



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

Estudio de la función del receptor de neurotrofinas p75 sobre la maduración de la unión neuromuscular adulta

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

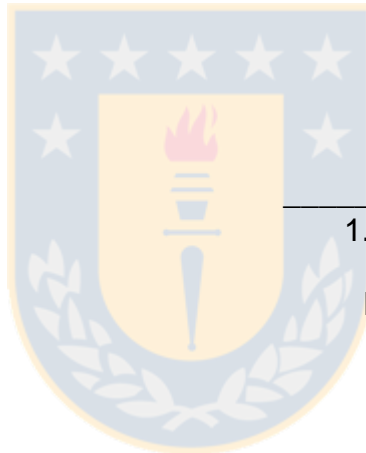
VIVIANA IVONNE PÉREZ FERNÁNDEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

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 Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



1. Dra. Roxana Pincheira Barrera
Comisión Evaluadora Interna
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

2. Dr. Francisco Nualart Santander
Comisión Evaluadora Interna
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

3. Dr. Nelson Osses Rivera
Comisión Evaluadora Externa
Instituto de Química
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Tesis de Doctorado Financiada por:
Proyecto FONDECYT Regular 1130321 (2013-2016)
Proyecto FONDECYT Regular 1170614 (2017-2020)
Beca de doctorado nacional CONICYT (2012-2016)
Beca Gastos operacionales CONICYT 21120211 (2014-2015)
Beca asistencia a congresos nacionales CONICYT (2013)
Núcleo Milenio en Biología Regenerativa MINREB RC12003 (2014-2016)
Apoyo de asistencia a congresos nacionales MECESUP UCO 1311 (2015)
Beca apoyo décimo semestre UDEC (2017)
Apoyo asistencia eventos nacionales UDEC (2015)
Apoyo asistencia eventos internacionales UDEC (2015)



A mis amados Esteban y Amanda

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a mi tutor de tesis Dr. Juan Pablo Henríquez por su compromiso y dedicación en este trabajo, así también a todos quienes han sido mis compañeros y amigos de laboratorio: Cristina, Jorge, Jesica, Francisca, Patricia, Diego, y Nicolás, por su enriquecedora contribución al trabajo y por hacer más gratas las jornadas en el laboratorio. A la Sra. Aida, por su inmenso cariño. A los miembros de mi comisión de tesis, por sus comentarios y contribuciones al trabajo científico.

A los investigadores quienes colaboraron en este trabajo: Dr. Felipe Court, Dr. Marco Fuenzalida, Dr. Claudio Cabello, Dr. Eran Perlson y en especial a la Dra. Francisca Bronfman por su fundamental contribución y disposición en la realización de esta investigación.

Al Centro de Microscopía Avanzada CMA, en especial a sus funcionarios Germán, Gustavo, Asia y Nery quien con su excelente voluntad y compañía hicieron afables extensas jornadas de trabajo.

A mi gran familia: padres, hermanas, tíos, primos y en especial a mi abuela Blanca, por siempre creer en mí. A mis amigas de la vida Eugenia y Paulina por su amistad y confianza.

A los pilares de mi vida Esteban y Amanda, por su infinita paciencia, amor y apoyo incondicional.

A SCI-HUB, por remover todas las barreras en la vía de ciencia.... Gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE FIGURAS	xiv
INDICE DE TABLAS	xvi
INDICE DE ANEXOS	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xx
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Unión neuromuscular.....	1
1.1.1 Agregación del AChR.....	2
1.1.2 Señales moleculares que regulan la agregación del AChR.....	4
1.1.3 Señales moleculares en la diferenciación del axón motor de la sinapsis neuromuscular.....	6
1.2 Vía de señalización de las Neurotrofinas.....	10
1.2.1 Señalización mediada por el receptor de neurotrofinas p75.....	12
1.2.2 Expresión del receptor de neurotrofinas p75.....	15
1.2.3 P75 en sistema nervioso periférico.....	19

1.2.4 P75 en células de Schwann.....	19
1.2.5 P75 en sistema nervioso sensorial	24
1.2.6 Receptor de neurotrofinas p75 en el control motor	27
1.3 Neurotrofinas en la Unión Neuromuscular	30
1.3.1 Localización de neurotrofinas en la unión neuromuscular	30
1.3.2 Neurotrofinas en la transmisión sináptica Neuromuscular	34
1.3.3 P75 en la eliminación axonal durante la poli-inervación	39
1.3.4 Rol de p75 en la maduración del aparato postsináptico	42
2. HIPÓTESIS	44
3. MATERIALES	46
3.1 Animales de experimentación	46
3.2 Anticuerpos	47
3.3 Reactivos y soluciones en general.....	49
3.3.1 Reactivos de cultivo celular.....	50
3.4 Material en general y equipos disponibles	51
4. MÉTODOS	53

4.1	Mediciones generales de los animales	53
4.1.1	Ensayo de suspensión de la cola.....	53
4.1.2	Test de medición de huellas	53
4.1.3	Índice de cifosis	53
4.2	Test Motores	54
4.2.1	Test Rotarod	55
4.2.2	Test de triple barra horizontal	55
4.2.3	Test de barras estáticas.....	56
4.2.4	Test de actividad espontánea en cilindro.....	56
4.3	Test Sensoriales	57
4.3.1	Test de Von Frey	57
4.3.2	Test de sensibilidad al calor.....	58
4.3.3	Test de sensibilidad al frío	58
4.3.4	Test de remoción del adhesivo	59
4.4	Análisis de fuerza muscular	60
4.4.1	Test de grilla invertida	60
4.4.2	Test de pesos	61
4.5	Registros electrofisiológicos de contracción muscular.....	61
4.5.1	Electromiografía.....	61
4.5.2	Propiedades contráctiles.....	62

4.6	Análisis histológico.....	64
4.6.1	Obtención de muestras.....	64
4.6.2	Tinción histoquímica para revelar la actividad NADH-Tiorreductasa (NADH-TR)	64
4.6.2.1.	Cuantificación de área en sección transversal	65
4.6.2.2.	Cuantificación tipo de fibra muscular	66
4.6.3	Tinción Hematoxilina-Cromotropo.....	66
4.6.4	Tinción WGA-DAPI	67
4.6.5	Tinción Rojo Sirio.....	67
4.7	Western Blot	68
4.8	Inmunohistoquímica.....	69
4.8.1	Obtención de las muestras	69
4.8.2	Inmunohistoquímica de músculo diafragma.....	69
4.8.3	Inmunohistoquímica de músculo Levator Auris Longus (LAL)	70
4.9	Cultivo primario de células musculares.....	71
4.9.1	Extracción de fibras musculares y obtención de células satélite.....	71
4.9.2	Expansión y selección de células satélite	72

4.9.3	Preparación de placas para la obtención de estructuras de agregados del AChR aneurales <i>in vitro</i>	73
4.9.4	Obtención de estructuras similares a pretzels a partir de cultivos primarios	74
4.9.5	Tinción de estructuras aneurales similares a pretzels e inmunocitoquímica	74
4.10	Análisis de imágenes	75
4.10.1	Adquisición de imágenes	75
4.10.2	Análisis de la unión neuromuscular	77
4.10.3	Análisis de área y perímetro del aparato postsináptico.....	79
4.10.4	Análisis de volumen y superficie del aparato postsináptico	79
4.10.5	Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico .	80
4.10.6	Cuantificación de la aposición pre y post sináptica de la UNM	80
4.10.7	Cuantificaciones en cultivos primarios	81
4.11	Microscopía electrónica de Transmisión (MET)	82
4.11.1	Cuantificación de parámetros neuromusculares en imágenes de MET.....	82
4.12	Tratamientos farmacológicos	83
4.13	Análisis de Nervio Ciático	84
4.13.1	Obtención de la muestra	84

4.13.2	Inmunohistoquímica de nervio Ciático	85
4.13.3	Tinción Kluver-Barrera en nervio Ciático.....	86
4.13.4	Cuantificación de imágenes obtenidas en MET	86
4.14	Análisis estadístico	87
5.	RESULTADOS	88
5.1	El receptor p75 es requerido para la coordinación motora	88
5.2	La ausencia del receptor p75 genera menor fuerza de contracción y debilidad muscular	96
5.3	La ausencia del receptor p75 produce disminución en el área de sección transversal muscular.....	100
5.4	La fusión de mioblastos en células musculares no se altera con la ausencia del receptor p75 de origen muscular.....	111
5.5	La ausencia de p75 produce alteraciones en la sensibilidad a la temperatura pero no en la sensibilidad mecánica	113
5.6	La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la sinapsis neuromuscular.....	115
5.7	El receptor de neurotrofinas p75 es necesario para la maduración de la UNM adulta.....	120

5.8	El receptor p75 expresado en el músculo no contribuye al retraso en la maduración postsináptica de la UNM.	125
5.9	La ausencia del receptor p75 no altera la inervación de la UNM ni la mielinización de axones periféricos.	129
5.10	Ratones nulos para el receptor p75 presentan alteraciones en la ultraestructura de la UNM.	142
5.11	El aumento en la disponibilidad del neurotransmisor acetilcolina recupera la función motora y fuerza muscular en ratones p75 ^{-/-}	148
6.	DISCUSIÓN	153
6.1	Expresión de p75 en la UNM adulta	154
6.2	P75 en la regulación de la coordinación motora	157
6.3	Efectos del receptor p75 sobre el músculo	162
6.4	Función de p75 en el comportamiento sensorial.....	165
6.5	Rol de p75 en el control funcional y arquitectura de la sinapsis neuromuscular	169
6.6	Función del receptor p75 en la mielinización y estructura del terminal presináptico de la UNM.....	177

6.7	Función de neurotrofinas en la regulación de proteínas de vesículas sinápticas.....	180
7.	CONCLUSIONES	186
8.	ANEXOS	187
9.	BIBLIOGRAFÍA	193



INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Señalización mediada por el receptor p75	16
Figura 2	Localización de neurotrofinas y sus receptores en la UNM	41
Figura 3	Esquema electromiografía	63
Figura 4	Estructura morfológica del aparato postsináptico en la UNM	78
Figura 5	Clasificación morfológica de estructuras de agregados del AChR similares a pretzels	81
Figura 6	La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la marcha	89
Figura 7	La ausencia del receptor p75 no produce defectos en la curvatura de la columna vertebral	91
Figura 8	p75 es requerido para la coordinación motriz	94
Figura 9	La ausencia del receptor de neurotrofinas p75 produce debilidad muscular	98
Figura 10	El receptor p75 es requerido para la fuerza de contracción muscular	99
Figura 11	La ausencia del receptor p75 no produce defectos en regeneración, fibrosis o infiltración del tejido muscular	102
Figura 12	La ausencia del receptor p75 resulta en la disminución en el tamaño de las fibras musculares	107
Figura 13	La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones histológicas musculares durante el envejecimiento	109
Figura 14	La ausencia del receptor p75 muscular no genera alteraciones en la formación de miotubos	112
Figura 15	La ausencia del receptor p75 no genera alteraciones en la sensibilidad mecánica	114

Figura 16	La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la sensibilidad a las temperaturas	117
Figura 17	La ausencia del receptor p75 produce un aumento en el tiempo de contracción muscular	118
Figura 18	La ausencia del receptor p75 produce fatiga muscular	119
Figura 19	La ausencia del receptor p75 produce un retraso en la maduración del aparato postsináptico de la UNM adulta	122
Figura 20	La ausencia del receptor de neurotrofinas p75 resulta en una menor superficie y volumen de los aparatos postsinápticos de la UNM	124
Figura 21	La ausencia del receptor p75 produce un retraso en la fragmentación del aparato postsináptico de la UNM	126
Figura 22	Obtención de estructuras tipo pretzels a partir de cultivos primarios	130
Figura 23	p75 muscular no afecta la morfología de los agregados del AChR tipo pretzels en cultivos de miotubos primarios	131
Figura 24	El perfil de inervación del músculo LAL no se altera en ausencia del receptor p75	134
Figura 25	La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en la inervación del aparato postsináptico de la UNM	135
Figura 26	Análisis en microscopía de superresolución muestra una correcta aposición entre motoneurona y pretzels en ausencia de p75	137
Figura 27	La ausencia del receptor p75 resulta en una disminución del número de axones en el nervio ciático	139
Figura 28	La ausencia del receptor p75 no afecta la mielinización de axones periféricos	140
Figura 29	La ausencia del receptor p75 resulta en una disminución de vesículas en el terminal sináptico de la UNM	144

Figura 30	La ausencia del receptor p75 disminuye la complejidad en la ultraestructura del aparato postsináptico de la Unión Neuromuscular	146
Figura 31	El aumento en la disponibilidad de acetilcolina mejora el rendimiento en actividad motora y fuerza muscular ante la ausencia del receptor p75	151

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos	48
Tabla 2	Anticuerpos secundarios utilizados	49
Tabla 3	La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en peso y longitud de los músculos	106
Tabla 4	Antecedentes respecto a coordinación motora y fuerza muscular en ratones <i>p75</i> -/-	161

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1	El receptor de neurotrofinas p75 se localiza en la placa terminal	187
Anexo 2	Proteínas postsinápticas estructurales p35 y Nestina no alteran su distribución ante la usencia de p75	188
Anexo 3	Co-cultivo entre células musculares y motoneuronas desde asta ventral de la médula espinal	189
Anexo 4	La ausencia del receptor p75 genera una discreta poli-inervación del aparato postsináptico de la UNM	191
Anexo 5	Posibles vías de control de p75 sobre la disponibilidad de vesículas sinápticas de la UNM	192



RESUMEN

La unión neuromuscular (UNM) es una sinapsis periférica colinérgica formada entre un axón motor, una fibra muscular esquelética y células de Schwann terminales. La maduración de la UNM comprende un refinamiento morfológico, estructural y funcional de esta sinapsis permitiendo la contracción muscular controlada. Sin embargo, los mecanismos que controlan la maduración de la UNM no han sido bien descritos. Una vía de señalización que controla la mantención y función de la sinapsis neuromuscular es la vía de las neurotrofinas, cuyo receptor p75 es expresado en los tres componentes de la UNM adulta. Aunque se ha descrito que el receptor p75 favorece la transmisión sináptica, su posible función en la maduración de esta sinapsis es desconocida. Para determinar si el receptor de neurotrofinas p75 es requerido para la maduración de la UNM, hemos caracterizado propiedades neuromusculares, motoras y musculares del ratón *p75* knockout (*p75*^{-/-}). Los resultados obtenidos mediante análisis de microscopía confocal 3D y microscopía electrónica indican que la ausencia del receptor p75 produce un retraso en la maduración y menor complejidad ultraestructural del aparato postsináptico de la UNM. Análisis ultraestructurales del terminal axonal motor revelan una significativa reducción en el número de vesículas sinápticas en los mutantes, sugiriendo una menor disponibilidad del neurotransmisor. Dichos defectos estructurales encontrados en ratones *p75*^{-/-} se correlacionan con alteraciones en el comportamiento motor, deficiencias en propiedades contráctiles musculares, fallas en la transmisión

neuromuscular y debilidad muscular. Adicionalmente, los resultados sugieren que *p75* expresado en el músculo no contribuye de manera directa a la agregación del AChR ni su morfología de los agregados, evaluado mediante cultivos primarios de células satélites musculares y análisis de agregación del AChR sobre los miotubos formados.

Por lo tanto, los resultados sugieren que defectos presinápticos contribuyen directamente al fenotipo encontrado en los ratones *p75*^{-/-}. Concordantemente, el tratamiento farmacológico con un inhibidor de la acetilcolinesterasa, revierte la descoordinación motora y debilidad muscular en los ratones *p75*^{-/-}, sugiriendo que la disminución de vesículas sinápticas contribuye a las alteraciones encontradas en estos ratones.

Nuestros resultados sugieren que el receptor de neurotrofinas *p75* es requerido para la maduración de la UNM, permitiendo la disponibilidad de vesículas sinápticas en el terminal axonal, regulando con ello la morfología y función de la conectividad neuromuscular.

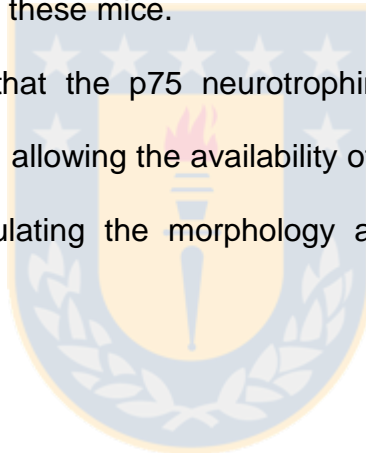
ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is a peripheral cholinergic synapse formed between a motor axon, a skeletal muscle fiber, and terminal Schwann cells. The maturation of the NMJ includes a morphological, structural and functional refinement of this synapse allowing controlled muscle contraction. However, the mechanisms that control the maturation of the NMJ have not been well described. A signaling pathway that regulates the maintenance and function of the neuromuscular synapse is the neurotrophin pathway, whose p75 receptor is expressed in the three components of the adult NMJ. Although it has been described that the p75 receptor favors synaptic transmission, its possible function in the maturation of this synapse is unknown. To determine if the p75 neurotrophin receptor is required for the maturation of the NMJ, we have characterized neuromuscular, motor and muscle properties of the mouse p75 knockout mice (*p75^{-/-}*). Analyses through 3D confocal microscopy and electron microscopy indicate that the absence of the p75 receptor results in a delay in the maturation and impaired ultrastructural complexity of the postsynaptic apparatus at the NMJ. Ultrastructural analyses of the motor axon terminal reveal a significant reduction in the number of synaptic vesicles in the mutants, suggesting a lower availability of the neurotransmitter. The structural NMJ defects found in *p75^{-/-}* mice correlate with alterations in motor behavior, deficiencies in muscle contractile properties, failures in neuromuscular transmission and muscle weakness. Additionally, the results suggest that p75 expressed in the muscle do not contribute directly to the

aggregation of the AChR nor morphology of the aggregates, evaluated by primary cultures of muscle satellite cells and subsequent analysis aggregation of the AChR on the formed myotubes.

Therefore, the results suggest that presynaptic defects contribute directly to the phenotype found in *p75*^{-/-} mice. Accordingly, pharmacological treatment with an acetylcholinesterase inhibitor reverses the motor disruption and muscle weakness in *p75*^{-/-} mice, suggesting that the decrease in synaptic vesicles contributes to the alterations found in these mice.

Our results suggest that the p75 neurotrophin receptor is required for the maturation of the NMJ, allowing the availability of synaptic vesicles in the axonal terminal, thereby regulating the morphology and function of neuromuscular connectivity.



1. INTRODUCCIÓN

La UNM de vertebrados es una sinapsis periférica activada por el neurotransmisor acetilcolina (ACh), formada por el terminal axónico de una motoneurona, una fibra de músculo esquelético y células de Schwann terminales. La UNM ha sido utilizada como un modelo arquetípico para estudiar la formación, maduración, mantención y regeneración de sinapsis, debido en gran parte a su fácil accesibilidad y mayor tamaño respecto a las sinapsis centrales. La correcta transmisión de esta sinapsis es necesaria para gatillar la contracción muscular y generar el movimiento controlado del cuerpo, por lo cual es relevante el entendimiento de los mecanismos que controlan el correcto funcionamiento de la UNM para el estudio y posterior tratamiento de patologías asociadas a esta sinapsis. Aun cuando se han descrito moléculas claves para la formación embrionaria de la UNM, los mecanismos y vías de señalización que subyacen a los procesos de maduración de esta sinapsis han sido pobremente descritos.

1.1 Unión neuromuscular

El movimiento anatómico del ser humano necesita de una rápida y precisa comunicación neuromuscular. Para ello, es necesaria una fina sincronización entre el componente pre y postsináptico que permita la eficiente transmisión neuromuscular. Fallas en la transmisión de esta sinapsis resulta en patologías musculares, debilidad y parálisis muscular (Slater 2008). Por esta razón, el

entendimiento de la arquitectura neuromuscular es esencial para la comprensión del funcionamiento de esta sinapsis.

1.1.1 Agregación del AChR

La formación de agregados el AChR es un marcador temprano de diferenciación postsináptica en la UNM. A este respecto, existen tres grandes cambios morfológicos vinculados a la agregación del AChR propios de esta sinapsis; formación, maduración y fragmentación del aparato postsináptico.

Durante la formación de esta sinapsis, en estadíos embrionarios previo a la inervación motora, existen agregados aneurales del AChR distribuidos por la fibra muscular, rasgo conocido como "prepatrón", el cual guía a los axones motores para el ensamblaje de la UNM (Lin et al. 2001, Sanes and Lichtman 2001, Yang et al. 2001, Jing et al. 2009). Posterior a la inervación por parte del axón motor, los AChR son redistribuidos y se localizan exclusivamente en la región inervada de la fibras musculares (Sanes and Lichtman 2001).

