlic y cols., 2012; Li y cols., 2018). Así, concluimos que el efecto discreto del fármaco IWP-2 podría deberse a un balance entre los efectos de los distintos ligandos Wnt.

Una segunda aproximación farmacológica, más específica de acuerdo con los resultados que obtuvimos activando la vía Wnt canónica, fue utilizar el fármaco XAV-939, que inhibe específicamente la vía de señalización Wnt canónica (Sakata y Chen, 2011). Concordantemente con los resultados obtenidos sobre la

regeneración de la UNM al activar la vía Wnt canónica, obtuvimos resultados opuestos en la recuperación de la transmisión sináptica al tratar con XAV-939, evidenciado por un aumento significativo en la amplitud de los EPP, lo que podría estar correlacionado directamente con un mayor número de vesículas sinápticas (Slater, 2015) y, tal como fue mencionado anteriormente, con una mejora en la diferenciación presináptica.. Considerando los efectos positivos la inhibición de la vía Wnt canónica sobre la regeneración de la UNM y su posible uso como blanco terapéutico, existen ensayos clínicos de fármacos específicos para la inhibición de la vía Wnt canónica en otros contextos patológicos tales como cáncer (Harb y cols., 2019), que podrían ser usados para mejorar la regeneración de la UNM luego de daño mecánico a nervios periféricos en humanos.



## 7. CONCLUSIONES

En conjunto, nuestros resultados revelan efectos a largo plazo sobre la morfología y la estabilidad de la UNM después de una denervación y reinervación a corto plazo. Estos cambios sugieren que después del daño al nervio, se induce una reminiscencia en la UNM, que puede proponerse como una adaptación morfológica de los componentes celulares de esta sinapsis para lograr una recuperación funcional exitosa. Así, la capacidad de los componentes celulares de la sinapsis neuromuscular para establecer un nicho permisivo para la regeneración de la UNM podría manifestarse en adaptaciones morfológicas que reflejen la capacidad del músculo denervado para recuperar la función motora tras la reinervación. Estos nuevos hallazgos podrían ser relevantes para desarrollar herramientas de diagnóstico que permitan definir si los músculos denervados en humanos podrían recuperar la función motora y, eventualmente, manipular el comportamiento de los componentes celulares de la UNMs para lograr una regeneración funcional exitosa.

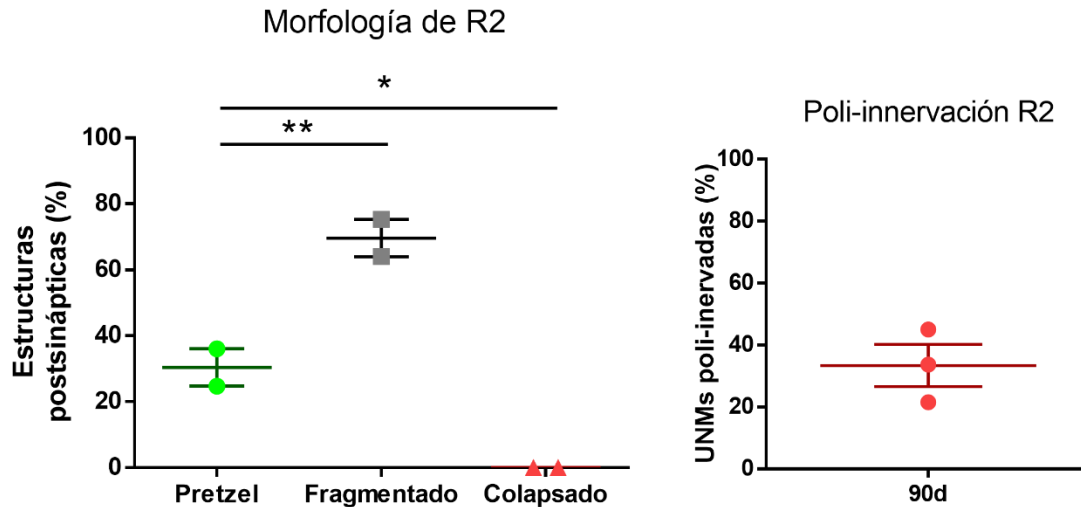
Por otra parte, la activación de la vía de señalización Wnt canónica retrasa el contacto entre el axón motor regenerado y los dominios postsinápticos denervados y gatilla defectos en la transmisión sináptica de las UNMs regeneradas. Los efectos de la activación de la vía Wnt canónica sobre la regeneración de la UNM podrían ser causados por defectos en la regeneración axonal y en la diferenciación del terminal presináptico. La inhibición farmacológica de la secreción de ligandos Wnt no resultó en cambios significativos en la recuperación de la transmisión sináptica, en línea con los efectos opuestos descritos para distintos ligandos Wnt. Por otra parte, la inhibición farmacológica específica de la vía Wnt canónica, resulta en la mejora de distintos parámetros sinápticos, de forma concordante a los resultados

obtenidos con ANDRO. Por lo tanto, nuestros resultados revelan un efecto negativo de la vía de señalización Wnt canónica en la regeneración de la UNM.

Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un aporte para entender el proceso de regeneración de la UNM y podrían ser relevantes en la búsqueda de blancos terapéuticos que mantengan un nicho regenerativo y permitan que la reinervación tardía de la UNM mediante técnicas de microcirugía resulte en la recuperación funcional exitosa, o bien en el desarrollo de estrategias farmacológicas que estimulen la regeneración de la UNM luego de daño al nervio.



## 8. ANEXOS



### Anexo 1: Las adaptaciones morfológicas de la UNM regenerada se generan en todo el músculo LAL.

En regiones de inervación R2 de músculos LAL 90 días luego del aplastamiento del nervio se analizó la estructura de las morfologías de los dominios postsinápticos, clasificándolos en estructuras tipo pretzel (círculos verdes), fragmentadas (cuadrados grises), y colapsadas (triángulos rojos) (**gráfico de la izquierda**). Adicionalmente se cuantificó la proporción de UNMs poli-inervadas de la región R2 y se expresó como el porcentaje respecto a las UNMs totales observadas (**gráfico de la derecha**). Los resultados representan el promedio  $\pm$  SEM de N: 2 ratones. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ), prueba de ANOVA de una vía.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Akaaboune, M., S. M. Culican, S. G. Turney and J. W. Lichtman (1999). "Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo." Science **286**(5439): 503-507.
2. Alvites, R., A. Rita Caseiro, S. Santos Pedrosa, M. Vieira Branquinho, G. Ronchi, S. Geuna, A. S. P. Varejão and A. Colette Maurício (2018). "Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances." Cogent Medicine **5**(1): 1466404.
3. Arnold, A. S., J. Gill, M. Christe, R. Ruiz, S. McGuirk, J. St-Pierre, L. Tabares and C. Handschin (2014). "Morphological and functional remodelling of the neuromuscular junction by skeletal muscle PGC-1 $\alpha$ ." Nat Commun **5**: 3569.
4. Audouard, E., O. Schakman, F. René, R. E. Huettl, A. B. Huber, J. P. Loeffler, P. Gailly and F. Clotman (2012). "The Onecut transcription factor HNF-6 regulates in motor neurons the formation of the neuromuscular junctions." PLoS One **7**(12): e50509.
5. Auld, D. S. and R. Robitaille (2003). "Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Junction: Nerve- and Activity-Dependent Contributions to Synaptic Efficacy, Plasticity, and Reinnervation." The Neuroscientist **9**(2): 144-157.
6. Avilés, E. C., C. Pinto, P. Hanna, J. Ojeda, V. Pérez, G. V. De Ferrari, P. Zamorano, M. Albistur, D. Sandoval and J. P. Henríquez (2014). "Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells." Front Cell Neurosci **8**: 110.
7. Balice-Gordon, R. J. and J. W. Lichtman (1993). "In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions." J Neurosci **13**(2): 834-855.
8. Barik, A., Y. Lu, A. Sathyamurthy, A. Bowman, C. Shen, L. Li, W. C. Xiong and L. Mei (2014). "LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance." J Neurosci **34**(42): 13892-13905.



9. Blasco, A., S. Gras, G. Mòdol-Caballero, O. Tarabal, A. Casanovas, L. Piedrafita, A. Barranco, T. Das, S. L. Pereira, X. Navarro, R. Rueda, J. E. Esquerda and J. Calderó (2020). "Motoneuron deafferentation and gliosis occur in association with neuromuscular regressive changes during ageing in mice." J Cachexia Sarcopenia Muscle **11**(6): 1628-1660.
10. Bloch-Gallego, E. (2015). "Mechanisms controlling neuromuscular junction stability." Cell Mol Life Sci **72**(6): 1029-1043.
11. Bloom, O. E. and J. R. Morgan (2011). "Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration." Mol Cell Neurosci **48**(4): 339-348.
12. Boehm, I., A. Alhindi, A. S. Leite, C. Logie, A. Gibbs, O. Murray, R. Farrukh, R. Pirie, C. Proudfoot, R. Clutton, T. M. Wishart, R. A. Jones and T. H. Gillingwater (2020). "Comparative anatomy of the mammalian neuromuscular junction." J Anat **237**(5): 827-836.
13. Bolliger, M. F., A. Zurlinden, D. Lüscher, L. Bütikofer, O. Shakhova, M. Francolini, S. V. Kozlov, P. Cinelli, A. Stephan, A. D. Kistler, T. Rüllicke, P. Pelczar, B. Ledermann, G. Fumagalli, S. M. Gloor, B. Kunz and P. Sonderegger (2010). "Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction." J Cell Sci **123**(Pt 22): 3944-3955.
14. Bowen, D. C., J. S. Park, S. Bodine, J. L. Stark, D. M. Valenzuela, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos, R. M. Lindsay, D. J. Glass and P. S. DiStefano (1998). "Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction." Dev Biol **199**(2): 309-319.
15. Boyd, I. A. and A. R. Martin (1956). "The end-plate potential in mammalian muscle." J Physiol **132**(1): 74-91.
16. Bradley, J. L., D. A. Abernethy, R. H. King, J. R. Muddle and P. K. Thomas (1998). "Neural architecture in transected rabbit sciatic nerve after prolonged nonreinnervation." J Anat **192 ( Pt 4)**(Pt 4): 529-538.
17. Bruneau, E. G. and M. Akaaboune (2006). "The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo." Development **133**(22): 4485-4493.