Durante la maduración de la UNM, cada fibra muscular es poli-inervada en forma transiente por dos o más axones en el nacimiento; sin embargo, a las 2 semanas postnatales, la mayoría de los axones motores se retraen y cada fibra muscular es inervada por solo un terminal axónico motor (Sanes and Lichtman 2001, Wu et al. 2010). Durante el desarrollo de la UNM, la membrana postsináptica se invagina y forma plegamientos funcionales, también llamados pliegues secundarios, donde los receptores de acetilcolina ACh (AChR) son concentrados

en las crestas de las invaginaciones, en directa aposición a las zonas activas de los terminales presinápticos (Sanes and Lichtman 2001, Wu et al. 2010, York and Zheng 2017). Dicha distribución de los receptores otorga las características morfológicas propias de esta sinapsis, resultando en una distribución estriada de los agregados del AChR que componen el aparato postsináptico de la UNM (York and Zheng 2017).

Una vez finalizado el proceso de eliminación de la poli-inervación de las fibras musculares comienza la etapa de reorganización molecular y estructural, que conduce a importantes cambios morfológicos en el aparato postsináptico que permiten una eficiente neurotransmisión. En una primera instancia, el aparato postsináptico presenta una forma de placa elíptica con distribución homogénea de los AChRs; posteriormente, se forman estructuras más complejas y ramificadas que contienen zonas de baja densidad del AChR, alcanzando la conformación denominada pretzel. Las distintas estructuras postsinápticas coexisten durante la maduración de la UNM, por lo que se observa una transición gradual hacia la forma de pretzel (Sanes and Lichtman 1999, Marques et al. 2000, Lanuza et al. 2002). Posteriormente, durante el envejecimiento, los pretzels son fragmentados y denervados, generando la pérdida de la sinapsis y del control del movimiento (Valdez et al. 2010, Jang and Van Remmen 2011).

De esta manera, los cambios morfológicos que subyacen a las etapas de desarrollo de la UNM han sido descritos en detalle. *Sin embargo, nuestro*

conocimiento respecto a las señales que regulan la maduración y mantención del aparato postsináptico es aún escaso.

1.1.2 Señales moleculares que regulan la agregación del AChR

La agregación del AChR es controlada por señales positivas y negativas (Henriquez and Salinas 2012). La señal positiva mejor descrita que regula este proceso es agrina. Este proteoglicán es sintetizado por la motoneurona, transportado a lo largo del axón y liberado en el terminal nervioso, organizando la membrana postsináptica (Sanes and Lichtman 2001). Agrina se une al co-receptor Lrp4 formando un complejo ternario con el receptor tirosina quinasa MuSK en la membrana postsináptica, lo que resulta en la activación de este último (Glass et al. 1996). Corriente abajo, la señalización activada por agrina recluta a proteínas de unión a MuSK como Dok-7 y Tid1 (Okada et al. 2006, Linnoila et al. 2008), permitiendo la reclusión de la proteína de andamiaje Rapsina la cual induce la agregación de los AChRs (Sanes and Lichtman 2001). Adicionalmente, agrina induce la activación secuencial de GTPasas pequeñas como Rac y Rho; la activación de Rac es necesaria para la fase inicial de agregación de los AChR, siendo involucrada en la agregación de AChR difusos en microagregados, mientras que la activación de Rho es requerida para la subsecuente condensación de estos micro-agregados para formar los agregados de mayor tamaño (Weston et al. 2000, Weston et al. 2003). Ratones deficientes en las proteínas Rapsina, MuSK, Dok-7 o Tid1 no son capaces de formar

agregados del AChR y, por consiguiente, diferenciación postsináptica, lo que confirma su relevancia fisiológica (Gautam et al. 1995, DeChiara et al. 1996, Okada et al. 2006).

La maduración del aparato postsináptico de la UNM conlleva la formación de zonas de baja densidad del AChR, lo que sugiere la participación de señales negativas para esta agregación en el proceso. Al respecto, se ha descrito que el neurotransmisor ACh dispersa a los agregados que no se encuentran inervados (Lin et al. 2005), a través de un mecanismo que resulta en la activación de Cdk5, que fosforila al filamento intermedio Nestina. Bajo estimulación eléctrica y liberación del neurotransmisor ACh, p35 es reclutada hacia Nestina en el sitio sináptico, activando a Cdk5 quien fosforila a Nestina, resultando en la liberación de este filamento intermedio en el citoplasma. El desensamblaje del citoesqueleto de Nestina en regiones discretas de la UNM resulta en la internalización del AChR (Yang et al. 2011). Se ha descrito que actina se concentra en las zonas de baja densidad de los agregados del AChR y su recambio constante permite el tráfico vesicular y con ello el recambio de receptores desde y hacia la membrana postsináptica. Nuevos receptores son insertados en los pretzel, dirigiéndose en una primera instancia hacia las zonas de baja densidad, lugar donde son altamente inestables, para posteriormente ser redistribuidos en las zonas de alta densidad de AChRs (Bruneau et al. 2005, Bruneau and Akaaboune 2006, Lee et al. 2009). De esta manera, las zonas de baja densidad de AChRs se mantienen y aumentan su tamaño con el tiempo, existiendo un recambio constante de los

AChR ya sea por receptores recientemente sintetizados o bien por receptores de reciclaje (Bruneau et al. 2005, Bruneau and Akaaboune 2006). Adicionalmente, proteínas que regulan la dinámica de microfilamentos, como cofilina, vinculina y dinamina se localizan en zonas de baja densidad del AChR (Lee et al. 2009, Proszynski et al. 2009). Por su parte, los microtúbulos conforman una red que circunscribe al aparato postsináptico, de esta forma, agrina liberada por el axón motor activa a la proteína de unión a extremo de microtúbulo quien a su vez permite el anclaje de los microtúbulos a la membrana muscular y con ello permitiendo la mantención del fenotipo de la sinapsis muscular (Schmidt et al. 2012). De esta manera, aun cuando esta evidencia sugiere que los tres componentes del citoesqueleto participan activamente en la estructuración de zonas de baja densidad del AChR, poco se sabe de las señales extracelulares que regulan este fenómeno. Conjuntamente con el refinamiento del aparato postsináptico, el axón motor debe ser diferenciado para lograr la liberación exitosa del neurotransmisor.

1.1.3 Señales moleculares en la diferenciación del axón motor de la sinapsis neuromuscular

La lamina basal (LB) que rodea a la fibra muscular y se encuentra en el espacio sináptico de la sinapsis neuromuscular contiene factores liberados tanto por el axón motor como por el músculo que permiten la especialización del terminal nervioso. De esta forma, en experimentos de denervación y posterior

regeneración muscular, se observó que los miotubos regenerados en ausencia del nervio permiten la generación de nuevos agregados del AChR solamente en las regiones donde previamente existía sinapsis (Fox and Umemori 2006).

Dentro de los componentes de la LB que regulan la diferenciación presináptica se encuentran las lamininas, glicoproteínas heterotriméricas (α , β , y γ) que poseen una distribución diferencial en la LB de la UNM. De esta manera, las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 5$ se localizan en el espacio sináptico y en pliegues de la membrana muscular en las zonas de contacto entre el axón motor y la fibra muscular. Por su parte, la subunidad $\alpha 5$ se localiza en el espacio sináptico en regiones ausentes de zonas activas, región donde es liberado el neurotransmisor (Patton et al. 2001). Laminina $\beta 2$ es localizada exclusivamente en la región sináptica de la LB, específicamente en los pliegues de la membrana muscular, mientras que la subunidad $\beta 1$ se encuentra en trímeros que se localizan en la región extrasináptica de la LB, zona carente en UNMs (Patton 2003).

Se ha descrito que ratones carentes en laminina $\beta 2$ poseen defectos en la diferenciación presináptica en la UNM, presentando un menor número de zonas activas, alteraciones en la agrupación de vesículas sinápticas, así como una capacidad reducida de liberar el neurotransmisor (Noakes et al. 1995). Estudios posteriores demostraron que laminina $\beta 2$ se une directamente a los canales de Calcio dependientes de voltaje VGCC presentes en la membrana presináptica. Dicha interacción permite la agregación de los canales de calcio en el terminal axónico permitiendo la mantención de las zonas activas del terminal axónico

(Nishimune et al. 2004). A este respecto, animales carentes en el canal de calcio dependiente de voltaje Cav 2.1 poseen menor número de zonas activas (ZA), mientras que animales neonatos carentes en laminina $\beta 2$ presentan zonas activas normales. Sin embargo, al analizar al día postnatal 4, los ratones carentes en laminina $\beta 2$ poseen una reducción significativa en el número de ZAs (Nishimune et al. 2004). Por lo tanto, laminina $\beta 2$ regula la mantención, no así la formación de las zonas activas.

Por otra parte, se ha descrito que animales carentes en laminina $\alpha 4$ poseen una alteración en la correcta aposición entre las ZAs y los pliegues postsinápticos musculares, siendo este alineamiento necesario para la correcta ejecución de la sinapsis. Análisis de la ultraestructura de la UNM mostraron que animales control poseen un 78% de aposición entre una ZA y un pliegue, mientras que animales *laminina $\alpha 4$ -/-* presentan tan sólo un 23% de aposición (Patton et al. 2001). Por lo tanto, laminina $\alpha 4$ es requerida para la correcta aposición pre/post sináptica.

Para realizar la correcta liberación del neurotransmisor en la UNM, en las ZAs existe fusión de vesículas sinápticas y reclutamiento de canales de Calcio dependientes de voltaje, así como una exacta aposición con el aparato postsináptico (Badawi and Nishimune 2018). A nivel ultraestructural, diversas proteínas forman y mantienen las ZAs. Mediante análisis de microscopía electrónica, aparecen como zonas electrodensas de la membrana presináptica del axón motor hacia el citosol. Están compuestas por 2 proteínas principalmente: Bassoon y VGCC (Badawi and Nishimune 2018). Una tercera proteína presente

a las ZAs es Piccolo. Análisis de superresolución en la UNM han determinado que Piccolo se asocia a Bassoon generando una estructura piccolo-bassoon-piccolo (Nishimune et al. 2016). Ambas proteínas son necesarias para la agregación de las vesículas sinápticas en las ZAs (Badawi and Nishimune 2018). Adicionalmente, existe una matriz de citoesqueleto que conforman las ZA del terminal axónico neuromuscular, y las proteínas que lo componen son: Basson, Piccolo, ELKS/CAST2/ERC1, Munc13 y las proteínas de interacción con Rab3 RIM 1/2. Estas proteínas regulan la acumulación de vesículas sinápticas y la liberación del neurotransmisor siguiendo el influjo de calcio a través de los VGCCs (Badawi and Nishimune 2018).

De esta manera, existen proteínas presentes en la membrana basal de la región sináptica de la UNM que regulan la diferenciación presináptica. La posterior organización de las proteínas que las conforman, y la subsecuente formación de las ZAs permiten la liberación del neurotransmisor y con ello una correcta transmisión neuromuscular.

Por lo tanto, tanto la diferenciación pre y postsinápticas son requeridas para el correcto andamiaje y funcionamiento de la UNM. Posteriormente, es necesaria la mantención y maduración de esta sinapsis para gatillar la contracción muscular controlada. Sin embargo, aún se desconoce en profundidad los mecanismos por los cuales es controlado el proceso de maduración de la sinapsis muscular. Un ejemplo bien documentado de vías de señalización potencialmente involucradas en la mantención de la UNM son las vías activadas por neurotrofinas.

1.2 Vía de señalización de las Neurotrofinas

En el sistema nervioso, las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento que promueven la supervivencia, desarrollo y sobrevivencia neuronal. Dentro de los miembros de esta familia se encuentran el factor de crecimiento neural (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3) y neurotrofina 4 (NT4). Las neurotrofinas se unen con afinidad específica a los receptores tirosina quinasa TrkA, TrkB y TrkC (Huang and Reichardt 2001, Chowdary et al. 2012), donde al receptor TrkA se une con afinidad específica al ligando NGF, el receptor TrkB se unen los ligandos NT4 y BDNF, mientras que al receptor de neurotrofinas TrkC se une el ligando NT3 (Chao 2003).

El balance de la señalización activada por distintas neurotrofinas determina la supervivencia celular y apoptosis durante el desarrollo. Los animales nulos para los ligandos de neurotrofinas mueren a las pocas semanas después de nacer, mientras que animales heterocigotos para los distintos ligandos, cuyo nivel de expresión de neurotrofinas es disminuido, son viables pero presentan una vida media reducida, manifestando múltiples defectos (Chao 2003). Así, los animales heterocigotos para cada ligando NGF, BDNF y NT3 presentan fallas en el sistema nervioso central y periférico. A este respecto, ratones *BDNF*^{+/-} y *NT3*^{+/-} poseen una menor sensibilidad mecánica, mientras que los animales heterocigotos para BDNF, NT3 y NGF presentan una disminución en el número de neuronas del sistema nervioso periférico (Chao 2003, Ceni et al. 2014).

Las neurotrofinas son inicialmente sintetizadas como un precursor proneurotrofina, el cual es clivado produciendo la forma madura del ligando. Intracelularmente, estos precursores son escindidos en el retículo endoplásmico donde las proneurotrofinas son transportadas en vesículas secretoras y escindidas por la proteasa furina, la que cliva y libera la proteína madura (Seidah et al. 1996, Mowla et al. 2001). Extracelularmente, las proneurotrofinas son escindidas por las enzimas plasmina y metaloproteasas (Lee et al. 2001).

Los diversos sitios de unión y afinidad que presentan los receptores de neurotrofinas determinan su respuesta y especificidad (Chao 2003). La unión del ligando al receptor Trk permite su dimerización, produciendo una autofosforilación y la activación de diversas cascadas de señalización intracelular. Entre ellas, se encuentran vías mediadas por la activación de ERK quinasa, PI3K y fosfolipasa C (PLC). La señalización se traducirá en la regulación de la actividad transcripcional, tal como la inducción del factor de transcripción CREB, el cual tiene efectos sobre el ciclo celular, crecimiento de neuritas y plasticidad sináptica (Friedman 2010, Ceni et al. 2014, Meeker and Williams 2014).

Además de los receptores Trks, existe un segundo receptor de neurotrofinas, p75, el cual es activado por todas las neurotrofinas en sus formas maduras o como proneurotrofinas (Chao 2003, Reichardt 2006). P75 puede incrementar la afinidad y especificidad de la interacción entre los ligandos y sus receptores Trk,

actuando como correceptor, así como también puede señalar conjuntamente acoplado a otros receptores (Chao 2003, Friedman 2010).

Las proneurotrofinas poseen mayor afinidad por el receptor p75 que sus formas maduras, induciendo la apoptosis. Por ejemplo, el tratamiento de las células de músculo liso vascular que expresan p75 con la forma madura de NGF produce un 20% de apoptosis. En contraste, el tratamiento con proNGF es al menos 10 veces más potente en la inducción de apoptosis (Lee et al. 2001).

Considerando la versatilidad de funciones que puede cumplir el receptor p75 debido a su capacidad de activar diversas vías de señalización, y en consideración a estudios previos que señalan a las neurotrofinas como moduladores de la mantención de la UNM, es relevante el análisis de este receptor en el contexto de los procesos fisiológicos involucrados en la UNM.

1.2.1 Señalización mediada por el receptor de neurotrofinas p75

El receptor p75 pertenece a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral TNF, que posee un dominio extracelular que incluye cuatro motivos ricos en cisteínas, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (He and Garcia 2004, Chen et al. 2009). P75 puede ser activado por ligandos diméricos de neurotrofinas, lo que activa la dimerización de p75 gracias a la generación de un puente disulfuro a través del residuo conservado de cisteína 257 localizado en el dominio transmembrana (Vilar et al. 2009, Kraemer et al. 2014). Posterior a su activación, este receptor puede gatillar diversas vías de señalización mediadas

por la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y NF- κ B, las cuales desencadenan respuestas que van desde la muerte celular programada hasta la supervivencia celular bajo la activación de otras vías de señalización según sea el ligando, contexto celular y receptor con el cual se asocie (Reichardt 2006, Kraemer et al. 2014, Meeker and Williams 2015). Al respecto, para otorgar esa diversidad de respuestas celulares, p75 puede asociarse con otros receptores formando complejos y activando diferentes vías de señalización. Así, este receptor puede unirse a los receptores de neurotrofinas Trk aumentando la afinidad de las neurotrofinas por dicho receptor y desencadenando respuestas de supervivencia celular (Meeker and Williams 2015). Por otra parte, p75 puede unirse al receptor sortilina permitiendo la unión de las proneurotrofinas mediante su prodominio. Sortilina es un miembro de la familia de receptores transmembrana con dominio Vsp10p con el cual se une a p75 (Nykjaer and Willnow 2012). Adicionalmente, otros receptores a los que puede unirse p75 son NOGO y LINGO-1, produciendo respuestas celulares como la retracción del cono de crecimiento en respuesta a proteínas derivadas de la mielina (Meabon et al. 2015b, Meabon et al. 2015a, Meeker and Williams 2015).

La respuesta celular característica asociada a p75 es la muerte celular programada. A este respecto, la apoptosis inducida mediante la activación de p75 se desencadena mediante la pérdida mitocondrial de citocromo c y requiere de la activación de las caspasas 9 y 6, siendo fundamental la activación de la caspasa 3 en neuronas hipocámpales (Troy et al. 2002, Ceni et al. 2014).

Concordantemente, ratones carentes en p75 poseen una actividad disminuida de caspasa 3 y, por consiguiente, una disminución de muerte neuronal luego de un daño inducido (Troy et al. 2002). Adicionalmente, p75 puede activar la apoptosis debido a que los miembros de la familia de receptores TNF activan a JNK, quinasa que induce la muerte celular mediante la inducción de la fosforilación del factor de transcripción c-jun, de los supresores de tumores p53 y p73, resultando en una regulación transcripcional que favorece la expresión de genes involucrados en la vía de apoptosis tales como *Bax*, *PUMA*, *Bak* y *Caspasa-6* (**Figura 1**) (Ceni et al. 2014).

A su vez, la muerte celular dependiente de p75, puede estar regulada a través de la activación del proceso de proteólisis intramembrana regulada (RIP). La activación de p75 y JNK inducen el corte proteolítico secuencial del receptor p75 por parte de la enzima convertidora de TNF α (TACE) y γ -secretasa. Dicho clivaje permite la translocación al núcleo del dominio citoplasmático de p75 (ICD), permitiendo la unión del factor interactor del receptor de neurotrofinas (NRIF) al dominio ICD de p75, facilitando la translocación al núcleo del factor y con ello promoviendo la activación de JNK y permitiendo así la muerte celular programada (**Figura 1**) (Ceni et al. 2014, Meeker and Williams 2014)

Por lo tanto, el receptor de neurotrofinas p75 ejerce diversas funciones celulares según sea el contexto y tipo celular en el cual se exprese (Casaccia-Bonnet et al. 1999).

1.2.2 Expresión del receptor de neurotrofinas p75

En el sistema nervioso adulto, la expresión del receptor p75 se ve fuertemente disminuida respecto a estadios embrionarios. Sólo unos pocos tipos neuronales mantienen elevados los niveles de p75 tales como neuronas simpáticas, neuronas colinérgicas y cerebro anterior (Meeker and Williams 2014). Dicha situación es revertida en casos de injuria o condiciones patológicas donde p75 es re-expresado. En este contexto, en isquemia focal cerebral, el receptor p75 conjuntamente con el ligando proNGF son re-expresados en neuronas hipocampales, regulando la apoptosis de las células dañadas mediante la activación de caspasa 3. La expresión de p75 es regulada mediante el microARN mir-592 ante la isquemia (Irmady et al. 2014). Por otra parte, la expresión de p75 y de los ligandos proBDNF y proNGF es incrementada en un modelo de injuria provocado por convulsiones inducidas por procarpina en hipocampo de ratas. El aumento en la expresión de los ligandos produce un incremento en su unión a p75 desencadenando la apoptosis de neuronas hipocampales luego de las convulsiones. En este trabajo, se determinó que la muerte celular programada depende del reclutamiento de NRIF al núcleo, ya que ratones carentes en *NRIF* no presentan apoptosis neuronal luego del tratamiento con procarpina (Volosin et al. 2008). Un tercer ejemplo de la activación de la vía p75 ante la injuria es el caso de la axotomía, donde luego de la transección de un segmento de nervio

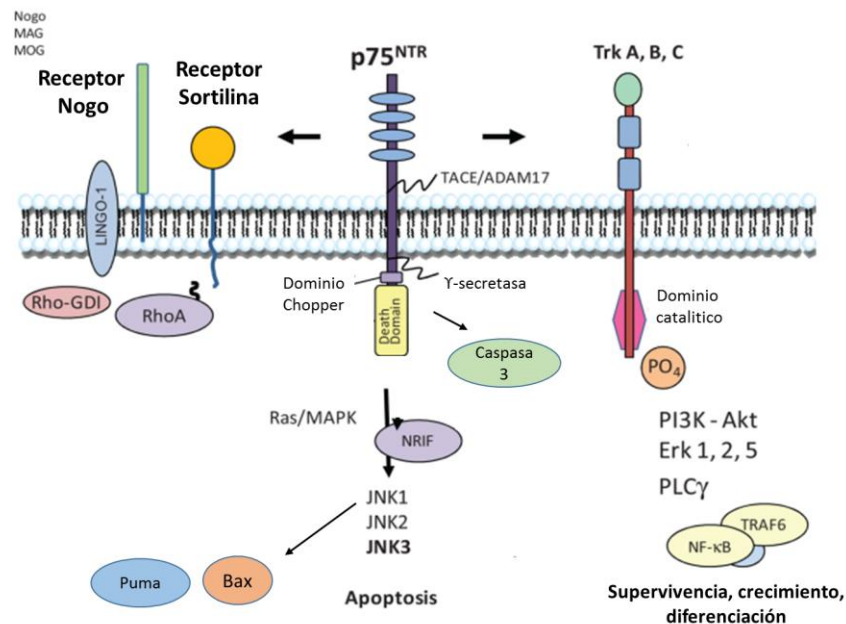


Figura 1: Señalización mediada por el receptor p75. El receptor de neurotrofinas puede unirse al menos a 3 receptores; 1) La heterodimerización con los receptores Trks incrementa la afinidad de las neurotrofinas maduras con Trk, interacción que promueve supervivencia y crecimiento celular mediante la activación de PI3K-Akt, ERK o PLCγ y corriente abajo mediante efectores como TRAF6 y NFκB. Adicionalmente, Trk activado fosforila a TACE/ADAM17 quien inicia el clivaje de p75 activando el mecanismo de apoptosis RIP. Además p75 puede desencadenar apoptosis mediante la activación de caspasa 3 y mediante la regulación transcripcional de *PUMA*, *Bax* entre otras proteínas involucrada en la vía de apoptosis. 2) La interacción de p75 con sortilina une a las proneurotrofinas al complejo de receptores. La interacción permite la subsecuente interacción de la vía de señalización Ras/MAPK y la activación de JNK quinasas desencadenando la apoptosis celular. 3) La interacción de p75 con los receptores Nogo y Lingo-1 regulan el crecimiento. La interacción activa a RhoA por desplazamiento de Rho-GDI y subsecuente supresión de Rac permitiendo el colapso del crecimiento del cono axonal, retracción de neuritas y decrecimiento de la densidad de espinas

Fuente: Modificado de Meeker and Williams 2014.

ciático en ratas se observa un aumento en la expresión de p75 en las motoneuronas, siendo detectado el incremento de ARNm de p75 en el soma del axón motor en cortes de médula espinal de ratas tanto adultas como envejecidas (Johnson et al. 1999). En contraposición, otros receptores de neurotrofinas como TrkB y TrkC no incrementan su expresión luego del daño en el nervio ciático (Johnson et al. 1999).