18. Buckley, K. and R. B. Kelly (1985). "Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells." J Cell Biol **100**(4): 1284-1294.
19. Buffelli, M., G. Busetto, L. Cangiano and A. Cangiano (2002). "Perinatal switch from synchronous to asynchronous activity of motoneurons: link with synapse elimination." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13200-13205.
20. Burnett, M. G. and E. L. Zager (2004). "Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review." Neurosurg Focus **16**(5): E1.
21. Carrasco, D. I., K. L. Seburn and M. J. Pinter (2016). "Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice." Exp Neurol **275 Pt 1**(0 1): 172-181.
22. Castro, R., T. Taetzsch, S. K. Vaughan, K. Godbe, J. Chappell, R. E. Settlege and G. Valdez (2020). "Specific labeling of synaptic schwann cells reveals unique cellular and molecular features." Elife **9**.
23. Chan, J. P., J. Clune, S. B. Shah, S. R. Ward, J. D. Kocsis, T. Mozaffar, O. Steward and R. Gupta (2020). "Examination of the human motor endplate after brachial plexus injury with two-photon microscopy." Muscle Nerve **61**(3): 390-395.
24. Changeux, J. P., M. Kasai and C. Y. Lee (1970). "Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(3): 1241-1247.
25. Chen, V. S., J. P. Morrison, M. F. Southwell, J. F. Foley, B. Bolon and S. A. Elmore (2017). "Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5." Toxicol Pathol **45**(6): 705-744.
26. Choi, D. and G. Raisman (2002). "Somatotopic organization of the facial nucleus is disrupted after lesioning and regeneration of the facial nerve: the histological representation of synkinesis." Neurosurgery **50**(2): 355-362; discussion 362-353.
27. Chou, A. H., S. Zheng, T. Itsukaichi and B. D. Howard (2000). "Wnt-1 inhibits nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by preventing the

- induction of some but not all late-response genes." Brain Res Mol Brain Res **77**(2): 232-245.
28. Ciani, L., O. Krylova, M. J. Smalley, T. C. Dale and P. C. Salinas (2004). "A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules." J Cell Biol **164**(2): 243-253.
29. Ciani, L. and P. C. Salinas (2005). "WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity." Nat Rev Neurosci **6**(5): 351-362.
30. Cipriani, S., V. Phan, J. J. Médard, R. Horvath, H. Lochmüller, R. Chrast, A. Roos and S. Spendiff (2018). "Neuromuscular Junction Changes in a Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 4C." Int J Mol Sci **19**(12).
31. Cisterna, B. A., C. Cardozo and J. C. Sáez (2014). "Neuronal involvement in muscular atrophy." Front Cell Neurosci **8**: 405.
32. Cruciat, C. M. and C. Niehrs (2013). "Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a015081.
33. Darabid, H., A. P. Perez-Gonzalez and R. Robitaille (2014). "Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions." Nat Rev Neurosci **15**(11): 703-718.
34. de Oliveira, G. P., J. R. Maximino, M. Maschietto, E. Zanoteli, R. D. Puga, L. Lima, D. M. Carraro and G. Chadi (2014). "Early gene expression changes in skeletal muscle from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model." Cell Mol Neurobiol **34**(3): 451-462.
35. DeChiara, T. M., D. C. Bowen, D. M. Valenzuela, M. V. Simmons, W. T. Poueymirou, S. Thomas, E. Kinetz, D. L. Compton, E. Rojas, J. S. Park, C. Smith, P. S. DiStefano, D. J. Glass, S. J. Burden and G. D. Yancopoulos (1996). "The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo." Cell **85**(4): 501-512.
36. Dedkov, E. I., T. Y. Kostrominova, A. B. Borisov and B. M. Carlson (2002). "Survival of Schwann cells in chronically denervated skeletal muscles." Acta Neuropathol **103**(6): 565-574.
37. Dobrowolny, G., M. Martini, B. M. Scicchitano, V. Romanello, S. Boncompagni, C. Nicoletti, L. Pietrangelo, S. De Panfilis, A. Catizone, M. Bouchè, M. Sandri, R.