Un segundo contexto para el aumento en la expresión del receptor de neurotrofinas p75 son las enfermedades neurodegenerativas. A este respecto, se ha descrito que en cerebros de pacientes de la enfermedad la Alzheimer (AD) existe un aumento en la expresión de p75 en la membrana de neuronas hipocampales AD en comparación con pacientes cognitivamente normales (Chakravarthy et al. 2012). En paralelo, existe un aumento en la expresión del ligando proNGF en el hipocampo de pacientes con AD (Mufson et al. 2012) y al purificar proNGF del cerebro de pacientes, este ligando es capaz de inducir apoptosis en una línea celular de neuronas simpáticas que expresan p75 (Pedraza et al. 2005). Adicionalmente, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se determinó que p75 es capaz de unirse al péptido β -amiloide, el cual en pacientes con AD es agregado causando toxicidad neuronal. La interacción del péptido con p75 induce la activación de *NFKB*, mientras que la inhibición de esta interacción con el ligando NGF disminuye la muerte celular inducida por el péptido $A\beta$ en una línea celular de neuroblastoma (Kuner et al. 1998).

Por otra parte, p75 puede contribuir a procesos inflamatorios, aumentando su expresión en condiciones patológicas (Meeker and Williams 2014). En este contexto, el complejo p75/Nogo podría jugar un rol en la inflamación facilitando el eflujo de macrófagos desde el sitio de inflamación posterior al daño por aplastamiento del nervio ciático. En ratones carentes en *Nogo* con daño por aplastamiento del nervio, los macrófagos fallan en retirarse del área de daño (Fry et al. 2007). La interacción repulsiva entre las proteínas mielínicas con el complejo Nogo/p75 parece ser necesaria para la migración de los macrófagos desde el sitio de la injuria y con ello terminando el proceso inflamatorio (Fry et al. 2007, Meeker and Williams 2015).

Así, el aumento de p75 después de injuria o patologías podría deberse a un rol que desempeñe favoreciendo el correcto funcionamiento neuronal, donde el receptor p75 podría: (1.-) Incrementar la supervivencia de neuronas dañadas aumentando la eficiencia de la activación de receptores Trk, (2.-) permitir la apoptosis de las células dañadas para eliminarlas y minimizar la respuesta inflamatoria, (3.-) proveer de un microambiente de soporte para una regeneración y crecimiento apropiado, y (4.-) controlar la inflamación (Meeker and Williams 2015).

Conjuntamente con su desempeño en el sistema nervioso central, p75 también se encuentra involucrado en las sinapsis y regulación del sistema nervioso periférico.

1.2.3 P75 en sistema nervioso periférico

En el sistema nervioso periférico adulto, el receptor de p75 se expresa en algunos tejidos tales como; glía, cóclea, retina, neuronas sensoriales adultas, progenitores neuronales y de manera interesante, en axón motor, músculo postsináptico y células de Schwann (Meeker and Williams 2014). Estos antecedentes sugieren un potencial rol de p75 en la UNM adulta.

1.2.4 P75 en células de Schwann

Aunque la motoneurona y la fibras musculares tienen el principal rol en la transducción de la señalización de esta sinapsis y posterior generación de la contracción muscular, las células Schwann terminales (tSC) también poseen un rol crítico de soporte de la UNM. Las tSC no poseen mielina y son localizadas en la proximidad del terminal axónico motor, donde expresan factores adhesivos, tróficos y asociados al crecimiento durante el desarrollo, mantención y regeneración de la UNM (Ko and Robitaille 2015, Barik et al. 2016).

Durante el desarrollo postnatal, las células de Schwann (SC) inmaduras se diferencian en mielínicas o no mielínicas. Esta diferenciación depende de los axones a la cual están asociadas; células de Schwann asociadas a axones de gran diámetro se diferencian en mielínicas, mientras que la diferenciación hacia SC no mielínica aún se desconoce (Sugiura and Lin 2011). Se ha descrito que, aun cuando las tSC expresan marcadores propios de células de Schwann

mielínicas, su fenotipo no mielínico podría deberse a factores inhibitorios presentes en la sinapsis (Georgiou and Charlton 1999).

Mediante la transección de las raíces dorsales centrales de los ganglios de la raíz dorsal en ratas, se determinó que luego de la injuria la expresión del receptor de neurotrofinas p75 aumenta en SC activadas del SNP pero no en oligodendrocitos del SNC (Gai et al. 1996, Kraemer et al. 2014). Adicionalmente, p75 también regula la migración de las células de Schwann. Luego de la migración inicial de las SC a lo largo del axón, éstas migran radialmente hacia los axones, se dividen activamente y posteriormente se separan para acompañar a un solo axón (Anton et al. 1994). Mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión, se ha descrito que embriones de ratones *p75*^{-/-} presentan con frecuencia axones descubiertos de citoplasma de las SC, mientras que en animales control, las SC cubren por completo a los axones analizados. Adicionalmente, la migración de células de Schwann en ratones *p75*^{-/-} es disminuida respecto a animales control. De esta manera, cultivos de neuronas cervicales DRG de embriones de ratón al estadio E12.5 de ratones *p75*^{-/-} sembradas sobre criosecciones de nervio ciático e incubadas con NGF, mostraron que las células de origen *p75*^{-/-} migran menor distancia en relación al control (Bentley and Lee 2000). Conjuntamente con promover la migración celular de las SC, se ha reportado la participación del receptor p75 en la regulación de la supervivencia como la migración de las SC mediada por la glicoproteína asociada a mielina (MAG). Dicha glicoproteína se une a al complejo formado por los receptores p75 y el receptor Nogo (NgR1) en

las SC en médula espinal de ratones adultos, produciendo la inhibición la migración de las SC y desencadenando la apoptosis celular mediante el mecanismo RIP en el cual p75 es clivado y el dominio intracelular p75^{ICD} translocado al núcleo, desencadenando la muerte celular programada (Chaudhry et al. 2017).

Adicionalmente, el receptor p75 ha sido asociado a la regulación de la muerte de motoneuronas fisiológica en etapas postnatales. Durante el desarrollo embrionario un gran número de motoneuronas son sometidas a apoptosis, etapa en la cual fue generado un exceso de motoneurona. Concordantemente, animales nulos para p75 presentan un incremento en el tamaño y número de neuronas colinérgicas (Yeo et al. 1997, Naumann et al. 2002).

Sin embargo, p75 conjuntamente con el receptor NgR inhiben la apoptosis de las motoneuronas mediante la activación de GTPasa pequeña RhoA en etapas postnatales. Animales nulos para la glicoproteína asociada a mielina MAG, ligando de NgR, muestran una reducción de 43% del número de motoneuronas al día postnatal 7 (p7), mientras que en el estadio p31 existe un 80% menor número de motoneuronas con soma de mayor tamaño (soma >400 μm^2). Por lo tanto, p75 también es capaz de tener efectos de protección ante apoptosis mediante la unión de MAG a NOGO-p75 (Palandri et al. 2015).

Durante el proceso de formación de la mielina existe una fluctuación en la expresión de las neurotrofinas y sus receptores quienes regulan las etapas de proliferación, elongación, mielinización y generación de internodos maduros en

las neuronas (Notterpek 2003). Durante estadíos tempranos, las SC proliferan en presencia de altos niveles de BDNF y NT3 secretadas ambas por las neuronas, mientras que las SC secretan sólo NT3 (Chan et al. 2001). NT3 se une al receptor de neurotrofinas TrkC e inhibe la expresión de proteínas mielínicas como MAG y P0 *in vivo* en nervio ciático (Chan et al. 2001). Luego, durante la elongación y establecimiento de las SC, los niveles de NT3 son indetectables, mientras que BDNF y p75 se mantienen elevados. Así, BDNF se une a p75 y activa la expresión de genes en las SC tales como MAG y P0, promoviendo la formación de internodos mielínicos maduros (Notterpek 2003). Por su parte, el receptor TrkB fue descartado como receptor de BDNF para esta función debido a que la inhibición de p75 con 2 bloqueadores distintos se traduce en la inhibición de la acumulación de proteínas mielínicas y de la formación de internodos mielínicos maduros (Cosgaya et al. 2002). En contraste, el anticuerpo que bloquea la unión de BDNF produce una acumulación de proteínas mielínicas e internodos maduros (Cosgaya et al. 2002, Notterpek 2003). En nervios mielínicos, todas las neurotrofinas y sus receptores disminuyen su expresión, mientras que el exceso de BDNF es removido por una variante dominante negativa del receptor, TrkB.T1, la cual carece del dominio tirosina quinasa (Cosgaya et al. 2002, Notterpek 2003), controlando de esta manera los niveles del ligando. De esta forma, el receptor p75 regula la formación de la mielina mediante la expresión de proteínas mielínicas por parte de las SC. La posible función de p75 en la mielinización ha sido estudiada en animales nulos para este receptor. Análisis de “g-ratio”,

indicador del grosor de la mielina y, con ello, de la velocidad de conducción (Chomiak and Hu 2009), han mostrado que en condiciones basales, la vaina de mielina de ratones nulos para *p75*^{-/-} es de menor calibre que la de animales control (Song et al. 2006). Más aun, en un modelo de daño inducido por aplastamiento de nervio ciático se determinó que 2 semanas luego de la injuria, el número de axones mielínicos se redujo en los animales carentes en *p75* (Song et al. 2006). Imágenes de microscopía electrónica de transmisión permitieron determinar que los nervios de animales *p75*^{-/-} poseen mielina de menor grosor rodeando a los axones en comparación a los animales control (Song et al. 2006). La expresión de proteínas mielínicas como MAG y P0 no presenta diferencias en condiciones basales en los ratones *p75*^{-/-}. Sin embargo, 2 semana posterior al aplastamiento del nervio ciático los animales control recuperan los niveles normales de MAG y P0, en comparación con los ratones *p75*^{-/-}, que sólo recuperan un 67% de la expresión de estas proteínas mielínicas (Song et al. 2006). Resultados contrapuestos fueron presentados por Ferri y colaboradores, donde 25 días post injuria en nervio se observa un aumento en el número de axones mielínicos en ratones *p75*^{-/-} en comparación al control. Además, en este trabajo, el grosor de las vainas de mielina no se encontró alterado en ratones *p75*^{-/-} (Ferri et al. 1998).

En su conjunto, estos resultados revelan que el receptor de neurotrofinas *p75* regula la migración de las SC luego de la injuria, la mielinización en estadios

tempranos del desarrollo y la apoptosis de motoneuronas, siendo su función en la mielinización luego de la injuria controversial.

1.2.5 P75 en sistema nervioso sensorial

El cuerpo es capaz de percibir sensaciones debido a las sinapsis de las neuronas sensoriales localizadas en el ganglio de la raíz dorsal (DRG), los cuales se ubican paralelos a la médula espinal y las neuronas sensoriales provenientes del ganglio Trigeminal (TG) localizado en la base del cerebro. Mientras que las neuronas de las DRG inervan las extremidades del cuerpo, las que provienen de TG inervan la cabeza (Ceni et al. 2014).

Las neuronas sensoriales son clasificadas según el estímulo primario al cual responden y estimulan al SNC. Se clasifican en: los mecanorreceptores, que perciben estímulos mecánicos; propioceptores, que detectan movimiento muscular; termorreceptores, que responden a temperaturas y nociceptores, los cuales responden a dolor (Ceni et al. 2014).

Las neuronas sensoriales de ganglio trigeminal de ratones adultos *p75*^{-/-} se encuentran reducidas en un 30 % en comparación a animales control, analizadas en la porción rostral del tracto trigeminal, cuantificadas mediante tinción para el péptido relacionado al gen de calcitonina (CGRP) para la detección de neuronas trigeminales. Sin embargo, no hay diferencia en los niveles de NGF (Krol et al. 2001). A su vez, las neuronas sensoriales cutáneas trigeminales de ratones *p75*^{-/-} poseen una reducción a la respuesta a NGF, donde es necesario aumentar 3

veces la concentración del ligando para obtener la mitad de respuesta máxima en cultivos de neuronas sensoriales cutáneas. Estas neuronas responden de manera dosis dependiente al ligando NGF promoviendo la supervivencia celular, indicando que el receptor p75 aumenta la sensibilidad de neuronas sensoriales cutáneas al ligando NGF (Davies et al. 1993).

Por otra parte, las neuronas sensoriales provenientes de DGR también se encuentran alteradas debido a la ausencia del receptor p75. Así, los DRG de ratones *p75*^{-/-} son de menor tamaño y poseen una disminución de 50% en el número de las neuronas que inervan las extremidades (Lee et al. 1992). Además, los ratones *p75*^{-/-} pierden sensibilidad al calor, consistente con la disminución en la inervación cutánea (Lee et al. 1992).

Al igual que con las neuronas sensoriales del ganglio trigeminal, las neuronas de DRG de embriones de ratones *p75*^{-/-} poseen una disminución en la sensibilidad al ligando NGF. Los cultivos de neuronas DRG requieren 3 veces mayor concentración del ligando NGF para obtener la mitad de la respuesta máxima, en este caso, desencadenar apoptosis. Por otra parte, en cultivos de neuronas del ganglio cervical superior (SCG) se observó una pequeña pero significativa disminución en la sensibilidad a NGF (Lee et al. 1994b).

Respecto al desarrollo de neuronas simpáticas, se analizó la glándula pineal quien recibe inervación del SCG en ratones *p75*^{-/-}. El tamaño de la glándula de ratones *p75*^{-/-} es menor y posee menor número de fibras. En concordancia, como la inervación simpática colinérgica regula procesos secretorios, se analizaron las

glándulas sudoríparas de animales *p75*^{-/-}. Al estimular la producción de sudor de la planta de las extremidades de los animales, los ratones *p75*^{-/-} generan una escasa o ausente cantidad de sudor (Lee et al. 1994a).

Por otra parte, la inervación sensorial en músculo es realizada a través de los husos neuromusculares, los cuales son receptores propioceptivos de la musculatura esquelética que permiten la sensación de posición del cuerpo. El receptor *p75* posee un importante rol en la modulación de la señalización mediada por NT3, la cual es requerida para el correcto desarrollo de los husos neuromusculares (Fan et al. 1999). El factor de respuesta temprana *Egr* es un regulador transcripcional que se une a elementos regulatorios del promotor de *p75*, regulando su expresión tanto en las células de la cápsula del huso como en las fibras musculares intrafusales. Así, ratones *Egr*^{-/-} poseen una disminución en la expresión del receptor de neurotrofinas *p75* (Gao et al. 2007). En concordancia, ratones *p75*^{-/-} poseen un menor número de husos musculares en el músculo de la extremidad posterior *Soleus*. Sin embargo, no presenta variaciones en la cantidad de husos presentes en los músculos lumbrical, plantaris o gastrocnemio (Fan et al. 1999). Por lo tanto, no se atribuyen a alteraciones en el huso una contribución mayor al fenotipo motor encontrado en los animales carentes de *p75* (Akay et al. 2014).

En su conjunto, estas evidencias revelan que *p75* regula el desarrollo sensorial y participa en la correcta formación de los husos neuromusculares, donde su

ausencia produce una alteración en la formación de husos en algunos músculos y por ende, una menor percepción propioceptiva.

1.2.6 Receptor de neurotrofinas p75 en el control motor

Para la generación del movimiento controlado es necesario el correcto funcionamiento de la sinapsis neuromuscular. En el músculo, se ha descrito que el receptor p75 es expresado durante la miogénesis, donde p75 se observa en células que expresan MyoD1, un marcador de mioblastos. Cuando los mioblastos se fusionan y diferencian a miotubos, las células dejan de expresar p75, analizado por hibridación *in situ* en embriones de rata (Wheeler and Bothwell 1992). Consistente con estos hallazgos, análisis *in vitro* demuestran que mioblastos de la línea celular muscular de ratón C2C12 expresan p75 y NGF, y que luego de la fusión de los mioblastos para generar los miotubos su expresión disminuye (Reddypalli et al. 2005). La función que cumpliría p75 en mioblastos es de supervivencia celular. Cultivos primarios de mioblastos expresan p75 y la adición del ligando NGF produce la fosforilación de AKT e I κ B, moléculas involucradas en la señalización de supervivencia celular (Reddypalli et al. 2005). Concordante con estos resultados, el tratamiento de cultivos de la línea celular muscular LGC5 con el ligando NGF promueve la proliferación y diferenciación celular (de Perini et al. 2017). Adicionalmente, p75 contribuye a la fusión de los mioblastos. De esta forma, la inhibición de la señalización NGF/p75 mediante la utilización de un anticuerpo dirigido contra el receptor, reduce el índice de fusión

de los mioblastos en cultivo primario de células satélites de ratón (Deponti et al. 2009).

Por otra parte, el componente presináptico de la unión neuromuscular, la motoneurona, también varía la expresión de p75 durante el desarrollo. El receptor de neurotrofinas es expresado en el asta ventral de la médula espinal, conjuntamente con las motoneuronas en sentido rostral a caudal entre los estadios E11- E13, mientras al día postnatal 10 desaparece la expresión de p75 (Yan and Johnson 1988). El ARN mensajero de p75 es expresado a altos niveles en motoneuronas al tiempo donde ocurre naturalmente la muerte celular. Después de lesión por aplastamiento del nervio ciático se ha observado un incremento de la expresión de p75 de 8 veces en las motoneuronas de la médula espinal (Ernfors et al. 1989). A este respecto, ratones *p75*^{-/-} poseen un menor número de motoneuronas respecto al control. En contraposición, luego de injuria por axotomía del nervio facial, los ratones *p75*^{-/-} poseen un mayor número de motoneuronas 25 días después del daño respecto a animales control sometidos a axotomía. Así, los ratones *p75*^{-/-} poseen un porcentaje de supervivencia de motoneuronas de un 85 % en comparación a los animales control que presentan un 68% de supervivencia neuronal luego del daño (Ferri et al. 1998). Por lo tanto, p75 participa en la regulación del desarrollo muscular en la miogénesis, así como en el de motoneuronas y su regeneración.

Respecto al movimiento, se ha reportado que ratones *p75*^{-/-} presentan alteraciones en pruebas de comportamiento. Al respecto, los animales nulos para

este receptor de neurotrofinas presentan un menor tiempo de latencia en la prueba *water maze* en comparación con el control, indicando una alteración la memoria espacial. Similares resultados fueron obtenidos en el test de comportamiento de aprendizaje inhibitorio, para evaluar aprendizaje y memoria, donde el tiempo de latencia en este ensayo fue menor en los ratones *p75*^{-/-}. Sin embargo, al realizar el test de actividad motora y de habituación donde se miden los movimientos exploratorios de los animales en una caja mediante un sensor fotoeléctrico, los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} posee mayor movimiento, mostrando un nivel de asintonía con el piso mayor en comparación a los ratones control (Peterson et al. 1999). Por lo tanto, los datos sugieren que la ausencia del receptor *p75* se traduce en alteraciones en el comportamiento motor. En concordancia con estas alteraciones, los ratones *p75*^{-/-} presentan menor fuerza muscular analizado en edades desde grupos postnatales jóvenes hasta animales de 913 días de edad (Reddypalli et al. 2005).

Por lo tanto, la señalización dependiente de p75 está involucrada en el desarrollo del músculo y de las motoneuronas, componentes esenciales de la UNM. Más aun, la ausencia de este receptor produce defectos en el comportamiento y debilidad muscular. A partir de estos antecedentes surge el cuestionamiento si el receptor p75 regula la estructura y correcta sinapsis neuromuscular adulta.

1.3 Neurotrofinas en la Unión Neuromuscular

Las neurotrofinas y sus receptores son expresados tanto en la motoneurona como en el músculo durante el desarrollo y el periodo adulto. En estos mismos periodos de tiempo, algunos de los receptores de esta vía de señalización han sido asociados a la liberación de ACh en la UNM (Nadal et al. 2017, Tomas et al. 2017). Tanto los ligandos como los receptores de esta vía de señalización se localizan en los tres componentes de la sinapsis neuromuscular (Funakoshi et al. 1995), regulando la transmisión sináptica, estructura y mantención de la UNM.

1.3.1 Localización de neurotrofinas en la unión neuromuscular

La localización subcelular de los distintos ligandos y receptores de neurotrofinas en la UNM ha sido analizada principalmente por el grupo de investigación del Dr. García y colaboradores. Sus resultados muestran que la expresión de estas proteínas varía en la sinapsis neuromuscular desde estados postnatales tempranos a UNMs adultas (**Figura 2**).

NT4

En el músculo *Levator Auris Longus* (LAL) de ratas de 6 días postnatales, NT4 se localiza con los agregados del AChR y en el terminal de la motoneurona. (Garcia et al. 2010b). Esta neurotrofina es expresada preferentemente en las fibras tipo I de contracción lenta y los niveles de expresión dependen de la actividad eléctrica de esta sinapsis. Así, luego de la estimulación eléctrica del

nervio ciático se observa un aumento del ARNm de NT4 entre 4-7 veces, siendo este incremento dependiente del voltaje aplicado (Funakoshi et al. 1995). En concordancia, al bloquear la transmisión sináptica con α -bungarotoxina en músculo soleus se produce un 80% de parálisis en el músculo a las 12 horas posterior al tratamiento, provocando una disminución en los niveles del ARNm de NT4 de 20 veces (Funakoshi et al. 1995). La localización de esta neurotrofina en UNM adulta de ratas de 30-40 días de edad se encuentra en la motoneurona, el aparato postsináptico con AChR y células de Schwann. No se localiza en el espacio extrasináptico (Garcia et al. 2010e).

BDNF

Este ligando se expresa preferentemente en su forma madura BDNFm en músculo de ratas de edad postnatal 6 presentando 3,3 veces mayor cantidad de dicha forma en relación a su forma inmadura como proBDNF. En UNM inmaduras, mediante análisis de inmunohistoquímica se observa que esta neurotrofina se localiza en toda la fibra muscular y en el terminal de la motoneurona (Garcia et al. 2009).

En UNMs adultas BDNF se localiza principalmente en la región postsináptica muscular, región enriquecida en sinapsis neuromusculares, mientras que continúa localizándose en el terminal axónico motor. En estas sinapsis adultas, la neurotrofina BDNF se localiza también en células de Schwann (Garcia et al. 2010e).

NT3

NT3 es expresada en animales en desarrollo de edad p6, localizándose en la motoneurona tanto en el axón terminal, región de la motoneurona que hace contacto directo con la fibra muscular, así también como en la región preterminal del axón motor, región previa al contacto con el músculo. Por su parte, el receptor de esta neurotrofina, TrkC, se localiza tanto en el axón motor como en el aparato postsináptico conjuntamente con los AChRs. En sinapsis neuromusculares adultas, la ubicación de NT3 se mantiene en la motoneurona, no así en las células de Schwann (Garcia et al. 2010c).

GDNF

Otro factor neurotrófico que ha sido descrito es GDNF. Dicho ligando se sitúa conjuntamente con su receptor GFR α 1 en músculo tanto en UNMs inmaduras (p6) como maduras (p45), determinado mediante análisis por Western Blot. Mediante inmunohistoquímica del músculo LAL de ratas de edad p6 se determinó que GDNF se localiza en el axón motor, en el aparato postsináptico se encuentra difusamente en conjunto con AChR y está ausente en las células de Schwann de la UNM. Adicionalmente, el receptor GFR α 1 sólo co-localiza con el axón motor. Sin embargo, en UNMs adultas, tanto GDNF como su receptor se localizan en los 3 componentes de la sinapsis neuromuscular (Garcia et al. 2010a).

TrkB

La localización del receptor TrkB en estadios tempranos del desarrollo neuromuscular a la edad postnatal 6 se encuentra en los tres componentes de esta sinapsis (Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2010b, Garcia et al. 2010d). En UNMs adultas, esta localización se mantiene en el axón motor terminal y preterminal, el músculo y las células de Schwann (Garcia et al. 2010e).

p75

El receptor p75 se expresa en los 3 componentes de la unión neuromuscular en sinapsis inmaduras de edad postnatal 6. Así, colocaliza con el axón motor, agregados del AChR y células de Schwann (Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2010b).

p75 es expresado en músculo adulto. Análisis realizados mediante Western Blot en músculo LAL de ratas de 30-40 días de edad confirman la presencia de este receptor (Garcia et al. 2010e) Igualmente, la localización específica de p75 en UNMs adultas se encuentra en el axón motor, músculo postsináptico y células de Schwann (Garcia et al. 2010e).

Por lo tanto, todas las neurotrofinas y sus receptores se encuentran en los distintos componentes de la unión neuromuscular, tanto en sinapsis neuromusculares inmaduras como maduras, proponiendo la participación de esta vía de señalización en la transmisión sináptica, estructura y mantención de esta sinapsis.

1.3.2 Neurotrofinas en la transmisión sináptica Neuromuscular

Las neurotrofinas son requeridas para el correcto funcionamiento de la sinapsis neuromuscular. De esta forma, la liberación de neurotrofinas por parte de las fibras musculares potencian la liberación de neurotransmisores por parte de las motoneuronas ejerciendo un efecto transináptico. Adicionalmente, la inhibición de receptores TrKB y p75 disminuyen la transmisión sináptica. (Wang and Poo 1997, Xie et al. 1997, Mantilla et al. 2004, Garcia et al. 2010a, Garcia et al. 2010b, Garcia et al. 2010c, Garcia et al. 2010d, Garcia et al. 2010e, Garcia et al. 2011).

NT4

Análisis detallados de la contribución de cada neurotrofina y su receptor a la transmisión neuromuscular señala que NT4, al ser incubada en dosis bajas (2nM) por tiempos prolongados de 3 horas en preparaciones de músculo LAL *ex vivo*, potencia la liberación del neurotransmisor ACh en UNMs adultas de edad postnatal 45 días, no así en sinapsis inmaduras de 6 días (Garcia et al. 2010b). En concordancia, mediante ensayos electrofisiológicos de estimulación directa al músculo *Soleus* y registro intracelular se determinó que ratones *NT4*^{-/-} poseen una reducción en la amplitud del potencial de acción generado en comparación al control, indicando alteraciones intrínsecas musculares. Además, estos animales presentan una alteración en ensayos de electromiografía, presentando un menor valor de amplitud bajo la estimulación de baja frecuencia a 10Hz del nervio ciático y un incremento en la fatiga del músculo de fenotipo lento *Soleus*

en comparación a los animales control (Belluardo et al. 2001). Estas alteraciones no fueron encontradas en el músculo de contracción rápida *Extensor digitorum longus* (EDL) (Belluardo et al. 2001), consistente con el hecho de que NT4 se expresa preferentemente en fibras musculares lentas (Funakoshi et al. 1995). Utilizando co-cultivos neurona-músculo de *Xenopus* se ha descrito que NT4 ejerce un efecto transináptico retrógrado en la UNM, donde la sobreexpresión de NT4 en mioblastos aumenta a frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (MEPCs), indicador de un aumento en la liberación espontánea del neurotransmisor. De forma interesante, la sobreexpresión de esta neurotrofina en motoneuronas no resulta en un incremento en la frecuencia de los MEPCs, indicando que NT4 de origen muscular promueve la liberación espontánea de ACh. En concordancia, la sobreexpresión de NT4 muscular aumenta la transmisión sináptica evocada, en la cual el axón motor es estimulado para generar la corriente postsináptica excitatoria (EPCs). Todos estos efectos de potenciación por parte de NT4 son inhibidos por la presencia extracelular de TrkB-IgG, proteína recombinante que se une a NT4 extracelular, disminuyendo su disponibilidad, indicando que NT4 muscular es secretado y tiene un efecto sobre la liberación del neurotransmisor por parte del axón motor (Wang and Poo 1997).

BDNF y TrkB

La neurotrofina BDNF también participa en la regulación de la transmisión sináptica neuromuscular. En UNMs de edad postnatal p6, BDNF favorece la liberación del neurotransmisor ACh reflejado por un incremento en el potencial de placa terminal EPP en todos los contactos sinápticos independiente de su estado de maduración en el desarrollo, afectando el 100% de las UNMs poli-inervadas y el 70-90% de la sinapsis mono-inervadas (Garcia et al. 2009). BDNF también potencia la liberación del neurotransmisor en UNMs maduras (Garcia et al. 2009). Un estudio reciente muestra que el este efecto depende de una comunicación retrógrada entre miotubos y axón motor, a través de una señalización BDNF/TrkB/p75. El mecanismo propuesto es que BDNF muscular incrementa con la contracción muscular y es liberado al espacio sináptico donde se une al complejo de receptores TrkB/p75 en la superficie de la motoneurona. Dicha interacción producirá la activación de la proteína Quinasa C dependiente de calcio (cPKC) cuya expresión es exclusivamente neuronal. De esta manera, cPKC regula los niveles de calcio en el terminal sináptico, favoreciendo la liberación del neurotransmisor (Hurtado et al. 2017).

NT3

En concordancia con el rol de neurotrofinas favoreciendo el correcto funcionamiento de la sinapsis neuromuscular, NT3 incrementa la transmisión sináptica cuantificada como potencial de placa terminal EPP en 50-70% en

preparaciones de músculo LAL *ex vivo* mediante estimulación del nervio. El incremento en la transmisión fue observado en UNMs inmaduras que se encuentran poli-inervadas por dos terminales axónicos motores en ratones de 6 días de edad postnatal. Esta potenciación ocurre tanto en el terminal de transmisión fuerte, que es sinápticamente más activo, como en el axón débil, que libera menor cantidad de neurotransmisor. Sin embargo, NT3 no tiene efecto sobre transmisión sináptica de uniones neuromusculares de animales adultos (Garcia et al. 2010c).

GDNF

En relación a la neurotrofina GDNF los resultados descritos indican que este ligando no posee efectos inmediatos sobre la liberación de ACh en uniones neuromusculares inmaduras como adultas (Garcia et al. 2010a).

p75

De manera interesante, el receptor de neurotrofinas p75 cumple un rol fundamental en la transmisión sináptica neuromuscular, donde p75 con el ligando BDNF promueve la liberación del neurotransmisor en todos los contactos sinápticos, independiente del estado de maduración de la UNM (Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2011). A este respecto, en preparaciones de músculo LAL *ex vivo* de animales de edad 7 días postnatal, la inhibición del receptor mediante la adición de un anticuerpo neutralizante previo a la incubación con BDNF, resulta

en la inhibición de la inducción de la liberación de ACh mediada por el ligando en todos los terminales nerviosos analizados. Así, la inhibición de p75 previene la liberación del neurotransmisor mediado por BDNF, resultando en una menor amplitud de placa terminal EPP de UNMs poli-inervadas tanto por el terminal axónico de mayor como el de menor actividad, que contactan con el aparato postsináptico poli-inervado. De igual forma, la potenciación mediada por BDNF fue anulada al inhibir p75 en UNMs mono-inervadas (Garcia et al. 2009). En concordancia, similares resultados fueron encontrados al evaluar el efecto de la liberación endógena de BDNF mediado por p75 sobre la liberación del neurotransmisor. Así, al realizar un bloqueo funcional del receptor p75 mediante un anticuerpo dirigido contra dicho receptor el cual produce su neutralización, resulta en una menor amplitud de EPP, y por consiguiente liberación de ACh, en UNMs tanto poli-inervadas como mono-inervadas (Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2011).

Por lo tanto, p75 controla la liberación de ACh en todos los nervios terminales de la UNMs durante el proceso de eliminación sináptica (Garcia et al. 2011).

Dados los antecedentes antes mencionados, cabe destacar el rol fundamental que poseen las neurotrofinas en la trasmisión sináptica, en particular el receptor p75, el cual permite la correcta liberación del neurotransmisor por parte del axón motor, generando el correspondiente potencial de placa terminal en la sinapsis neuromuscular. En consideración al rol del receptor p75 en la trasmisión sináptica adulta, los antecedentes sugieren que este receptor podría ejercer algún rol en

la mantención de la UNM a través de la regulación en la maduración de esta sinapsis.

1.3.3 P75 en la eliminación axonal durante la poli-inervación

En los músculos mamíferos, la retracción de los axones motores permite que cada UNM sea inervada por sólo un axón durante las dos primeras semanas postnatales. En este contexto, durante los primeros días postnatales, las UNMs se encuentran inervadas por más de un axón motor. La consecuencia de esta conexión múltiple es que cada fibra muscular recibe la señalización de dos o más axones, permitiendo que ninguna fibra quede sin inervación. Luego de un fino proceso de competición dependiente de la actividad de los axones motores, al día 7 postnatal alrededor de la mitad de las fibras se encuentran inervada por un axón, y finalmente a los 15 días postnatales la UNM de todas las fibras es mono-inervada, permitiendo la contracción muscular controlada (Nguyen and Lichtman 1996).

Durante este proceso las neurotrofinas juegan un rol preponderante. Se ha descrito que ProBDNF secretado por el músculo promueve la depresión sináptica, por ende la disminución en la liberación del neurotransmisor, y consiguiente retracción axonal señalizando a través del receptor de neurotrofinas p75 (Yang et al. 2009). En el año 2012 se demostró en co-cultivos neuronales/musculares de *Xenopus* que en una unión neuromuscular poli-inervada, la señalización mediada por proBDNF/p75 promueve la retracción

axonal del terminal menos activo, mientras que la señalización mediada por BDNF/TrkB facilita la estabilización del terminal más activo (Je et al. 2013). Al evaluar si estos resultados son reproducibles en animales, se determinó mediante el uso de un ratón transgénico *TrkB knock in*, que la disminución en la señalización mediada por TrkB produce la aceleración en la eliminación sináptica en animales de edad postnatal 7, tiempo en el cual ocurre el proceso de competición sináptica (Je et al. 2013). Al inyectar en músculo LAL pro-BDNF o BDNF recombinante en animales control de edad 6 días postnatal, se observa que ProBDNF promueve la persistencia de axones motores, incrementando la poli-inervación de la UNMs (Je et al. 2013).

De manera interesante, ratones *p75^{-/-}* no poseen alteraciones en la inervación de la UNM a los 14 días postnatales. Sin embargo, la inyección diaria de un anticuerpo contra p75 en músculo LAL durante los primeros 14 días postnatal en ratones control, resulta en un incremento en UNMs poli-inervadas respecto a animales control, sugiriendo que los ratones *p75^{-/-}* presentan un efecto compensatorio (Je et al. 2013). A este respecto, p75 requiere de la presencia del receptor sortilina para modular la retracción axonal. Sortilina se localiza tanto en el axón motor como en el aparato postsináptico de la UNM. El bloqueo de sortilina mediante el uso de un péptido que inhibe la unión al ligando en animales *p75^{-/-}* resulta en un incremento en las UNM poli-inervadas respecto a animales control y también respecto a ratones *p75^{-/-}* tratados con un péptido control, en cuyos casos la eliminación sináptica procede normalmente (Je et al. 2013). Por lo tanto,

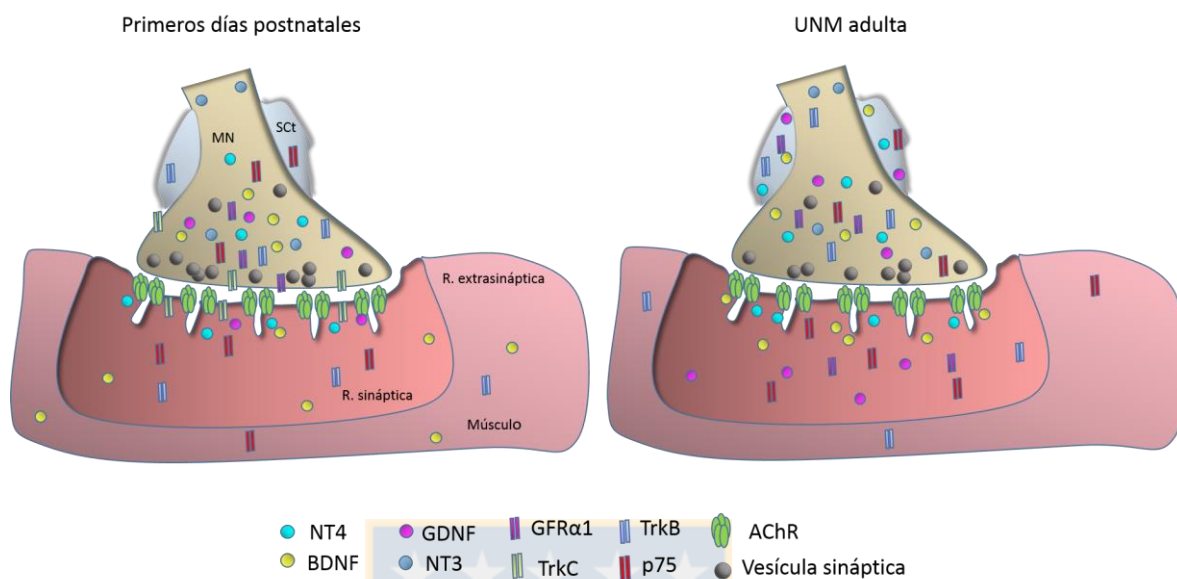


Figura 2: Localización de neurotrofinas y sus receptores en la UNM. Las neurotrofinas son distribuidas en los tres componentes de la UNM, variando su localización desde los primeros días postnatales hasta llegar a la sinapsis adulta. Fuente: Elaboración propia.

ambos receptores son necesarios para la retracción axonal en el proceso de competición sináptica *in vivo*.

En su conjunto, los antecedentes evidencian que las neurotrofinas y sus receptores refinan la unión neuromuscular durante los primeros días postnatales de desarrollo de la UNM.

En consideración que las neurotrofinas regulan tanto la competición sináptica de la UNM y refinamiento de esta durante los primeros días postnatales, así como la trasmisión de esta sinapsis, cabe cuestionarse si podrán estar involucradas en

el proceso de maduración del aparato postsináptico y con ello en la organización estructural de la UNM.

1.3.4 Rol de p75 en la maduración del aparato postsináptico

La morfología del aparato postsináptico cambia durante el desarrollo postnatal en complejidad, variando desde estructuras en forma de placa a pretzels maduros (Bolliger et al. 2010).

Algunas investigaciones han sugerido la participación de las neurotrofinas en la correcta organización estructural de los agregados del AChR. Ratones *NT4*^{-/-} poseen el aparato postsináptico fragmentado, sugiriendo que esta neurotrofina es requerida para la mantención de la UNM en etapa adulta (Belluardo et al. 2001).

Por otra parte, se ha visto involucrada la participación del receptor TrkB en la estabilidad del aparato postsináptico. La variante *trkB.t1* es expresada endógenamente en el sistema nervioso central, periférico y músculo. Aun cuando este receptor puede unirse al ligando, carece del dominio tirosina quinasa, por lo que no puede homodimerizar y conducir señalización por la vía clásica. De esta manera, dicha variante puede actuar como dominante negativa del receptor TrkB (Middlemas et al. 1991). Al infectar el músculo esternomastoideo con un adenovirus que codifica para TrkB.T1 se produce la fragmentación del aparato postsináptico tanto en edades tempranas (p2) como adultas (p26) (Gonzalez et al. 1999). De manera interesante, al infectar cultivos primarios de miotubos con esta variante negativa de TrkB e inducir la agregación de los receptores de

acetilcolina con agrina, se produce de igual manera la disrupción de agregados de AChR, sugiriendo que TrkB muscular y vías de señalización relacionadas propias del músculo podrían afectar el mantenimiento de los agregados del AChR (Gonzalez et al. 1999). En concordancia, ratones nulos para la variante negativa *TrkB.t1* presentan un aumento en el área del aparato postsináptico (Dorsey et al. 2012). Consistente con estos resultados, se ha descrito que, mientras que ratones mutantes heterocigotos *TrkB+/-*, que presentan una expresión reducida del receptor, muestran fragmentación del aparato postsináptico (Kulakowski et al. 2011). A este respecto, junto a la fragmentación de los agregados del AChR en ratones *TrkB +/-*, estos animales presentan una alteración en la neurotransmisión y denervación de fibras musculares en un grado similar a ratones envejecidos control de 24 meses de edad (Kulakowski et al. 2011). Por lo tanto, los antecedentes señalan que el receptor de neurotrofinas TrkB favorece la mantención de la UNM. ***Sin embargo se desconoce el rol de p75 sobre la maduración de la UNM adulta.***

2. HIPÓTESIS

Estudios previos demuestran que la disrupción de la señalización mediada por la vía de señalización de las neurotrofinas regula la formación y mantención de la UNM. El receptor p75 es activado por todos los ligandos de esta vía, participando en etapas iniciales como en la eliminación sináptica de la UNM, mientras que en etapas adultas se ha implicado en facilitar la transmisión sináptica. Sin embargo, *el rol que cumple el receptor p75 en la maduración de la UNM adulta es desconocido.*

Al respecto, se ha descrito que el bloqueo de función de p75 mediante anticuerpos en músculo de animales de edad P6, produce una aceleración en la maduración de los agregados del AChR (Garcia et al. 2011). Adicionalmente, p75 se localiza en la UNM adulta siendo su presencia relacionada, hasta el momento, sólo con la regulación de la liberación del neurotransmisor. Más aún, la alteración en la expresión de otros receptores de neurotrofinas presentes en la UNM adulta, resulta en la disrupción de la estructura de esta sinapsis. En base a esta evidencia, la **hipótesis** de este trabajo de tesis es:

El receptor de neurotrofinas p75 es requerido para la maduración de la unión neuromuscular.