- Rudolf, F. Protasi and A. Musarò (2018). "Muscle Expression of SOD1(G93A) Triggers the Dismantlement of Neuromuscular Junction via PKC-Theta." Antioxid Redox Signal **28**(12): 1105-1119.
38. Dodd, J., S. B. Morton, D. Karagogeos, M. Yamamoto and T. M. Jessell (1988). "Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons." Neuron **1**(2): 105-116.
39. Duraikannu, A., A. Krishnan, A. Chandrasekhar and D. W. Zochodne (2019). "Beyond Trophic Factors: Exploiting the Intrinsic Regenerative Properties of Adult Neurons." Front Cell Neurosci **13**: 128.
40. Eguchi, T., T. Tezuka, S. Miyoshi and Y. Yamanashi (2016). "Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology." Genes Cells **21**(6): 670-676.
41. Ferraro, E., F. Molinari and L. Berghella (2012). "Molecular control of neuromuscular junction development." J Cachexia Sarcopenia Muscle **3**(1): 13-23.
42. Ferrer-Vaquero, A., A. Piliszek, G. Tian, R. J. Aho, D. Dufort and A. K. Hadjantonakis (2010). "A sensitive and bright single-cell resolution live imaging reporter of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the mouse." BMC Dev Biol **10**: 121.
43. Flanagan-Steet, H., M. A. Fox, D. Meyer and J. R. Sanes (2005). "Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations." Development **132**(20): 4471-4481.
44. Frank, E., K. Gautvik and H. Sommerschild (1976). "Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **40**: 275-281.
45. Fuertes-Alvarez, S. and A. Izeta (2021). "Terminal Schwann Cell Aging: Implications for Age-Associated Neuromuscular Dysfunction." Aging Dis **12**(2): 494-514.
46. Garcia, A. L., A. Udeh, K. Kalahasty and A. S. Hackam (2018). "A growing field: The regulation of axonal regeneration by Wnt signaling." Neural Regen Res **13**(1): 43-52.

47. Gautam, M., P. G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R. H. Scheller, J. P. Merlie and J. R. Sanes (1996). "Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice." Cell **85**(4): 525-535.
48. Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." J Biol Chem **281**(32): 22429-22433.
49. Griffin, J. W., B. Pan, M. A. Polley, P. N. Hoffman and M. H. Farah (2010). "Measuring nerve regeneration in the mouse." Exp Neurol **223**(1): 60-71.
50. Grosheva, M., S. Rink, R. Jansen, H. Bendella, S. P. Pavlov, L. Sarikcioglu, D. N. Angelov and S. A. Dunlop (2018). "Early and continued manual stimulation is required for long-term recovery after facial nerve injury." Muscle Nerve **57**(1): 100-106.
51. Guo, W., F. Shen, W. Xiao, J. Chen and F. Pan (2017). "Wnt inhibitor XAV939 suppresses the viability of small cell lung cancer NCI-H446 cells and induces apoptosis." Oncol Lett **14**(6): 6585-6591.
52. Guzzini, M., S. Raffa, S. Geuna, S. Nicolino, M. R. Torrisi, P. Tos, B. Battiston, F. Grassi and A. Ferretti (2008). "Denervation-related changes in acetylcholine receptor density and distribution in the rat flexor digitorum sublimis muscle." Ital J Anat Embryol **113**(4): 209-216.
53. Haddix, S. G., Y. I. Lee, J. N. Kornegay and W. J. Thompson (2018). "Cycles of myofiber degeneration and regeneration lead to remodeling of the neuromuscular junction in two mammalian models of Duchenne muscular dystrophy." PLoS One **13**(10): e0205926.
54. Hadwiger, G., S. Dour, S. Arur, P. Fox and M. L. Nonet (2010). "A monoclonal antibody toolkit for *C. elegans*." PLoS One **5**(4): e10161.
55. Halleskog, C., J. Mulder, J. Dahlström, K. Mackie, T. Hortobágyi, H. Tanila, L. Kumar Puli, K. Färber, T. Harkany and G. Schulte (2011). "WNT signaling in activated microglia is proinflammatory." Glia **59**(1): 119-131.
56. Harb, J., P. J. Lin and J. Hao (2019). "Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics." Curr Oncol Rep **21**(2): 12.