OBJETIVO GENERAL: Caracterizar la progresión de la maduración de la unión neuromuscular adulta y sus consecuencias funcionales en el ratón *p75*^{-/-}.

Para resolver la problemática planteada, nos hemos propuesto los siguientes

objetivos específicos:

- 1.- Establecer la presencia de alteraciones motoras en ratones *p75*^{-/-}.
- 2.- Analizar la morfología y fisiología muscular de ratones *p75*^{-/-}.
- 3.- Determinar la presencia de alteraciones en la progresión de la maduración y función de la UNM en ratones *p75*^{-/-}.
- 4.- Determinar la contribución del receptor *p75* expresado en el músculo y axón motor sobre la estructura de la UNM de ratones *p75*^{-/-}.

3. MATERIALES

3.1 Animales de experimentación

Se obtuvieron ratones C57BL/6J nulos para el receptor de neurotrofinas p75 (Lee et al. 1992) y sus pares control del origen genético p75 gracias a la colaboración con la Dra. Francisca Bronfman de la Pontificia Universidad Católica. Los animales fueron adquiridos en *The Jackson Laboratory* y corresponden a las cepas de ratón B6.129S4-Ngrtm1Jae/J. La colonia fue mantenida en el Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile, siendo utilizados para esta investigación edades de 2-4 meses. Los animales fueron transportados en avión hasta Concepción según su requerimiento y mantenidos en una cabina especialmente acondicionada con ventilación de extracción forzada, bajo condiciones de temperatura controlada 22-25°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron alimentados con pellets (Prolab RMH-3000, LabDiet) y agua *ad libitum*. Todos los ensayos motores y sensoriales fueron realizados en distintas salas de procedimientos según el análisis a realizar acondicionadas para el manejo de animales. De esta forma, los ensayos de Von frey, test de sensibilidad al frío y calor fueron realizados en la sala de procedimiento de animales de la Pontificia Universidad Católica de Santiago. Los ensayos de test de grilla invertida, test de barras estáticas, actividad espontánea en cilindro y test de triple barra horizontal, fueron realizados en una sala de procedimientos acondicionada para el manejo de animales en el Departamento de Biología

celular de la Universidad de Concepción, mientras que el test motor rotarod fue realizado en la sala de procedimientos del Departamento de Fisiología de la misma Universidad. El ensayo de fuerza muscular de pesos y de contracción muscular fueron realizados en sala de procedimiento de animales de la Universidad Andrés Bello en Santiago, mientras que los registros electrofisiológicos de electromiografía se ejecutaron en la Universidad de Valparaíso. Todos los análisis realizados fueron ejecutados bajo condiciones de temperatura controlada en las habitaciones, con aislante acústico para evitar el estrés de los animales.

Los ensayos electrofisiológicos *in vivo* se realizaron bajo anestesia inhalatoria de isoflurano 2 % (v/v) en oxígeno, monitoreando constantemente la temperatura corporal y la frecuencia de respiración. Los procedimientos experimentales fueron conducidos siguiendo los protocolos del manual de bioseguridad y bioética de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Gobierno de Chile) y del Comité de Bioética de la Universidad de Concepción.

3.2 Anticuerpos

Lista de anticuerpos primarios utilizados en la dilución indicada respecto del propósito experimental. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos.

Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. IHQ: inmunohistoquímica; ICQ: Inmunocitoquímica; WB: Western blot. Fuente: Elaboración propia.

Antígeno	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
Neurofilamento (ab8135)	Policlonal	Conejo	ABCAM	IHQ	1:1000
2H3	Monoclonal	Ratón	DSHB	IHQ	1:300
MBP	Monoclonal	Ratón	Boehringer Mannheim	IHQ	1:400
SV2 (AB 2315387)	Monoclonal	Ratón	DSHB	IHQ	1:50
α Tubulina	Monoclonal	Ratón	Sigma	ICQ	1:1000
Troponina C	Monoclonal	Ratón	Hibridoma Bank	WB	1:1000
MHC MF-20	Monoclonal	Ratón	Hibridoma Bank	WB	1:1000
GAPDH	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	WB	1:1000
S100 (Z0311)	Policlonal	Conejo	Dako	IHQ	1:100
α BTX			Molecular Probes	ICQ-IHQ	1:500
DAPI			ThermoFisher	IHQ	1:100
Faloidina			Invitrogen	ICQ	1:200
Fab	Monoclonal	Ratón	Jackson	IHQ	1:43
p75	Policlonal	Conejo	Alomone Labs	IHQ	1:100
Nestina	Monoclonal	Ratón	RD Transduction Laboratories	IHQ	1:100

Antígeno	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
p35	Policlonal	Conejo	Santa Cruz	IHQ	1:25

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados.

Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. IHQ: inmunohistoquímica; ICQ: Inmunocitoquímica; WB: Western blot. Fuente: Elaboración propia.

Fluoróforo	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
Cy2	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	IHQ	1:300
Cy3	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	ICQ IHQ	1:300
Cy5	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	IHQ	1:300
IgG HRP		Ratón	Jackson	WB	

3.3 Reactivos y soluciones en general

Acetona (Merck); etanol (Merck), HCl (Merck), isopentano (Merck), isopropanol (Merck), Glicina (US Biological); Tween 20 (US Biological); BSA (Rockland); medio de montaje acuoso VectaMount AQ (Laboratorio Vector), medio de montaje acuoso para fluorescencia (DakoCytomation), medio para montaje histológico Entellan (Merck), Paraformaldehído (Sigma), Formaldehído (FA) 1,5 %/ (v/v) (Millipore); *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4); Tampón

Trisfosfato/Albúmina de suero bovino (BSA) 1% (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl; 1 % p/v de BSA); Solución fisiológica externa (135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 12 mM de NaHCO₃, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 12 mM de glucosa); suero fisiológico de cloruro de sodio 0,9 % (Airoflex); Bromuro de pirodostigmina en comprimidos, Mestinon (Roemmers); O.C.T Compound Tissue-Tek (Sakura); Membrana de Nitrocelulosa, 0,45 µm (Bio-RAD); Tinta china (Pelikan); Acetona (Millipore); NADH-NBT (Tampón Tris 1X pH 7,4; NADH reducido; NBT, nitro-blue tetrazolium) (Sigma, St. Louis, MO, USA; Picro-Sirius Red 80 (Direct Red); Hematoxilina de Weigert; marcador de membrana glutinina del germen de trigo (WGA) (Thermo Fisher) y Formaldehido (Millipore).

3.3.1 Reactivos de cultivo celular

Los reactivos utilizados para el cultivo primario de células musculares fueron los siguientes: Colagenasa tipo I (Sigma); Medio de cultivo DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco); Glutamax 100 1 % (v/v) (Gibco); Suero Bovino Fetal 10 % (v/v) (Gibco), Suero equino 10 % (v/v) (Hyclone); Tripsina C (Tripsyn EDTA solution C, Biologicas Industries); BIOAMF-2 (Biological Industries); L-15 (Gibco); Poliornitina (Sigma) y Laminina (Sigma).

3.4 Material en general y equipos disponibles

Cubreobjetos discoidales de vidrio de 12 mm de diámetro (Deckglaser); cubreobjetos rectangulares 24X50 mm (Citoglas); portaobjetos (Citoplus); placas para cultivo celular de 35, 60 y 100 mm de diámetro (Corning); placas para cultivo celular de 24 pocillos (Truline); pipetas de plástico estériles de 5 y 10 ml, tubos cónicos de 15 y 50 mL, material de disección (FST), pipetas pasteur de vidrio (HIRSCHMANN); Kit Sylgard 184 Dow (Corning); Kit de filamentos Von FREY (BIOSEB); Equipo Rotarod Roto-Rod IITC (Life Science); Equipo Hot plate (*Plantar test*, Ugo Baseline SRL 37370-001); Cadenas con distintos número de eslabones para ensayos de fuerza; Transductor de fuerza isométrica MLT 1030 (AD Instruments, Dunedin, New Zealand), unido a sistema de detección de datos PowerLab 4/25 (ADInstruments); Estimulador (Square Wave Electric Stimulator, Phipps and Bird 7092-611); Estimulador S48 (Grass Research Instruments, West Warwick, RI, USA); Microscopio Electrónico de transmisión PHILIPS TECNAI 12 BIOTWIN localizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile en su Unidad de Microscopía Avanzada (UMA); Estereomicroscopio AxioZoom.V16 completamente equipado, el cual posee un zoom 16x con objetivos de alta apertura numérica de 0,25, 1,0x y 2,3x con un factor de acercamiento de 12,5:1 (generando magnificación desde 11x hasta 410x) equipado con un sistema Apotome (Carl Zeiss); Microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse i80 equipado con un monocromo Nikon DS Qi1Mc de calidad HQ y cámara digital acoplada; Máquina de anestesia inhaladora (SciVerna Scientific); gabinete de

bioseguridad (Nuair) tipo II; cámara de incubación Thermo Hepaclass 100 (37°C, 5% de CO₂); microscopio invertido Olympus CK40, una centrífuga (Kubota); baño termostático (SI Shel Lab), incubadora termostática (Thermo Hepaclass 100).

Además, para el procesamiento de tejido muscular, el laboratorio cuenta con un gabinete de bioseguridad tipo I y material quirúrgico adecuado para la disección de animales, tres estereomicroscopios con luz fría (Leyca) y cámara digital (Moticam 2000), un microscopio óptico (Zeiss), un microscopio de epifluorescencia (Nikon 80i) y un vibrátomo (Leica).

Por otra parte, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción cuenta con el Centro de Microscopía Avanzada CMA-Biobío, el cual posee un microscopio de súper resolución LSM Elyra (Zeiss), un microscopio confocal LSM700 (Zeiss), un microscopio espectral LSM 780 (Zeiss) y un Criostato Thermo Scientific Microm HM 525.

4. MÉTODOS

4.1 Mediciones generales de los animales

4.1.1 Ensayo de suspensión de la cola

Los ratones fueron sujetos de sus colas y suspendidos en el aire. Se evaluó la postura de las extremidades posteriores en el momento de la suspensión durante 15 s observando si los ratones son capaces de extender las extremidades posteriores y separarlas del cuerpo durante el ensayo (Sato et al. 2008).

4.1.2 Test de medición de huellas

Consiste en teñir la planta de las 4 extremidades del ratón con tinta china y luego hacer caminar al animal sin presiones sobre un papel filtro. Se obtuvieron registros de las huellas de los ratones al caminar y se cuantificó la distancia entre las pisadas delanteras y traseras (mm), como también la distancia de las zancadas de los ratones (cm), siendo un indicador del patrón de marcha del animal (Brooks et al. 2012).

4.1.3 Índice de cifosis

El índice cifótico es un indicador de la curvatura de la columna (Laws and Hoey, 2004). Se calcula midiendo la relación entre dos distancias; D1: distancia entre

la vértebra cervical 7 (C7) hacia la vértebra lumbar 6 (L6) y D2: distancia perpendicular desde D1 hacia el punto de máxima curvatura de la columna. El índice cifótico (KI) corresponde a la relación entre D1/D2, siendo el índice de cifosis inversamente proporcional a la cifosis (Laws and Hoey 2004, Messeant et al. 2015). El análisis radiológico fue realizado en colaboración con la clínica veterinaria de la Universidad de Concepción. Para ello, se anestesiaron los ratones por vía inhalatoria con isoflurano 2,5 %. Luego los animales fueron posicionados y estirados mediante sujeción para poder evaluar la curvatura de la columna mediante radiografías. El examen fue realizado por la médico veterinaria Dra. Paulina Villegas utilizando el equipo de imagenología disponible en la clínica veterinaria.

4.2 Test Motores

Los ratones fueron aclimatados previo a cada ensayo en la correspondiente sala de procedimientos durante 20 min. Las habitaciones para el trabajo con animales cuentan con condiciones controladas de temperatura y aislación acústica para evitar el estrés de los animales, como fue descrito en la sección 3.1. Se realizó la comparación entre los tiempos y puntajes, según lo indica cada test, obtenidos entre los ratones *p75*-/- en comparación a animales control del origen genético *p75*.

4.2.1 Test Rotarod

Para evaluar coordinación motora y equilibrio, luego de la ambientación, se procedió al entrenamiento de los ratones en el equipo rotarod. Para ello, los animales fueron posicionados sobre cilindros horizontales que giran con aceleración desde 4 hasta 40 rpm durante 120 s y se cuantificó el tiempo que demoran en caer, que es automáticamente registrado por el equipo. Durante el entrenamiento se realizaron 8 mediciones consecutivas por ratón con un tiempo de descanso de 2 min entre cada medición. Al día siguiente, se empezaron a registrar las mediciones que conforman los gráficos. Estas fueron 8 por animal bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Se repitió el análisis en días consecutivos según los requerimientos de cada experimento. Se realizó la comparación entre los tiempos obtenidos entre los ratones *p75*-/- con sus pares control (Brooks et al. 2012, San Martin et al. 2016).

4.2.2 Test de triple barra horizontal

Para medir coordinación motora y fuerza, los ratones fueron posicionados en el centro de 3 distintas varillas horizontales con diámetros distintos (2, 4 y 6 mm). Un diámetro a la vez, desde el mayor al menor, los ratones fueron posicionados sobre el centro de cada cilindro y se cuantificó el tiempo que demoró cada animal en llegar al extremo de cada varilla. Este análisis de equilibrio se realiza a 30 cm de distancia del suelo con un tiempo máximo de prueba de 30 s. Se realizó el test

2 veces por animal y se promedió el tiempo obtenido en cada barra. El valor obtenido fue tabulado asignándole un puntaje según el tiempo que demoraron en caer, según los siguientes parámetros: 1 punto: si el animal cayó ente 1-5 s, 2 puntos: si cayó entre 6-10 s, 3 puntos: 11-20 s, 4 puntos: 21-30 s, y si cae después de 30 s o no cae se le asignó el puntaje máximo de 5 (Deacon 2013a).

4.2.3 Test de barras estáticas

Para medir coordinación motora y motivación de los animales, se realizó el test de barras estáticas, el cual consiste en 5 barras de madera de diámetros decrecientes (31 a 8 mm) y que poseen 60 cm de longitud, los cuales se encuentran unidos por un extremo a una plataforma a una distancia de 60 cm del suelo. El ensayo consiste en posicionar los ratones sobre una barra a la vez en el extremo unido a la plataforma en orden de mayor a menor diámetro y se cuantificó el tiempo que demora el animal en llegar desde el extremo unido a la plataforma al extremo libre.

Se realizó el test 2 veces por ratón y se promedió el tiempo por cada barra (Deacon 2013a).

4.2.4 Test de actividad espontánea en cilindro

La función sensoriomotora fue analizada mediante el Test de actividad espontánea en cilindro. Para ello, los ratones fueron posicionados dentro de un

cilindro de vidrio transparente de 15 cm de diámetro y se cuantificó el número de veces que los ratones treparon en el vidrio apoyando ambas extremidades anteriores sobre el mismo durante un tiempo de 3 min. Se realizó la comparación entre los resultados obtenidos con los ratones *p75*-/- y sus pares control (Fleming et al. 2013).

4.3 Test Sensoriales

De manera similar a lo descrito previamente para los análisis motores, los ratones fueron ambientados durante 20 min para su aclimatación previo a cada ensayo en una sala de procedimientos según el test a realizar, según lo descrito en la sección 3.1.

4.3.1 Test de Von Frey

La sensibilidad mecánica se midió mediante la aplicación del test Von Frey. Los ratones fueron posicionados en cajas de vidrio (23x18x14 cm) sobre un piso de rendija con un tamaño de tamiz de 0,8 cm de diámetro. Luego de la aclimatación y el cese del comportamiento exploratorio de los animales, éstos fueron expuestos a un estímulo mecánico en una de las extremidades posteriores. Este estímulo consta de la aplicación de filamentos que ejercen una fuerza definida (0,008; 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1; 1,4; 2; 4; 6 g), en la superficie plantar de la extremidad durante 1 s. Se evaluó la reacción del animal mediante la

retirada de la extremidad y se registró el filamento aplicado con su respectiva fuerza de presión. Desde el momento que el animal percibe la presión del filamento, retirando la extremidad, se repite por 5 veces consecutivas con un intervalo de 3 s entre cada aplicación. Según la capacidad del ratón en percibir y reaccionar ante las distintas presiones se obtiene una puntuación (Dixon 1980, Vera et al. 2007, Huang et al. 2017).

4.3.2 Test de sensibilidad al calor

La sensibilidad al calor fue determinada mediante la aplicación de calor infrarrojo en una de las extremidades posteriores. Los ratones fueron posicionados dentro de una caja de vidrio (23x18x14 cm) sobre un piso de vidrio. Un haz infrarrojo (longitud de onda 50 nm) fue aplicado en la planta de una extremidad posterior a una temperatura de 46 °C. El tiempo de retirada de la extremidad fue medido automáticamente por el equipo. Se realizaron 3 medidas por ratón con 40 min de descanso entre cada medición, calculando el tiempo de latencia promedio. Para evitar lesión, se estableció un tiempo de corte automático de 21 s (Huang et al. 2017).

4.3.3 Test de sensibilidad al frío

Para medir sensibilidad al frío se utilizó el test de la gota de acetona (Kontinen and Dickenson 2000). Brevemente, los animales fueron localizados en cajas de

vidrio (23x18x14 cm) sobre una rendija de 0,8 cm de tamaño del tamiz. Posterior a la aclimatación de los animales, estos fueron expuestos al estímulo frío mediante la aplicación en la superficie plantar de una gota de acetona, suministrada a través de una jeringa de 1 mL.

Se cuantificó el tiempo que el animal emplea agitando, lamiendo o retirando la extremidad durante un tiempo de 2 min. Se realizó este ensayo 3 veces por animal para la obtención de un valor de tiempo promedio (Calvo et al. 2010, Huang et al. 2017).

4.3.4 Test de remoción del adhesivo

Se utilizó el test de remoción de adhesivo para evaluar respuestas sensoriomotoras. Los ratones fueron removidos cuidadosamente de sus cajas y se les aplicó, uno por uno, un adhesivo cuadrado de 1x1cm sobre el espacio entre el hocico y la nariz. Luego, los ratones fueron posicionados en nuevas cajas y se midió el tiempo que demoró cada ratón en retirar el adhesivo, con un tiempo máximo de 120 s. El Test se realizó 3 veces por animal para el cálculo del tiempo promedio. Si el animal toca el adhesivo pero es incapaz de removerlo indica una alteración motora, mientras que un retraso en percibir el adhesivo tocándolo indica una alteración en el sistema sensorial (Fleming et al. 2013, Richter et al. 2017).

4.4 Análisis de fuerza muscular

Los animales fueron aclimatados en una de las salas de procedimientos durante 20 min previos a la realización de cada test, según lo descrito en la sección 2.1.

4.4.1 Test de grilla invertida

El test de grilla invertida mide la fuerza muscular de las cuatro extremidades del ratón. Para ello, se generó un marco cuadrado de 43 cm de longitud de cada lado, el cual sostiene un tamiz de 12 mm formado por alambres de 1 mm de grosor. Los animales fueron posicionados sobre el centro de la rendija y esta fue rotada (180° en el eje horizontal) hasta llegar a la posición inversa, a una distancia de 50 cm del suelo que posee un colchón para amortiguar la posible caída del animal. Se cuantifica el tiempo en el cual el ratón se desprende de la rendija, con un máximo de duración del test de 120 s. Luego de obtenido el tiempo se le asigna un puntaje de acuerdo a los siguientes parámetros: 1 punto: si el animal cae entre 1-10 s, 2 puntos: si cae entre 11-25 s, 3 puntos: 26-60 s, 4 puntos: 61-90 s y si cae después de 90 s o no cae se le asigna el puntaje máximo de 5. La medición fue realizada 3 veces por cada ratón separadas por 30 min (Deacon 2013b).