57. Hastings, R. L., M. Mikesch, Y. I. Lee and W. J. Thompson (2020). "Morphological remodeling during recovery of the neuromuscular junction from terminal Schwann cell ablation in adult mice." Sci Rep **10**(1): 11132.
58. Hedgepeth, C. M., L. J. Conrad, J. Zhang, H. C. Huang, V. M. Lee and P. S. Klein (1997). "Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action." Dev Biol **185**(1): 82-91.
59. Henriquez, J. P., A. Webb, M. Bence, H. Bildsoe, M. Sahores, S. M. Hughes and P. C. Salinas (2008). "Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18812-18817.
60. Herrera, A. A. and M. J. Werle (1990). "Mechanisms of elimination, remodeling, and competition at frog neuromuscular junctions." J Neurobiol **21**(1): 73-98.
61. Hida, T., N. Yamashita, H. Usui, F. Nakamura, Y. Sasaki, A. Kikuchi and Y. Goshima (2012). "GSK3 $\beta$ /axin-1/ $\beta$ -catenin complex is involved in semaphorin3A signaling." J Neurosci **32**(35): 11905-11918.
62. Hoke, A. (2006). "Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans?" Nat Clin Pract Neurol **2**(8): 448-454.
63. Huang, L.-K. and M.-J. J. Wang (1995). "Image thresholding by minimizing the measures of fuzziness." Pattern Recognition **28**(1): 41-51.
64. Huang, X., J. Jiang and J. Xu (2021). "Denervation-Related Neuromuscular Junction Changes: From Degeneration to Regeneration." Front Mol Neurosci **14**: 810919.
65. Hur, E. M., Saijilafu, B. D. Lee, S. J. Kim, W. L. Xu and F. Q. Zhou (2011). "GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules." Genes Dev **25**(18): 1968-1981.
66. Husseman, J. and R. P. Mehta (2008). "Management of synkinesis." Facial Plast Surg **24**(2): 242-249.
67. Inoue, A., K. Setoguchi, Y. Matsubara, K. Okada, N. Sato, Y. Iwakura, O. Higuchi and Y. Yamanashi (2009). "Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation." Sci Signal **2**(59): ra7.

68. Jessen, K. R., R. Mirsky and A. C. Lloyd (2015). "Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(7): a020487.
69. Jing, L., J. L. Lefebvre, L. R. Gordon and M. Granato (2009). "Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor." Neuron **61**(5): 721-733.
70. Jones, R. A., C. Harrison, S. L. Eaton, M. Llaverro Hurtado, L. C. Graham, L. Alkhamash, O. A. Oladiran, A. Gale, D. J. Lamont, H. Simpson, M. W. Simmen, C. Soeller, T. M. Wishart and T. H. Gillingwater (2017). "Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction." Cell Rep **21**(9): 2348-2356.
71. Jones, R. A., C. D. Reich, K. N. Dissanayake, F. Kristmundsdottir, G. S. Findlater, R. R. Ribchester, M. W. Simmen and T. H. Gillingwater (2016). "NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction." Open Biol **6**(12).
72. Kang, H., L. Tian, M. Mikesh, J. W. Lichtman and W. J. Thompson (2014). "Terminal Schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury." J Neurosci **34**(18): 6323-6333.
73. Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8455-8459.
74. Ko, C. P. and R. Robitaille (2015). "Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(10): a020503.
75. Koles, K. and V. Budnik (2012). "Wnt signaling in neuromuscular junction development." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(6).
76. Kurimoto, S., J. Jung, M. Tapadia, J. Lengfeld, D. Agalliu, M. Waterman, T. Mozaffar and R. Gupta (2015). "Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury." Neuroscience **294**: 101-108.
77. Lacazette, E., S. Le Calvez, N. Gajendran and H. R. Brenner (2003). "A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation." J Cell Biol **161**(4): 727-736.
78. Lambert, C., P. Cisternas and N. C. Inestrosa (2016). "Role of Wnt Signaling in Central Nervous System Injury." Mol Neurobiol **53**(4): 2297-2311.

79. Langford, D. J., A. L. Bailey, M. L. Chanda, S. E. Clarke, T. E. Drummond, S. Echols, S. Glick, J. Ingrao, T. Klassen-Ross, M. L. Lacroix-Fralish, L. Matsumiya, R. E. Sorge, S. G. Sotocinal, J. M. Tabaka, D. Wong, A. M. van den Maagdenberg, M. D. Ferrari, K. D. Craig and J. S. Mogil (2010). "Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse." Nat Methods **7**(6): 447-449.
80. Li, L., W. C. Xiong and L. Mei (2018). "Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders." Annu Rev Physiol **80**: 159-188.
81. Li, X. M., X. P. Dong, S. W. Luo, B. Zhang, D. H. Lee, A. K. Ting, H. Neiswender, C. H. Kim, E. Carpenter-Hyland, T. M. Gao, W. C. Xiong and L. Mei (2008). "Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin." Nat Neurosci **11**(3): 262-268.
82. Lin, W., B. Dominguez, J. Yang, P. Aryal, E. P. Brandon, F. H. Gage and K. F. Lee (2005). "Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism." Neuron **46**(4): 569-579.
83. Lømo, T. (2003). "What controls the position, number, size, and distribution of neuromuscular junctions on rat muscle fibers?" J Neurocytol **32**(5-8): 835-848.
84. Lucas, F. R., R. G. Goold, P. R. Gordon-Weeks and P. C. Salinas (1998). "Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium." J Cell Sci **111** ( Pt **10**): 1351-1361.
85. Magill, C. K., A. Tong, D. Kawamura, A. Hayashi, D. A. Hunter, A. Parsadonian, S. E. Mackinnon and T. M. Myckatyn (2007). "Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice." Exp Neurol **207**(1): 64-74.
86. Magnusson, C., A. Svensson, U. Christerson and S. Tågerud (2005). "Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle." Eur J Neurosci **21**(2): 577-580.
87. Marques, M. J., J. A. Conchello and J. W. Lichtman (2000). "From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction." J Neurosci **20**(10): 3663-3675.