4.4.2 Test de pesos

El test de cadenas con diferentes pesos mide la fuerza de las extremidades anteriores de los ratones con pesos iguales o superiores a 15,1 g. Dicha prueba utiliza distintas cadenas de distinto largo unidas en un extremo a una malla de acero. El diferente número de eslabones de la cadena proporcionó los distintos pesos: 15,5; 23,1; 30,8; 39,4; 46,4; 54,1 g. Los animales fueron desafiados a sostener los diferentes pesos con sus extremidades anteriores mientras que eran suspendidos en el aire desde la cola. Se les asignó un puntaje según el tiempo que fueron capaces de sostener dichos pesos, siendo el tiempo máximo de mantención de las cadenas de 3 s. El puntaje final fue obtenido mediante una relación entre los pesos que fue capaz de sostener el animal y el tiempo que soportó dichos pesos, normalizado con su respectivo peso corporal (Deacon 2013b, Morales et al. 2015, Abrigo et al. 2016).

4.5 Registros electrofisiológicos de contracción muscular

4.5.1 Electromiografía

Ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron anestesiados por vía inhalatoria con Isoflurano 2 % (v/v) en oxígeno, controlando las condiciones de temperatura y respiración de los animales. Posteriormente, fueron dispuestos en posición decúbito prono y se realizó una incisión quirúrgica en la extremidad

posterior de los ratones para dejar expuesto el músculo gastrocnemio. A continuación, el nervio ciático fue expuesto y montado sobre un electrodo monopolar para su estimulación (Square Wave Electric Stimulator, Phipps and Bird 7092-611). El extremo proximal del segmento expuesto del nervio ciático fue estrangulado por amarre para inhibir estímulos centrales. El tendón distal del músculo fue disecado libre y suturado a un transductor de fuerza isométrica conectado a un sistema de adquisición de datos (PowerLab 4/25, ADInstruments). La tensión y longitud del músculo fueron ajustadas a la repuesta máxima de contracción. La declinación de la fuerza de contracción producida por la estimulación del nervio a diferentes frecuencias (100, 50 y 10 Hz), conjuntamente con el tiempo de contracción muscular, relajación y de latencia (s), fueron registrados mediante estimulación del nervio. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el software Chart V. Electrophysiology (**Figura 3**) (Genç et al. 2016).

4.5.2 Propiedades contráctiles

Los ratones fueron anestesiados con isofluorano en concentraciones saturantes y luego sacrificados mediante dislocación cervical. El músculo tibial anterior (TA) fue amarrado desde el tendón y desde la rodilla, separados de los otros músculos presentes en la extremidad. Una vez disecado, el músculo fue posicionado en un baño Pexiglas con solución Krebs oxigenada a 37°C, y uno de los extremos unidos a un transductor de fuerza MLT, mientras que el otro extremo es unido a

un soporte con la solución antes mencionada para lograr la tensión del músculo. Posteriormente se determinó la longitud óptima de estimulación (longitud a la cual se obtenga la mayor respuesta a 1 Hz), una vez determinado este parámetro, se dieron pulsos entre 1-200Hz dando la máxima fuerza de contracción isométrica mediante el registro por Power lab instrument 4/35. Los pulsos fueron aplicados cada 2 minutos entre cada estímulo. Una vez terminada la aplicación de los pulsos, se midió la longitud del músculo. Posteriormente, el músculo fue disecado

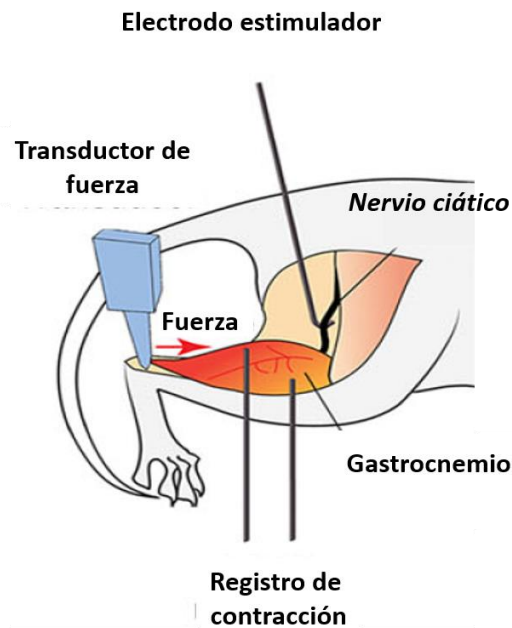


Figura 3: Esquema electromiografía. Representación esquemática de registro electrofisiológico *in vivo* de músculo gastrocnemio mediante estimulación del nervio ciático. Fuente: Modificado de Genc, Jara et al. 2016.

desde el ratón y pesado. La fuerza neta específica fue determinada mediante la relación entre la fuerza neta isométrica (mN/mm²) dividida por el área total de la

sección transversal del músculo (Morales et al. 2011, Morales et al. 2013, Márquez-Miranda et al. 2017).

4.6 Análisis histológico

4.6.1 Obtención de muestras

Los ratones de edad 2-4 meses fueron sacrificados por sobredosis de anestesia inhalatoria con isoflurano en concentraciones saturantes. Posteriormente, el músculo tibial anterior fue disecado, embebido en OCT y congelado en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Se realizaron criosecciones transversales del músculo de 20 μm de espesor, las que fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

4.6.2 Tinción histoquímica para revelar la actividad NADH-Tiorreductasa (NADH-TR)

Con el fin de determinar el tipo de fibra que componen el músculo TA de ratones *p75*^{-/-} y control, criosecciones del músculo fueron incubadas durante 45 min en solución NADH-NBT (Tampón Tris 1X pH 7.4; NADH reducido; NBT, nitro-blue tetrazolium. Posteriormente, los cortes fueron lavados con agua destilada 3 veces durante 5 min cada vez. Luego, fueron incubados en acetona durante 2 min cada vez en el siguiente orden de concentraciones: acetona 30- 60- 90- 60- 30 % (v/v) a temperatura ambiente. Finalmente, las criosecciones fueron lavadas con agua

destilada 3 veces durante 5 min cada vez y montadas en solución VectaMount. Se observa en color azul oscuro las fibras de contracción lenta, en celeste las fibras intermedias, mientras que las fibras de contracción rápida presentan una coloración clara (Woehlbier et al. 2016a).

4.6.2.1. Cuantificación de área en sección transversal

Se adquirieron imágenes en campo claro con microscopio de epifluorescencia, utilizando un lente objetivo 20X. Se obtuvieron imágenes de la totalidad de una criosección por animal teñida mediante NADH-TR. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas y el músculo reconstruido en su totalidad utilizando el programa PowerPoint. El músculo tibial anterior presenta una distribución del tipo de fibras que lo componen, en donde las fibras de contracción lenta se localizan en el centro del músculo mientras que las fibras de contracción rápida se localizan hacia los bordes. Para detectar posibles transiciones del tipo de fibra, se definió un ROI rectangular en el centro de la criosección de manera de abarcar la zona de transición entre fibras lentas hacia rápidas. El mismo ROI se utilizó en todos los cortes analizados. Utilizando el comando *freehand selection* en el programa ImageJ, fueron circunscritos los contornos de las fibras musculares y se determinó el área de sección transversal (CSA) usando el mismo programa. Se cuantificaron como mínimo 100 fibras de contracción lenta y 100 fibras de contracción rápida por cada animal (Woehlbier et al. 2016a).

4.6.2.2. Cuantificación tipo de fibra muscular

Las reconstrucciones de los cortes transversales del músculo TA teñidos con NADH-TR fueron procesadas utilizando el Software ImageJ. Las imágenes con el ROI previamente establecido (sección 4.6.1.1), fueron cuantificadas utilizando el plug-in *Multi-point*. Se determinó la totalidad de fibras musculares de contracción lenta (azul oscuro), intermedias (celestes) y de contracción rápida (coloración clara) que se encuentran en el interior del ROI. Los resultados fueron expresados como porcentaje de fibras totales (Woehlbier et al. 2016a). Se cuantificaron como mínimo 250 fibras por cada animal.

4.6.3 Tinción Hematoxilina-Cromotropo

Las criosecciones de cortes transversales de músculo TA fueron hidratadas mediante la incubación con alcohol en concentraciones decrecientes (100 %, 96°I%, 96°II%, 70°, 50%) durante 3 min cada una. Posteriormente, fueron lavadas con agua destilada durante 3 min e incubadas con Hematoxilina de Harris durante 2 min. A continuación, los cortes fueron lavados con agua corriente durante 6 min, deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol (50°, 70°, 80%) durante 2 min cada una e incubados en Cromotropo durante 15 s. Posteriormente, las muestras fueron nuevamente deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol (96°% I-IV, 100°% I-II) y aclaradas con

histoclear (I-IV) durante un tiempo de 3 min por vez. Finalmente, las muestras fueron montadas con medio de montaje histológico Entellan (Woehlbier et al. 2016a).

4.6.4 Tinción WGA-DAPI

Las criosecciones fueron fijadas con etanol 100% frío durante 10 min y lavadas con PBS 1X 3 veces durante 5 min por vez. Luego, para observar membranas celulares, las muestras fueron incubadas con aglutinina del germen de trigo (WGA) acoplada al fluoróforo Alexa-488 a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS 1X durante 10 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron nuevamente lavadas e incubadas con DAPI en PBS 1X a una concentración final de 0,3 μM durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron montadas en solución VectaMount. Se observó teñido en color verde las membranas de las fibras musculares y en color azul los núcleos celulares (Woehlbier et al. 2016a).

4.6.5 Tinción Rojo Sirio

Las criosecciones trasversales de músculo TA fueron hidratadas y teñidas con Hematoxilina de Weigert durante 8 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados con agua corriente durante 10 min y teñidos con solución Picro-Sirius Red 80 a una concentración de 1 % (p/v) en solución acuosa saturada de ácido pícrico 15

% (p/v) durante 1 h. Los cortes fueron lavados 2 veces en agua acidificada (Ácido Acético Glacial 0,5 % (v/v) en agua destilada) y luego fue removido el exceso de agua mecánicamente. Las criosecciones fueron deshidratadas mediante 3 baños de etanol 100 % (v/v), aclaradas mediante el uso de histoclear (I-IV) y finalmente montadas con medio de montaje histológico Entellan (Merck).

4.7 Western Blot

Se extrajeron proteínas totales desde músculos Gastrocnemio de ratones *p75*^{-/-} y control. Las proteínas fueron extraídas en una solución Tris-base 50 mM pH 7,4, Tritón X-100 0,5 %, NaCl 0,15 M que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas (IP) 1X (104 mM AEBSF; 80 µM Aprotinina; 2 mM Leupeptina; 4 mM Bestatina; 1,5 mM Pepstatina A; 1,4 mM E-64) (Sigma). Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferidas a una membrana de polifluoruro de venilideno (PDVF). Luego se detectó la presencia de la proteína de interés mediante la utilización de anticuerpo anti-cadena pesada de la miosina (MHC) (1:1000) (MF-20) y anti-Troponina C (1:1000) (**Tabla 1**). Las inmunorreacciones fueron analizadas mediante ensayos de quimioluminiscencia (Thermo FisherScientific, Waltham, MA, USA). Las imágenes fueron adquiridas utilizando Fotodyne FOTO/Analyst Luminary Workstations Systems (Fotodyne, Inc., Walnut Ridge, WI, USA) (Márquez-Miranda et al. 2017).

4.8 Inmunohistoquímica

4.8.1 Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia inhalatoria de isoflurano en concentraciones saturantes. Posteriormente, se disecó el músculo diafragma y/o el músculo Levator Auris Longus (LAL) en solución fisiológica externa (135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 12 mM de NaHCO₃, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 12 mM de glucosa).

4.8.2 Inmunohistoquímica de músculo diafragma

Con el fin de analizar las UNMs de ratones *p75*^{-/-} y control, luego de la disección, el músculo diafragma fue fijado con Paraformaldehído (PFA) 4 % (p/v) disuelto en PBS 1X, durante 1 h a 4 °C. Luego, el músculo fue lavado 3 veces durante 10 min con PBS 1X/Tween20 0,1 % (v/v) a temperatura ambiente. Posteriormente, los músculos fueron incubados con glicina 0,15 M en PBS 1X durante 15 min y luego lavados durante 10 min en PBS 1X e incubados con NABH₄ 10 mg/ml en agua destilada durante 5 min a temperatura ambiente. Los músculos fueron lavados durante 2 h con PBS 1X y luego incubados en solución de bloqueo (Tris-PO₄/BSA 1 %) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron teñidas durante 2 h con α -bungarotoxina (α BTX) Alexa-488 (1:500) (**Tabla 1**) para marcar el aparato postsináptico. Finalmente, los diafragmas fueron

lavados 6 veces con PBS 1X/ Tween 20 0,1 % (v/v) durante 5 min por vez a temperatura ambiente y se montaron entre 2 cubreobjetos en medio de montaje para fluorescencia y adhiriendo los cubreobjetos en sus bordes con cianoacrilato.

4.8.3 Inmunohistoquímica de músculo Levator Auris Longus (LAL)

Para determinar si la inervación del axón motor y aposición de las células de Schwann se encuentran alteradas en las UNMs de los ratones *p75^{-/-}* y sus pares control, posterior a la disección los músculos, éstos 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 0,1 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 marcan el axón motor y el terminal axónico, respectivamente, además del anticuerpo S100 (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 (**Tabla 2**) en PBST-BSA 4 % (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Luego, se agregó α BTX Alexa-488 (1:500) y DAPI (1:1000) junto con los anticuerpos secundarios contra la IgG de ratón unido a fluoróforo Cy3 y contra la IgG de conejo unido al fluoróforo Cy5. 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 Cultivo primario de células musculares

Ratones p75^{-/-} y sus pares control de 2-4 meses de edad fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia inhalatoria isoflurano en concentraciones saturantes.

4.9.1 Extracción de fibras musculares y obtención de células satélite

El músculo gastrocnemio de cada extremidad posterior fue disecado e incubado en colagenasa tipo I a una concentración de 2 mg/ml en DMEM/ penicilina y

estreptomycin 100 µg/mL durante 3 h a 37 °C en incubadora. Terminado el tiempo, ambos músculos fueron trasladados a una placa de cultivo p100 cebada con BSA 5 % (p/v) e incubados durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, los músculos fueron disgregados mecánicamente bajo lupa con una micropipeta p1000 previamente cebada en BSA 5 % (p/v). A continuación, las fibras musculares fueron seleccionadas mediante la extracción de estas con pipeta Pasteur y sembradas en placas de 6 pocillos tratadas previamente con BSA 5 % (p/v). Luego, se realizó una segunda selección con pipeta Pasteur. Esta vez, las fibras musculares fueron traspasadas a una placa de 6 pocillos previamente tratada con matrigel. Las fibras musculares fueron incubadas a 37 °C en incubadora termorregulada a una temperatura de 37 °C y 5 % de CO₂ durante 4 días. Durante este tiempo, las fibras musculares liberan las células satélite que luego se adhieren en el fondo del pocillo tratado con matrigel (Ionescu et al. 2016).

4.9.2 Expansión y selección de células satélite

La expansión de las células satélite y la eliminación de fibroblastos se realizaron mediante la tripsinización de las células en 3 días consecutivos en cámara de cultivo de flujo laminar tipo II. Para ello, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X estéril, se agregó 1,5 mL de tripsina C y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 4 mL de medio BIOAMF-2 suplementado

con Penicilina 100 µg/mL y Estreptomicina 100 U/mL (P/E) 1 % (v/v). Las células fueron lavadas 2 veces (con 4 mL de medio por vez) con BIOAMF-2 P/E 1 % (v/v) y depositadas en placa de cultivo celular p100. Las células fueron incubadas durante 1 h a 37 °C para adherir los fibroblastos a la placa. Transcurrido este tiempo, se extrajo el sobrenadante que contiene las células satélites y se depositaron en una placa de cultivo celular p100 previamente tratada con matrigel e incubadas con medio de cultivo BIOAMF-2 P/E 1 % (v/v) por 24 h. Este proceso se repitió los siguientes dos días consecutivos expandiendo las células a un mayor número de placas de cultivo y removiendo los fibroblastos. En el caso de que las células alcanzaran un 70 % de confluencia o más, estas se dividieron en la tripsinización siguiente en 2 placas p100 (Ionescu et al. 2016).

4.9.3 Preparación de placas para la obtención de estructuras de agregados del AChR aneurales *in vitro*.

Se prepararon placas de cultivo celular de 24 pocillos. Para ello, cubreobjetos de 12 mm fueron esterilizados con fuego dentro de una cámara de flujo laminar y posicionados dentro de cada pocillo de la placa. Posteriormente, se agregó una solución de Poliornitina 5 µg/ml en H₂O destilada estéril y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente dentro de la cámara de flujo laminar. Transcurrido este tiempo, la solución fue retirada de cada pocillo y se adicionó laminina 10 µg/mL en medio L-15 (suplementado con NaHCO₃ 0,2 % (p/v) durante 1 h a 37 °C (Kummer et al. 2004).

4.9.4 Obtención de estructuras similares a pretzels a partir de cultivos primarios

La morfología celular y confluencia fueron observadas mediante un microscopio invertido, mientras que el recuento celular se realizó mediante el uso una cámara de Neubauer. Previo a la siembra de células musculares, se eliminó todo el medio con laminina y luego se sembraron 150.000 células por pocillo en un volumen final de 400 μ L de medio BIOAMF-2 P/E 1 % (v/v). Al día siguiente, se gatilló la diferenciación a miotubos. Para ello, se lavaron las células 3 veces con PBS 1X y se agregó medio de diferenciación (Medio de cultivo DMEM 1X suplementado con Glutamax 100 1 % (v/v); P/E 1 % (v/v), Suero Bovino Fetal 10 % (v/v), Suero equino 10 % (v/v)). Los cultivos fueron mantenidos hasta 5-7 días *in vitro* en incubadora termorregulada a 37 °C y 5 % de CO₂.

4.9.5 Tinción de estructuras aneurales similares a pretzels e inmunocitoquímica

Luego de 5-7 días de diferenciación de miotubos, se agregó α BTX Alexa-488 (1:500) en medio de cultivo fresco y se incubó durante 45 min a 37 °C. Posteriormente, las células fueron fijadas con PFA 2 % (p/v) durante 20 min a 4 °C. Luego fueron lavadas y fijadas nuevamente con Metanol 100 % (Merck) durante 5 min a -20 °C. Para la realización de inmunocitoquímica, luego de la

fijación, los miotubos fueron lavados con Tampón Tris-fosfato (TrisPO₄) 1X y posteriormente fueron permeabilizados con TrisPO₄/Tritón X-100 0,1 % (v/v) durante 10 min. Los miotubos fueron incubados con anticuerpo primario α -tubulina (1:1000) disuelto en TrisPO₄/BSA 1 % (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las células fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario dirigido contra la IgG de ratón unido al fluoróforo Cy3 (**Tabla 2**) conjuntamente con Faloidina (1:200), DAPI (1:1000) y α BTX Alexa-488 (1:500) durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, los miotubos obtenidos a partir de cultivos primarios provenientes desde ratones *p75*^{-/-} y sus pares control fueron lavados y montados con medio de montaje para fluorescencia (DAKO).

4.10 Análisis de imágenes

4.10.1 Adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas utilizando los microscopios confocal Zeiss LSM 700 y confocal espectral Zeiss LSM 780 (CMA Biobío, Universidad de Concepción). Los objetivos de 40X (Plan-Apochromat 40x/1,3 Oil DIC M27) y 63X (Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil DIC M27) fueron utilizados para la visualización de los aparatos postsinápticos y los tres componentes de la UNM.

Para el análisis del aparato postsináptico, las imágenes fueron adquiridas utilizando la opción de corrección de brillo "*Auto x Brightness correction*" del

programa ImageJ, ajustando la ganancia de intensidad de fluorescencia en los planos z más profundos, sin variar la potencia del láser.

Para la reconstrucción del músculo LAL, se utilizó un microscopio de epifluorescencia equipado con una cámara monocromática de alta resolución (objetivo 10X; 0,45 NA; Nikon Eclipse 80i). Aproximadamente 50 imágenes fueron adquiridas por cada hemi LAL y se ensamblaron para realizar la reconstrucción del músculo mediante la utilización del programa ImageJ y el *plug-in* MosaicJ.

Las Imágenes obtenidas mediante microscopía de super-resolución SR-SIM (*Three Dimensional Structured Illumination Microscopy*) fueron adquiridas mediante un escaneo láser utilizando el sistema confocal ELYRA S.1 (SIM-SR) (Zeiss), sobre un microscopio invertido estativo motorizado (Axio Observer.Z1 HR) equipado con 2 lentes objetivos; EC Plan-Neofluar 10x/0,30 (AN) M27, WD= 5,2 mm y un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63x/1,40 (AN) DIC M27, WD=0,19 mm. Se utilizaron 5 rotaciones de rejillas obteniendo imágenes de un tamaño de 1004 x 1002 píxeles con una profundidad de 16 bits. Las imágenes fueron procesadas en el programa ZEN 2011 V 7.0.7 Black Edition mediante el módulo de iluminación estructurada. Asociado a la obtención de imagen de este equipo se encuentra una estación de trabajo Z800. Adicional a los dos lentes objetivos antes mencionados, el sistema proporciona un tercer aumento de 1,6X obteniendo una imagen con un aumento total de 1008X.