88. Martinez-Pena, Y. V. I. and M. Akaaboune (2021). "The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction." Cells **10**(2).
89. Mech, A. M., A. L. Brown, G. Schiavo and J. N. Sleigh (2020). "Morphological variability is greater at developing than mature mouse neuromuscular junctions." J Anat **237**(4): 603-617.
90. Menorca, R. M., T. S. Fussell and J. C. Elfar (2013). "Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery." Hand Clin **29**(3): 317-330.
91. Miller, J. R. (2002). "The Wnts." Genome Biol **3**(1): Reviews3001.
92. Moloney, E. B., F. de Winter and J. Verhaagen (2014). "ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease." Front Neurosci **8**: 252.
93. Mu, L., J. Chen, J. Li, T. Nyirenda, M. Fowkes and S. Sobotka (2018). "Immunohistochemical Detection of Motor Endplates in the Long-Term Denervated Muscle." J Reconstr Microsurg **34**(5): 348-358.
94. Muniak, C. G., M. E. Kriebel and C. G. Carlson (1982). "Changes in MEPP and EPP amplitude distributions in the mouse diaphragm during synapse formation and degeneration." Brain Res **281**(2): 123-138.
95. Murray, L. M., L. H. Comley, D. Thomson, N. Parkinson, K. Talbot and T. H. Gillingwater (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**(7): 949-962.
96. Murray, L. M., T. H. Gillingwater and S. H. Parson (2010). "Using mouse cranial muscles to investigate neuromuscular pathology in vivo." Neuromuscul Disord **20**(11): 740-743.
97. Negro, S., F. Lessi, E. Duregotti, P. Aretini, M. La Ferla, S. Franceschi, M. Menicagli, E. Bergamin, E. Radice, M. Thelen, A. Megighian, M. Pirazzini, C. M. Mazzanti, M. Rigoni and C. Montecucco (2017). "CXCL12 $\alpha$ /SDF-1 from perisynaptic Schwann cells promotes regeneration of injured motor axon terminals." EMBO Mol Med **9**(8): 1000-1010.

98. Niederkofler, V., T. Baeriswyl, R. Ott and E. T. Stoeckli (2010). "Nectin-like molecules/SynCAMs are required for post-crossing commissural axon guidance." Development **137**(3): 427-435.
99. Niehrs, C. (2012). "The complex world of WNT receptor signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(12): 767-779.
100. Ojeda, J. (2017). Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la maduración y mantención del aparato postsináptico de la UNM de vertebrados mediados por el receptor Fzd9. Doctor, Universidad de Concepción.
101. Ojeda, J., F. Bermedo-García, V. Pérez, J. Mella, P. Hanna, D. Herzberg, R. Tejero, M. López-Manzaneda, L. Tabares and J. P. Henríquez (2020). "The Mouse Levator Auris Longus Muscle: An Amenable Model System to Study the Role of Postsynaptic Proteins to the Maintenance and Regeneration of the Neuromuscular Synapse." Front Cell Neurosci **14**: 225.
102. Olmstead, D. N., N. A. Mesnard-Hoaglin, R. J. Batka, M. M. Haulcomb, W. M. Miller and K. J. Jones (2015). "Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury." J Vis Exp(96): e52382.
103. Ouchi, Y., Y. Tabata, K. Arai and S. Watanabe (2005). "Negative regulation of retinal-neurite extension by beta-catenin signaling pathway." J Cell Sci **118**(Pt 19): 4473-4483.
104. Palispis, W. A. and R. Gupta (2017). "Surgical repair in humans after traumatic nerve injury provides limited functional neural regeneration in adults." Exp Neurol **290**: 106-114.
105. Pérez, V., F. Bermedo-García, D. Zelada, F. A. Court, M. Pérez, M. Fuenzalida, J. Ábrigo, C. Cabello-Verrugio, G. Moya-Alvarado, J. C. Tapia, V. Valenzuela, C. Hetz, F. C. Bronfman and J. P. Henríquez (2019). "The p75(NTR) neurotrophin receptor is required to organize the mature neuromuscular synapse by regulating synaptic vesicle availability." Acta Neuropathol Commun **7**(1): 147.
106. Pratt, S. J. P., A. P. Valencia, G. K. Le, S. B. Shah and R. M. Lovering (2015). "Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice." Front Physiol **6**: 252.