Las imágenes obtenidas a partir de tinciones histológicas fueron adquiridas en un fotomicroscopio Zeiss HBO 50/Ac equipado con cámara de video. Las imágenes de los músculos analizados fueron capturadas en campo claro con un lente objetivo de 20X.

4.10.2 Análisis de la unión neuromuscular

Para analizar la progresión de la maduración del aparato postsináptico de la UNM, se identificaron los aparatos postsinápticos mediante la detección de los agregados de AChRs teñidos con α BTX Alexa-488 y se clasificaron según lo descrito por Bolliger y cols. (Bolliger et al. 2010), en base a su morfología y estadio del desarrollo de los animales analizados (2-4 meses de edad). La clasificación utilizada fue la siguiente; Forma de O: placa ovalada con una o más perforaciones en su interior, *Forma de C: pretzels* inmaduros que tienen sólo una abertura en la periferia de la placa inicial, PM: *pretzels* maduros que son altamente complejos y ramificados, y poseen gran parte de su interior con baja densidad del AChR, PF: *pretzels* fragmentados, los que se forman debido al desensamble de AChRs en segmentos de los *pretzels* y poseen al menos 5 fragmentos, *Desmantelados: Pretzels* sin estructuras definidas (**Figura 4**) (Bolliger et al. 2010, Woehlbier et al. 2016b). En el caso de análisis morfológicos de estructuras similares a *pretzels* en miotubos de cultivo primario muscular, a la clasificación morfológica antes mencionada se agregó la clasificación de Placa:

receptores de acetilcolina distribuidos homogéneamente en una estructura ovalada sin perforaciones en su interior (**Figura 5**) (Woehlbier et al. 2016b).

Con el fin de resolver las estructuras postsinápticas con detalle, las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal fueron reconstruidas en tres dimensiones utilizando el programa ImageJ de tal forma de poder rotar las proyecciones obtenidas para su cuantificación. Al menos 130 *pretzels* fueron cuantificados por animal en músculo diafragma, siendo 8 animales *p75*^{-/-} y 8 animales control. Los resultados fueron expresados en porcentaje en función de la razón del número de *pretzels* observados para cada categoría, en relación al número total de aparatos postsinápticos analizados.

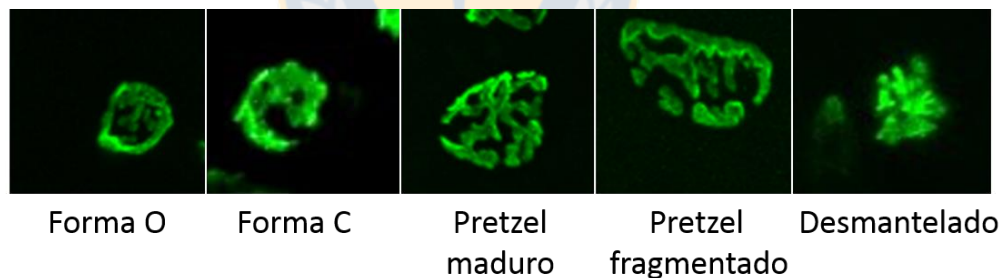


Figura 4: Estructura morfológica del aparato postsináptico en la UNM. Según su morfología fueron clasificados en; Forma-O: con una o más perforaciones en el interior, Forma-C: con una apertura, PM: pretzel maduros, PF: pretzel fraccionados. Fuente: Elaboración propia.

4.10.3 Análisis de área y perímetro del aparato postsináptico

Los cambios de tamaño en el aparato postsináptico fueron cuantificados utilizando el programa ImageJ. Para ello, se adquirieron imágenes de microscopía confocal mediante un lente objetivo de 40 X, siendo procesadas como proyecciones de máxima intensidad (MIPs) digitalizadas. El mismo ROI fue utilizado para todos los aparatos postsinápticos. Utilizando la función “*fit spline*”, el pretzel fue seleccionado para posteriormente ajustar el umbral de acuerdo a los pixeles fluorescentes que lo componen. A continuación, utilizando el programa ImageJ, se seleccionaron los parámetros a medir incluyendo el área y el perímetro (Bolte and Cordelieres 2006b, Messeant et al. 2015).

4.10.4 Análisis de volumen y superficie del aparato postsináptico

Tanto el volumen como la superficie de los aparatos postsinápticos fueron cuantificados utilizando el *plug-in 3D object counter* del programa ImageJ (Bolte and Cordelieres 2006a, Messéant et al. 2015), ajustando el umbral de fluorescencia. Aproximadamente 50-100 aparatos postsinápticos fueron cuantificados en músculo diafragma por animal.

4.10.5 Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales de imágenes de planos z utilizando el programa ImageJ y se contabilizó el número de fragmentos que conforman cada *pretzel*, discontinuos de agregados del AChR. El número de fragmentos por *pretzel* fue determinado en forma manual considerando la cantidad de disgregaciones de cada unidad postsináptica teñida con α BTX, cuantificando entre 130–200 aparatos postsinápticos por animal (Jones et al. 2016).

4.10.6 Cuantificación de la aposición pre y post sináptica de la UNM

Con el fin de determinar si la inervación y aposición del axón motor con los aparatos postsinápticos de la UNM, los músculos LAL fueron teñidos para evidenciar los componentes pre y post sináptico de la UNM según lo descrito en la sección 4.8.3, y las imágenes fueron capturadas como se indica en la sección 4.10.1 con un lente objetivo de 63X. Utilizando el programa ImageJ, cada canal adquirido fue digitalizado como una proyección de máxima intensidad MIPs y luego se superpusieron los canales. Las áreas pre y postsinápticas, así como la aposición (razón entre las áreas de ambos componentes), fueron clasificadas según lo descrito previamente por Carrasco 2016 (Carrasco et al. 2016, Jones et al. 2016).

4.10.7 Cuantificaciones en cultivos primarios

Se obtuvieron imágenes mediante microscopía de epifluorescencia utilizando un lente objetivo 40X. La cuantificación de morfología de las estructuras conformadas por agregados aneurales de AChR, similares a pretzels, cuya morfologías van desde placas hasta pretzels, fueron cuantificadas mediante la utilización del programa ImageJ como se describe en la sección 4.10.2 (Kummer et al. 2004, Woehlbier et al. 2016b). La cuantificación de área y perímetro de dichas estructuras fue realizado como se describe en la sección 4.10.3. La cuantificación de parámetros de miogénesis, como número de pretzels por área de miotubo y área de miotubo por campo, fueron analizadas mediante la determinación del número de estructuras similares a pretzels presentes por área de miotubo, así como el área total de miotubo presente por campo de imagen analizada. Ambas cuantificaciones fueron realizadas mediante la utilización del programa ImageJ.

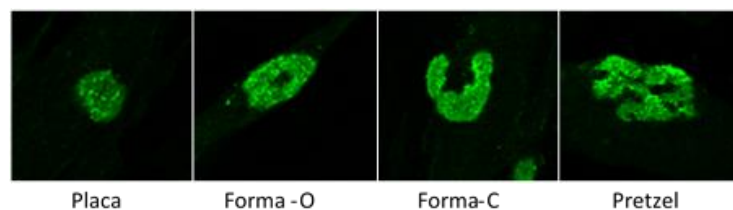


Figura 5: Clasificación morfológica de estructuras de agregados del AChR similares a pretzels. Las estructuras complejas del AChR presentes en cultivos primarios de células musculares se clasificaron según su morfología en; Placa: Estructura ovalada de distribución homogénea de los receptores de acetilcolina; Forma-O: posee una o más perforaciones en el interior, Forma-C con una apertura, PM: pretzel maduros. Fuente: Elaboración propia.

4.11 Microscopía electrónica de Transmisión (MET)

El músculo diafragma fue disecado desde ratones control y ratones *p75*^{-/-} de edad 2-4 meses. Luego de la disección, los aparatos postsinápticos fueron teñidos con α BTX alexa-488 (1:500) en PBS 1X durante 20 min y se procedió la disección de una región del músculo de 1 x 1 mm enriquecida en UNMs utilizando un estereomicroscopio AxioZoom.V16. Posteriormente, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído 2,5 % (v/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7.4, luego incubados con Tetróxido de Osmio 1 % durante 2 h y deshidratados con etanol. Las muestras fueron embebidas en EPON y se obtuvieron secciones ultrafinas (70 nm) para el análisis de microscopía. Las secciones ultrafinas fueron contrastadas con acetato de uracilo y citrato y posteriormente visualizadas en un microscopio Electrónico de Transmisión PHILIPS TECNAI 12 BIOTWIN localizado en la Pontificia Universidad Católica de Chile en su Unidad de Microscopia Avanzada (UMA) (Court et al. 2011). Las imágenes fueron adquiridas con las siguientes magnitudes; 6000X con HFW 15.1 μ m, 16500X con HFW 5.8 μ m, 26500X con HFW 3.6 μ m y 43000X con HFW 2.2 μ m.

4.11.1 Cuantificación de parámetros neuromusculares en imágenes de MET

Los análisis neuromusculares de las imágenes adquiridas mediante MET fueron realizados según lo descrito previamente por Poort y colaboradores (Poort et al.

2016). Brevemente, se cuantificó como parámetros presinápticos el número de zonas activas, definido como regiones electrodensas sobre un pliegue secundario de la UNM, mientras que un pliegue secundario corresponde a las invaginaciones del músculo en la región de contacto con el axón motor (Poort et al. 2016). Adicionalmente, se cuantificaron el número de vesículas por área de terminal, diámetro de vesículas y zonas activas sin vesículas realizando *docking*. Estas últimas corresponden a vesículas que poseen fusionada su membrana con la membrana presináptica del terminal nervioso (Poort et al. 2016). Adicionalmente, fue cuantificada la fracción de vesículas listas para ser liberadas (*readily releasable pool*; RRP), el cual fue medido como el número de vesículas contenidas en una región de 480 nm de un pliegue secundario en una zona activa (Poort et al. 2016).

Los parámetros postsinápticos medidos fueron los siguientes; perímetro de aparato postsináptico expresado en relación al largo de aposición entre el músculo y el axón motor, número, profundidad y ancho de los pliegues secundarios, así como el ancho del pliegue primario definido como el espacio sináptico. Todas las mediciones fueron realizadas utilizando el *software* ImageJ (Poort et al. 2016).

4.12 Tratamientos farmacológicos

Con el fin de determinar si un aumento en la disponibilidad del neurotransmisor pueda mejorar el comportamiento motor y fuerza muscular de ratones *p75^{-/-}*,

ratones control y *p75*^{-/-} de 2-4 meses de edad fueron tratados con piridostigmina 1-3 $\mu\text{mol/kg}$ (Lintern et al. 1997, Amos and Smith 1998), un inhibidor de la acetilcolinesterasa. El fármaco Bromuro de Piridostigmina fue disuelto 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 170 μL . El tratamiento fue aplicado a los animales diariamente durante 5 a 11 días, según los requerimientos del experimento. Como control fue utilizado suero fisiológico. Una hora posterior a la administración del fármaco, los animales fueron sometidos a análisis de fuerza (test de pesos) y equilibrio (Rotarod) según lo descrito previamente en la sección 4.4.

4.13 Análisis de Nervio Ciático

4.13.1 Obtención de la muestra

Ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron sacrificados por sobredosis de anestesia inhalatoria de isoflurano en concentraciones saturantes. Se disecó una sección del nervio ciático de 1 cm de largo localizado previo a la ramificación y posterior inervación del músculo gastrocnemio. La sección del nervio fue fijada en PFA 4 % (p/v) disuelto en PBS 1X durante 24 h a 4 °C y posteriormente incubada en una solución de sacarosa 30 % (p/v) en PBS 1X durante 48 h a 4 °C. A continuación, los nervios fueron incluidos en OCT para la realización de

tacos. Se realizaron criosecciones de 12 μm de espesor y fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para los análisis de MET, las muestras fueron obtenidas y tratadas como se describe en la sección 4.11.

4.13.2 Inmunohistoquímica de nervio Ciático

Con el propósito de determinar el número de axones que componen el nervio ciático y presencia de mielina, las criosecciones fueron lavadas con PBS 1X 3 veces durante 5 min. Luego se permeabilizaron (Suero equino 5 % (v/v), BSA 1 mg/mL en PBS 1X- Tritón X-100 0.1 % (v/v)) durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo primario, utilizando los anticuerpos MBP (Boehringer Mannheim) (1:400) y neurofilamento (Santa Cruz) conjuntamente con 2H3 (DSHB) (1:1000) en solución de boqueo (Suero equino 5 % (v/v), BSA 1 mg/mL en PBS 1X) durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, las criosecciones fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios dirigidos contra la IgG de ratón unido al fluoróforo Cy2 y contra la IgG de conejo unido al fluoróforo Cy3 durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, los cortes fueron lavados y montados con cubreobjeto 24 x 50 mm en medio de montaje para fluorescencia DAKO.

4.13.3 Tinción Kluver-Barrera en nervio Ciático

Con el fin de analizar la mielina que rodea a los axones del nervio ciático, se realizó esta tinción histológica mediante la deshidratación de los cortes mediante incubación con etanol 96 % (v/v) durante 15 s. Posteriormente, las criosecciones fueron incubadas en solución Azul Luxol Fast 0,1 % (p/v) en etanol 95 % (v/v), ácido acético glacial 0.05 % (v/v)) en incubadora termorregulada a 60 °C durante 18 h. Se extrajo el exceso de colorante embebiendo los cortes en etanol 96 % (v/v) durante 1 s, 5 veces. La tinción fue diferenciada sumergiendo los cortes en solución de carbonato de litio 0.05 % (p/v) en agua destilada 7 veces durante 1 s por vez. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en etanol 70 % (v/v) 2 veces durante 1 s por vez. Finalmente, las criosecciones fueron lavadas con agua destilada y montadas en medio de montaje histológico Entellan.

4.13.4 Cuantificación de imágenes obtenidas en MET

Para determinar si la mielinización de los axones se encuentra alterada en los ratones *p75^{-/-}*, cortes transversales del nervio ciático fueron analizados. Se determinó el g-ratio como indicador de mielinización, índice que se obtiene mediante la relación entre el diámetro axonal interno y el diámetro exterior total que incluye la mielina (Chomiak and Hu 2009). Adicionalmente, fue determinada el área de sección transversal de los axones mielínicos mediante el uso del diámetro axonal interno antes medido. Fueron cuantificados entre 60 a 100

axones mielínicos presentes en el nervio ciático de cada animal control y *p75*^{-/-}. Las cuantificaciones fueron realizadas mediante la utilización del programa ImageJ.

4.14 Análisis estadístico

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 5.0 y Microsoft Excel 2013. Todos los datos son presentados como valor de la media \pm SEM. Las comparaciones estadísticas entre los ratones *p75*^{-/-} y control que consideran una variable fueron realizados usando el *test-t de Student* de datos no pareados, o mediante Anova seguido por el post-test Bonferroni, según se indique en la figura. Para los análisis estadísticos en los cuales fueron consideradas diversas variables, se utilizó el test 2 way-ANOVA, seguido por el post-test de multicomparación Bonferroni. Fueron considerados estadísticamente significativos para un intervalo de confianza del 95 %, diferencias con un valor *p* bajo 0.05. A los valores $p < 0.05$; $p < 0.01$ y $p < 0.001$ se les asignó significancias estadísticas crecientes (*; ** y *** respectivamente). La nomenclatura utilizada en las figuras describe como *n* al número de aparatos postsinápticos, UNMs y fibras musculares registradas y *N* como el número de animales por cada condición.

5. RESULTADOS

Para determinar si el receptor de neurotrofinas p75 tiene una función en la mantención y estructura de los AChR de la unión neuromuscular en adultos, se caracterizó el ratón *p75*^{-/-} a nivel motor, muscular y neuromuscular. El ratón nulo para p75 utilizado carece del *exón III* que codifica para repeticiones ricas en cisteínas (CDR)s del dominio extracelular del receptor, las cuales son requeridas para la unión del ligando a p75 (Lee et al. 1992).

5.1 El receptor p75 es requerido para la coordinación motora

En una primera aproximación, se analizaron parámetros de comportamiento previamente asociados con deficiencias neuromusculares en otros animales. De esta manera, los animales fueron analizados mediante el test de estiramiento de extremidades posteriores (“splay reflex”). En dicha prueba, los ratones *p75*^{-/-} no pueden extender sus extremidades posteriores al ser sostenidos de la cola en comparación a los ratones control, indicando posibles alteraciones motoras y sensoriales (**Figura 6A**). A continuación, se observó que los ratones *p75*^{-/-} presentan dificultad al caminar, parámetro que fue analizado y cuantificado mediante el análisis de huella (“footprint”) (**Figura 6B**). Los resultados indican que los animales *p75*^{-/-} presentan una marcha irregular y descoordinada en relación a los animales control. Los ratones *p75*^{-/-} presentan una mayor distancia entre las pisadas delanteras y traseras con valores de $8,06 \pm 0,68$ mm en

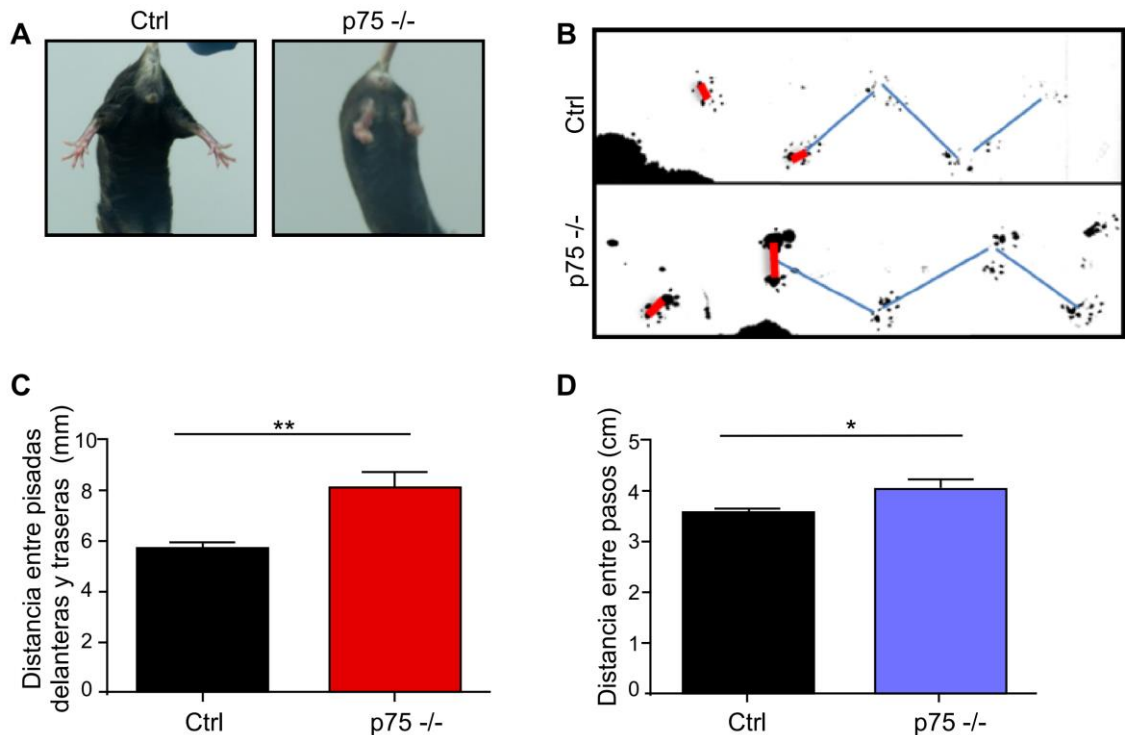


Figura 6: La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la marcha.

Ratones p75^{-/-} y sus pares control de 2-4 meses de edad fueron analizados. **(A)** Evaluación del estiramiento de extremidades posteriores, donde se observaron deficiencias en los ratones p75^{-/-}, los que no son capaces de extender sus extremidades. **(B)** Los ratones fueron analizados según su patrón de marcha mediante el ensayo de huella. Se cuantificaron distintos parámetros en las huellas que los ratones dejan al caminar mediante el uso de tinta china en la planta de las extremidades y el registro sobre papel filtro. **(C)** Se cuantificó la distancia entre las pisadas delanteras y traseras (línea roja) y **(D)** la distancia entre pasos (líneas azules) de ratones p75^{-/-} y control. Los resultados representan el promedio ± SEM de Control N: 8; p75^{-/-} N: 8. *p<0,5; **p<0,1, test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

comparación a los animales control, de $5,65 \pm 0,29$ mm. Adicionalmente, los animales *p75*^{-/-} presentan una mayor distancia entre los pasos, con valores de $3,99 \pm 0,22$ cm en relación a los animales control que mostraron una distancia promedio de $3,57 \pm 0,07$ cm (**Figura 6C-D**). Los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} presentan un patrón de marcha alterado al caminar.