107. Reynolds, M. L. and C. J. Woolf (1992). "Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate." J Neurocytol **21**(1): 50-66.
108. Robbins, N. (1992). "Compensatory plasticity of aging at the neuromuscular junction." Exp Gerontol **27**(1): 75-81.
109. Rotshenker, S. (2011). "Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury." J Neuroinflammation **8**: 109.
110. Sakata, T. and J. K. Chen (2011). "Chemical 'Jekyll and Hyde's: small-molecule inhibitors of developmental signaling pathways." Chem Soc Rev **40**(8): 4318-4331.
111. Sakuma, M., G. Gorski, S. H. Sheu, S. Lee, L. B. Barrett, B. Singh, T. Omura, A. Latremoliere and C. J. Woolf (2016). "Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure." Eur J Neurosci **43**(3): 451-462.
112. Salinas, P. C. and Y. Zou (2008). "Wnt signaling in neural circuit assembly." Annu Rev Neurosci **31**: 339-358.
113. Sandrock, A. W., Jr., S. E. Dryer, K. M. Rosen, S. N. Gozani, R. Kramer, L. E. Theill and G. D. Fischbach (1997). "Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction in vivo." Science **276**(5312): 599-603.
114. Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (1999). "Development of the vertebrate neuromuscular junction." Annu Rev Neurosci **22**: 389-442.
115. Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). "Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus." Nat Rev Neurosci **2**(11): 791-805.
116. Santosa, K. B., A. M. Keane, A. Jablonka-Shariff, B. Vannucci and A. K. Snyder-Warwick (2018). "Clinical relevance of terminal Schwann cells: An overlooked component of the neuromuscular junction." J Neurosci Res **96**(7): 1125-1135.
117. Scheib, J. and A. Höke (2013). "Advances in peripheral nerve regeneration." Nat Rev Neurol **9**(12): 668-676.

118. Schiaffino, S., K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw and M. Sandri (2013). "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy." Febs j **280**(17): 4294-4314.
119. Shackleford, G. M., K. Willert, J. Wang and H. E. Varmus (1993). "The Wnt-1 proto-oncogene induces changes in morphology, gene expression, and growth factor responsiveness in PC12 cells." Neuron **11**(5): 865-875.
120. Shi, L., A. K. Fu and N. Y. Ip (2012). "Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction." Trends Neurosci **35**(7): 441-453.
121. Shiao, T., A. Fond, B. Deng, M. Wehling-Henricks, M. E. Adams, S. C. Froehner and J. G. Tidball (2004). "Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha- and beta1-syntrophins." Hum Mol Genet **13**(17): 1873-1884.
122. Slater, C. R. (2008). "Reliability of neuromuscular transmission and how it is maintained." Handb Clin Neurol **91**: 27-101.
123. Slater, C. R. (2015). "The functional organization of motor nerve terminals." Prog Neurobiol **134**: 55-103.
124. Sleight, J. N., S. J. Grice, R. W. Burgess, K. Talbot and M. Z. Cader (2014). "Neuromuscular junction maturation defects precede impaired lower motor neuron connectivity in Charcot-Marie-Tooth type 2D mice." Hum Mol Genet **23**(10): 2639-2650.
125. Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells." Neuron **14**(1): 133-141.
126. Son, Y. J. and W. J. Thompson (1995). "Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons." Neuron **14**(1): 125-132.
127. Stochlic, L., J. Falk, E. Goillot, S. Sigoillot, F. Bourgeois, P. Delers, J. Rouvière, A. Swain, V. Castellani, L. Schaeffer and C. Legay (2012). "Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction." PLoS One **7**(1): e29976.

128. Sugiura, Y. and W. Lin (2011). "Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function." Biosci Rep **31**(5): 295-302.
129. Tapia-Rojas, C., A. Schüller, C. B. Lindsay, R. C. Ureta, C. Mejías-Reyes, J. Hancke, F. Melo and N. C. Inestrosa (2015). "Andrographolide activates the canonical Wnt signalling pathway by a mechanism that implicates the non-ATP competitive inhibition of GSK-3 $\beta$ : autoregulation of GSK-3 $\beta$  in vivo." Biochem J **466**(2): 415-430.
130. Tapia, J. C., J. D. Wylie, N. Kasthuri, K. J. Hayworth, R. Schalek, D. R. Berger, C. Guatimosim, H. S. Seung and J. W. Lichtman (2012). "Pervasive synaptic branch removal in the mammalian neuromuscular system at birth." Neuron **74**(5): 816-829.
131. Thomas, C. K., R. B. Stein, T. Gordon, R. G. Lee and M. G. Elleker (1987). "Patterns of reinnervation and motor unit recruitment in human hand muscles after complete ulnar and median nerve section and resuture." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(3): 259-268.
132. Tintignac, L. A., H. R. Brenner and M. A. Rüegg (2015). "Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting." Physiol Rev **95**(3): 809-852.
133. Tremblay, E., É. Martineau and R. Robitaille (2017). "Opposite Synaptic Alterations at the Neuromuscular Junction in an ALS Mouse Model: When Motor Units Matter." J Neurosci **37**(37): 8901-8918.
134. Urakami, H. and A. Y. Chiu (1990). "A monoclonal antibody that recognizes somatic motor neurons in the mature rat nervous system." J Neurosci **10**(2): 620-630.
135. Valdez, G., J. C. Tapia, H. Kang, G. D. Clemenson, Jr., F. H. Gage, J. W. Lichtman and J. R. Sanes (2010). "Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(33): 14863-14868.

136. Valdez, G., J. C. Tapia, J. W. Lichtman, M. A. Fox and J. R. Sanes (2012). "Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles." PLoS One **7**(4): e34640.
137. Valenzuela, D. M., T. N. Stitt, P. S. DiStefano, E. Rojas, K. Mattsson, D. L. Compton, L. Nuñez, J. S. Park, J. L. Stark, D. R. Gies and et al. (1995). "Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury." Neuron **15**(3): 573-584.
138. Vallée, A., J. N. Vallée and Y. Lecarpentier (2021). "Lithium: a potential therapeutic strategy in obsessive-compulsive disorder by targeting the canonical WNT/ $\beta$  pathway." Transl Psychiatry **11**(1): 204.
139. Villalón, E., M. Shababi, R. Kline, Z. C. Lorson, K. M. Florea and C. L. Lorson (2018). "Selective vulnerability in neuronal populations in nmd/SMARD1 mice." Hum Mol Genet **27**(4): 679-690.
140. Wang, J., N. J. Ruan, L. Qian, W. L. Lei, F. Chen and Z. G. Luo (2008). "Wnt/beta-catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction." J Biol Chem **283**(31): 21668-21675.
141. Wehner, D., T. M. Tsarouchas, A. Michael, C. Haase, G. Weidinger, M. M. Reimer, T. Becker and C. G. Becker (2017). "Wnt signaling controls pro-regenerative Collagen XII in functional spinal cord regeneration in zebrafish." Nat Commun **8**(1): 126.
142. Weinberg, H. J. and P. S. Spencer (1978). "The fate of Schwann cells isolated from axonal contact." Journal of Neurocytology **7**(5): 555-569.
143. Willadt, S., M. Nash and C. R. Slater (2016). "Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm." Sci Rep **6**: 24849.
144. Willert, K. and R. Nusse (2012). "Wnt proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(9): a007864.
145. Wolfensohn, S. and M. Lloyd (1999). Practical use of distress scoring systems in the application of humane end points.

146. Woollard, A. C. S., J. W. Lichtman, K. Rolfe and A. O. Grobbelaar (2021). "Neuromuscular reinnervation efficacy using a YFP model." J Plast Reconstr Aesthet Surg **74**(3): 569-580.
147. Wu, H., Y. Lu, A. Barik, A. Joseph, M. M. Taketo, W. C. Xiong and L. Mei (2012). " $\beta$ -Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation." Development **139**(13): 2392-2404.
148. Yang, J. F., G. Cao, S. Koirala, L. V. Reddy and C. P. Ko (2001). "Schwann cells express active agrin and enhance aggregation of acetylcholine receptors on muscle fibers." J Neurosci **21**(24): 9572-9584.
149. Yang, X., S. Arber, C. William, L. Li, Y. Tanabe, T. M. Jessell, C. Birchmeier and S. J. Burden (2001). "Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation." Neuron **30**(2): 399-410.
150. York, A. L. and J. Q. Zheng (2017). "Super-Resolution Microscopy Reveals a Nanoscale Organization of Acetylcholine Receptors for Trans-Synaptic Alignment at Neuromuscular Synapses." eNeuro **4**(4).
151. Yumoto, N., N. Kim and S. J. Burden (2012). "Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses." Nature **489**(7416): 438-442.
152. Zelada, D., F. J. Barrantes and J. P. Henríquez (2021). "Lithium causes differential effects on postsynaptic stability in normal and denervated neuromuscular synapses." Sci Rep **11**(1): 17285.
153. Zelada, D., F. Bermedo-Garcia, N. Collao and J. P. Henriquez (2021). "Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse." Biol Rev Camb Philos Soc **96**(2): 752-766.
154. Zeman, R. J., J. Zhao, Y. Zhang, W. Zhao, X. Wen, Y. Wu, J. Pan, W. A. Bauman and C. Cardozo (2009). "Differential skeletal muscle gene expression after upper or lower motor neuron transection." Pflugers Arch **458**(3): 525-535.
155. Zhang, B., C. Liang, R. Bates, Y. Yin, W. C. Xiong and L. Mei (2012). "Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells." Mol Brain **5**: 7.

156. Zhao, K., C. Shen, Y. Lu, Z. Huang, L. Li, C. D. Rand, J. Pan, X. D. Sun, Z. Tan, H. Wang, G. Xing, Y. Cao, G. Hu, J. Zhou, W. C. Xiong and L. Mei (2017). "Muscle Yap Is a Regulator of Neuromuscular Junction Formation and Regeneration." J Neurosci **37**(13): 3465-3477.
157. Zuber, B. and N. Unwin (2013). "Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(26): 10622-10627.