Para descartar que esta alteración se deba a un desperfecto anatómico, los ratones fueron analizados por imagenología mediante la obtención de radiografías de rayos X para poder evaluar la curvatura de la columna vertebral. Dicha curvatura es cuantificada mediante el cálculo del índice cifótico (KI), siendo el valor de este índice inversamente proporcional al grado de curvatura espinal (**Figura 7A-B**). El examen fue realizado bajo condición de sujeción de las extremidades para evaluar la curvatura espinal con los animales con sus extremidades estiradas, y en una condición sin sujeción, donde la obtención de la radiografía se realiza con los animales en estado de reposo. Los resultados indican que no existe diferencia en el índice de cifosis entre ambos genotipos en el análisis con sujeción de sus extremidades, en donde los ratones *p75*^{-/-} obtuvieron un valor de KI de $7,35 \pm 2,31$ en comparación con los animales control donde el KI fue de $7,78 \pm 0,79$ (**Figura 7C**). Tampoco se obtuvieron diferencias en una condición de reposo sin sujeción (**Figura 7D**). Los resultados indican que la carencia del receptor de neurotrofinas *p75* no produce alteraciones anatómicas en la curvatura espinal.

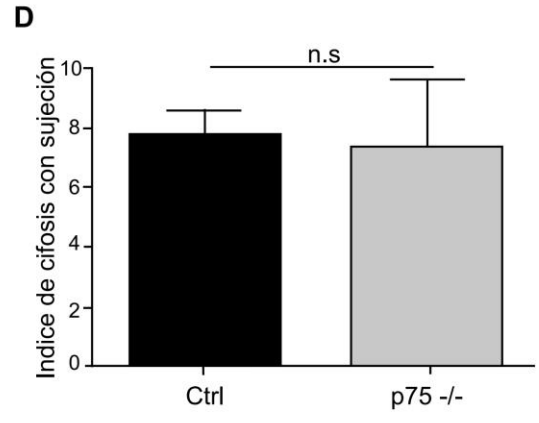
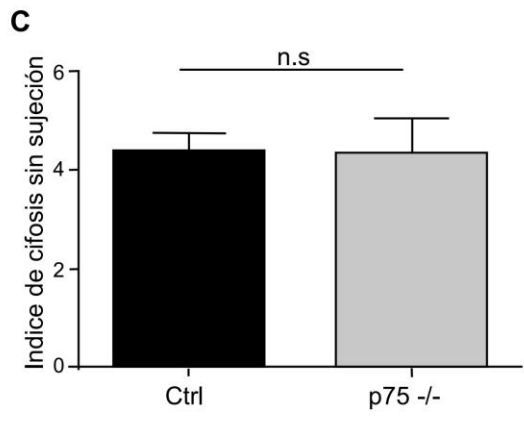
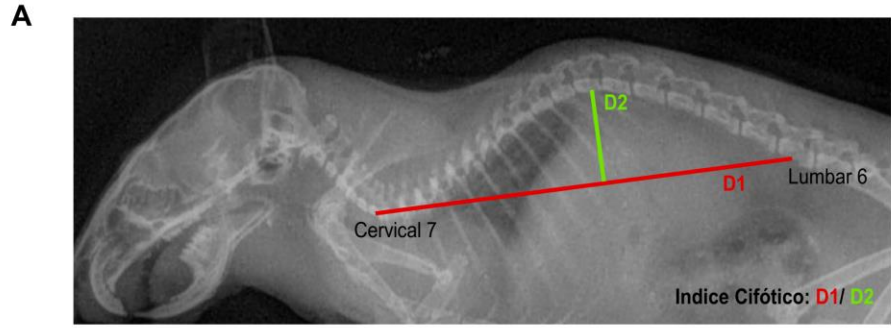


Figura 7: La ausencia del receptor p75 no produce defectos en la curvatura de la columna vertebral. Ratones *p75*^{-/-} y control fueron analizados por imagenología de rayos X para determinar su índice cifótico. **(A)** Cálculo de índice cifótico para la determinación de curvatura de la columna vertebral, siendo la medida de este índice inversamente proporcional al grado de curvatura. Se calculó midiendo la relación entre dos distancias D1/D2, en donde D1: distancia entre la vértebra cervical 7 (C7) hacia la vértebra lumbar 6 (L6) y D2: distancia perpendicular desde D1 hacia el punto de máxima curvatura de la columna. **(B)** Radiografía representativa de columna vertebral de ratones *p75*^{-/-} y control **(C)** Cuantificación del índice cifótico con sujeción. Los animales fueron estirados desde sus extremidades posteriores y anteriores para la obtención de la radiografía. **(D)** Cuantificación del índice cifótico sin sujeción. El análisis se realizó con los animales reposando en posición cúbito prono. Los resultados representan el promedio \pm SEM de Control N: 4; *p75*^{-/-} N: 3. n.s= diferencias no significativas, $p > 0,5$, test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

Considerando que los resultados no indican alteraciones anatómicas en la columna vertebral de los ratones *p75*^{-/-}, a continuación se analizó si los defectos en la marcha de estos animales podrían relacionarse a una alteración en su coordinación motora. Para ello, se realizaron cuatro test motores y de coordinación evaluando el desempeño de los ratones *p75*^{-/-} en comparación sus pares control (**Figura 8**). En primera instancia, se realizó el test Rotarod con aceleración durante dos días consecutivos. Este test mide la coordinación motora y el equilibrio de los animales sobre un cilindro en aceleración. Se observó que los ratones *p75*^{-/-} poseen menor tiempo de latencia sobre el equipo en ambos días de prueba en comparación con los animales control (**Figura 8A**). De igual manera, en el test de barras estáticas, el cual mide coordinación motora y motivación de los animales por llegar al extremo de las barras, se observó que los ratones *p75*^{-/-} poseen un menor tiempo de latencia en la barra de menor diámetro en comparación con los animales control. Por lo tanto, los ratones nulos para *p75* caen antes de llegar al extremo de la barra de menor diámetro (**Figura 8B**). En concordancia con las alteraciones motoras encontradas en los ratones carentes de *p75* en los ensayos anteriores, en el test de barras horizontales triples, el cual mide coordinación motora y fuerza, el desempeño de los ratones *p75*^{-/-} fue menor en comparación a los animales control. De esta manera, los ratones mutantes caen o llegan al extremo de la barra en un tiempo mayor y por ende, obtuvieron puntajes de menor valor en comparación a los

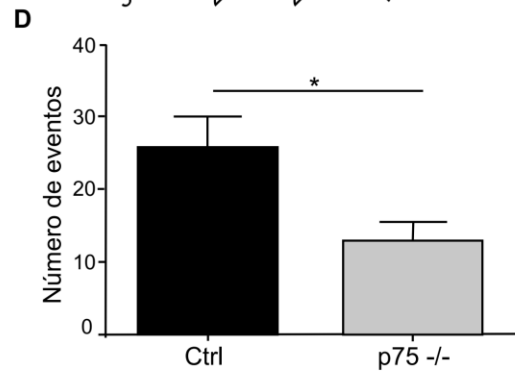
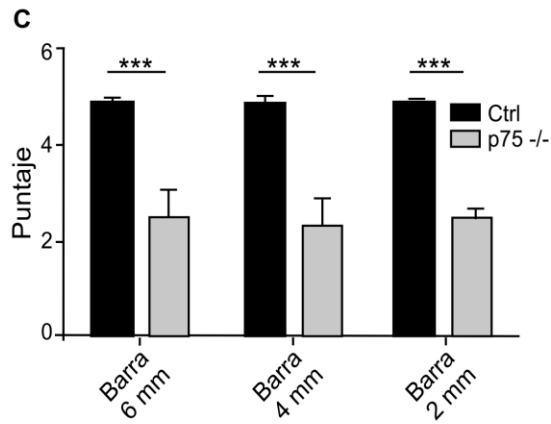
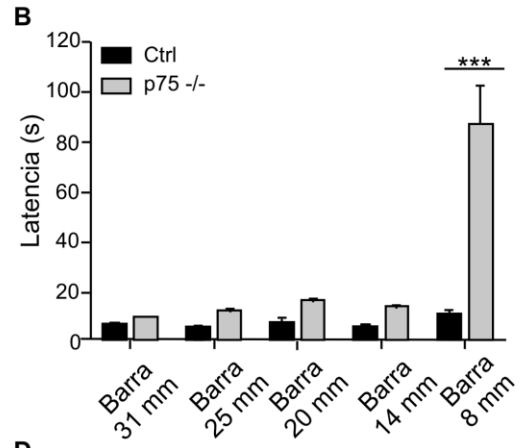
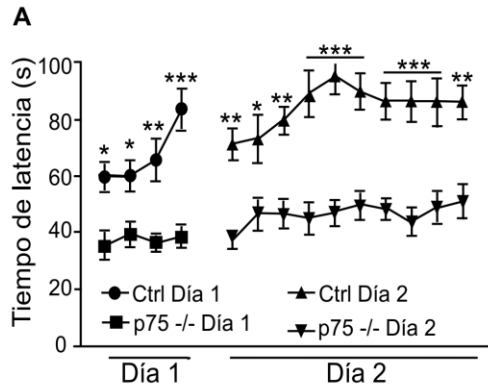


Figura 8: p75 es requerido para la coordinación motriz

Se evaluó la coordinación motora de ratones control y *p75*^{-/-} de 2-4 meses de edad mediante el uso de cuatro pruebas. **(A)** En el primer test, se utilizó un equipo rotarod con aceleración de 4 a 40 rpm en 120 segundos. Se midió el tiempo de latencia sobre el equipo en dos días consecutivos. **(B)** En la segunda prueba, de barras estáticas, los animales fueron desafiados a caminar sobre barras estáticas de distintos diámetros (31 a 8 mm), midiendo el tiempo de latencia que el ratón demora hasta llegar al extremo de cada barra. **(C)** En el test de barras horizontales triples, los ratones fueron posicionados en el medio de cada barra de mayor a menor tamaño y se determinó el tiempo que cada animal demoró en llegar a un extremo de la barra, asignándose un puntaje según su rendimiento. **(D)** Finalmente, en el test de actividad espontánea en el cilindro, los ratones fueron posicionados en el centro de un cilindro de vidrio de 15 cm de diámetro y se cuantificó en número de veces que treparon por las paredes del vidrio con sus extremidades delanteras durante 3 minutos. El número de veces fue definido como “número de eventos”. Los resultados para cada test se representan como el promedio \pm SEM de N: 8 ratones control y N: 8 ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), en A-C 2-way ANOVA de dos colas, en D test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

ratones control (**Figura 8C**). El último test realizado para el análisis de coordinación motora fue el de actividad espontánea dentro del cilindro, ensayo que mide la función sensoriomotora. Los ratones *p75*^{-/-} muestran una menor actividad en la prueba, cuantificada como número de eventos, definido como el número de veces que los ratones posicionan ambas extremidades anteriores sobre las paredes del cilindro. En dicho ensayo, los ratones *p75*^{-/-} obtuvieron $12,63 \pm 2,95$ eventos en comparación a los animales control que posicionan ambas extremidades anteriores $25,50 \pm 4,58$ veces sobre el cilindro (**Figura 8D**). Por lo tanto, los resultados obtenidos en todos los ensayos motores sugieren que la ausencia del receptor *p75* produce un fenotipo de descoordinación motora.

5.2 La ausencia del receptor *p75* genera menor fuerza de contracción y debilidad muscular

A continuación, se evaluó si las alteraciones de coordinación motora encontradas en animales nulos para *p75* podrían relacionarse a alteraciones en la fuerza muscular. Para comenzar a analizar este punto, se realizaron dos ensayos de medición de fuerza muscular (**Figura 9**). El primer test realizado fue el de grilla invertida que mide la fuerza muscular de las cuatro extremidades, en donde los animales son desafiados a sostener su propio peso. Los resultados muestran que no existe diferencia en la capacidad de los ratones *p75*^{-/-} de sostener pesos cercanos al peso corporal respecto al desempeño obtenido por sus pares control (**Figura 9A**). Se realizó un segundo análisis mediante el test de pesos de

cadena, que mide la fuerza muscular de las extremidades anteriores, en donde los animales son desafiados a sostener pesos crecientes desde 15,5 g hasta 54,1 g. Los ratones *p75*^{-/-} ejercen el $34,37 \pm 6,32$ % de su máxima capacidad de fuerza muscular según el peso de cada animal, mientras que los ratones control realizan un $89,55 \pm 4,63$ % de su máxima capacidad de fuerza muscular. **(Figura 9B)**. Estos resultados indican que los ratones nulos para *p75* presentan debilidad muscular.

Para determinar si la debilidad muscular observada en ratones *p75*^{-/-} se debe a alteraciones propias del músculo generadas por la ausencia del receptor, se realizaron ensayos de contracción muscular. Para ello, el músculo tibial anterior fue estimulado directamente con diferentes frecuencias y se registró la fuerza de contracción isométrica mediante un transductor de fuerza.

Los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} poseen una menor fuerza neta muscular en comparación a los animales control en los rangos de frecuencias de estimulación del músculo analizadas **(Figura 10A)**. Concordantemente, los ratones *p75*^{-/-} registraron un valor de máxima fuerza de contracción isométrica de $65,38 \pm 7,255$ % en comparación con los ratones control, cuya fuerza de contracción fue de $100,0 \pm 11,35$ % **(Figura 10B)**.

Por lo tanto, los resultados indican que la ausencia del receptor de neurotrofinas *p75* produce debilidad muscular y además, dicha debilidad es asociada a alteraciones propias en el músculo, resultando en una disminución de la fuerza de contracción isométrica en los mutantes.

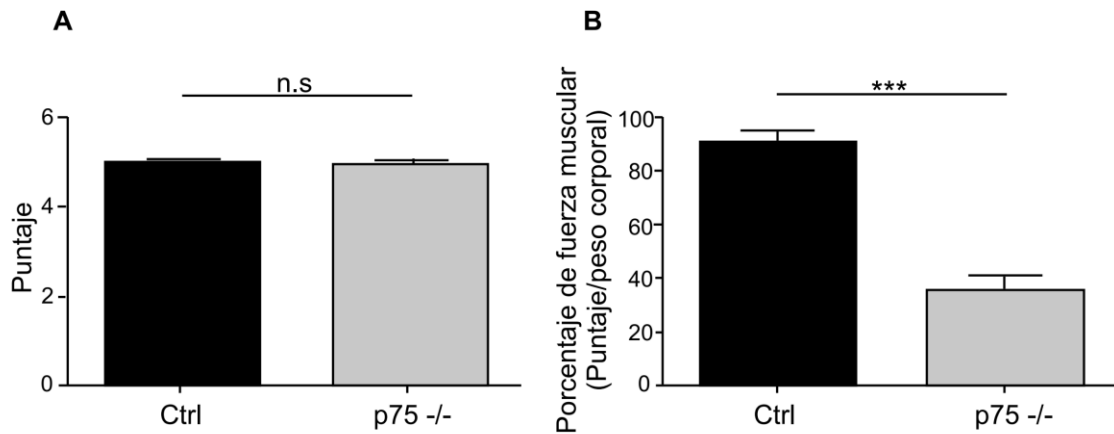


Figura 9: La ausencia del receptor de neurotrofinas p75 produce debilidad muscular

Ratones *p75^{-/-}* y control de 2-4 meses de edad fueron analizados por test de fuerza muscular. **(A)** En el test de grilla invertida, los animales fueron posicionados sobre una grilla, la cual fue rotada en 180° para evaluar si los animales son capaces de sostenerse en un tiempo máximo de 2 minutos. Según el tiempo que es capaz de sostenerse se les asigna un puntaje. **(B)** En el test de pesos, los animales fueron desafiados a sostener 6 cadenas de diferentes números de eslabones. Dichas cadenas tienen un peso que va desde 15.5 g hasta 54.1 g. Los resultados fueron expresados según la fuerza máxima que es capaz de soportar cada animal en relación a su peso corporal. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 9 animales control y N: 8 animales *p75^{-/-}* (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

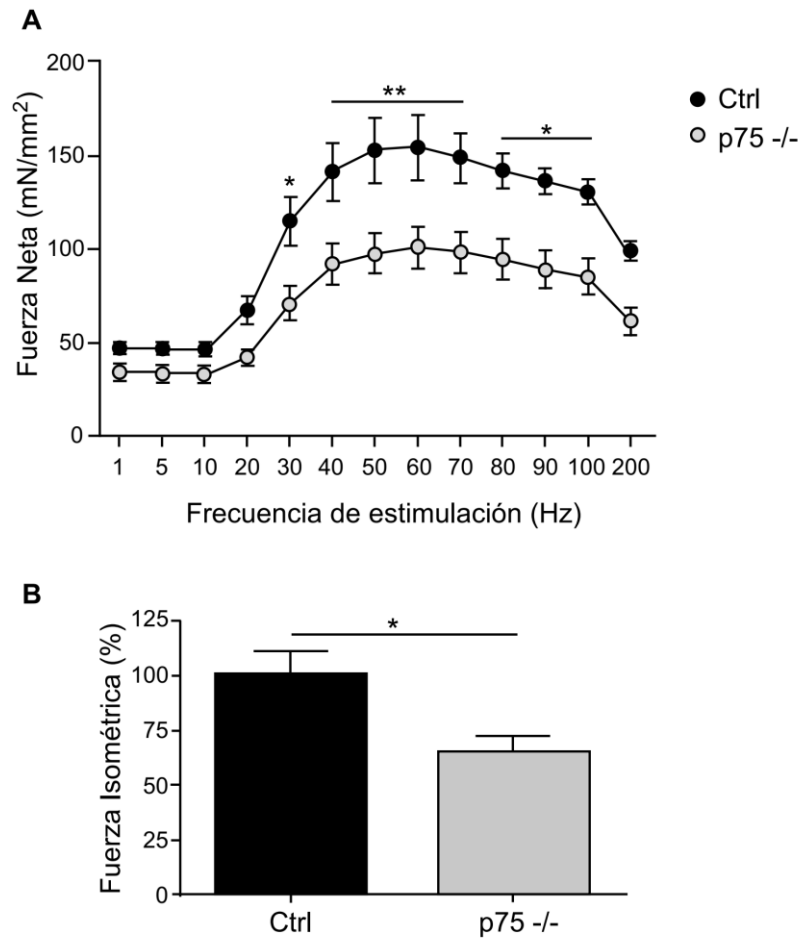


Figura 10: El receptor p75 es requerido para la fuerza de contracción muscular

Los músculos Tibial anterior (TA) de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron disecados para análisis de contracción muscular. **(A)** Curva de fuerza de contracción isométrica según frecuencia de estimulación (Hz) en músculo tibial anterior. **(B)** Máxima fuerza de contracción isométrica (mN/mm²) expresada en porcentaje. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 músculos control y N: 6 músculos de ratones *p75*^{-/-} (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$, en A: 2- way ANOVA de dos colas, en B: test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

5.3 La ausencia del receptor p75 produce disminución en el área de sección transversal muscular.

En consideración a los resultados previamente obtenidos, los ratones *p75*^{-/-} poseen alteraciones musculares que afectan la contracción y contribuyen a la debilidad muscular observada en estos animales. Por esta razón, para poder detectar alteraciones musculares, primeramente se analizó su composición mediante el estudio de la expresión de proteínas estructurales, así también como a través de análisis histológicos de ratones *p75*^{-/-} y sus pares control. Para ello, criosecciones de músculo Tibial anterior fueron analizadas mediante tinción Hematoxilina/Cromotropeo, donde, aparte de presentar fibras de menor diámetro (ver más adelante), no se observaron diferencias histológicas significativas entre los músculos de ambos fenotipos en lo que respecta a infiltración de células mono-nucleadas (indicador de daño muscular) y distancia entre las fibras musculares (indicador de fibrosis) (**Figura 11A**). Para evaluar si existe un posible aumento en regeneración muscular a causa de daño muscular en los ratones *p75*^{-/-}, se realizó una tinción con WGA/DAPI para analizar la presencia de núcleos centrales en las fibras musculares como marcador de regeneración (**Figura 11B**). La cuantificación de núcleos centrales en fibras musculares no se encuentra alterada en los ratones *p75*^{-/-} en relación a los animales control, indicando que no existe un aumento en la regeneración muscular en estos animales mutantes (**Figura 11D**). Para determinar la presencia de fibrosis, se utilizó la tinción rojo sirio, que evidencia la presencia de colágeno en el músculo.

Los resultados indican que no existen diferencias en este parámetro analizado entre los músculos de ratones *p75*^{-/-} y control (**Figura 11C**).

Al no observar diferencias en los parámetros histológicos analizados, se determinó si la expresión de proteínas estructurales del músculo como MHC II y Troponina C se encuentra alterada en estos mutantes. El análisis mediante inmunodetección por Western Blot no mostró diferencias en la expresión de las proteínas en extractos de músculos Tibial anterior entre ambos genotipos (**Figura 11E**).

Por lo tanto, a pesar de encontrar falencias a nivel de fuerza y contracción muscular en los ratones *p75*^{-/-}, el músculo de los animales no se encuentra alterado en lo que respecta a nivel de proteínas estructurales, regeneración o fibrosis muscular.

Un parámetro cuya alteración podría explicar la disminución en fuerza de contracción isométrica es el peso y tamaño del músculo. Sin embargo, no se observaron diferencias en el análisis de estas características en el músculo Tibial anterior proveniente desde ratones *p75*^{-/-} y control (**Tabla 3**). Otros parámetros que pueden influir en una disminución en la fuerza de contracción isométrica son el tipo de fibra muscular y el área de sección transversal de las fibras. Por ello, se evaluó el tipo de fibras que componen el músculo tibial anterior de ratones *p75*^{-/-} y sus pares control. Las fibras musculares se clasifican en fibras de contracción rápida,

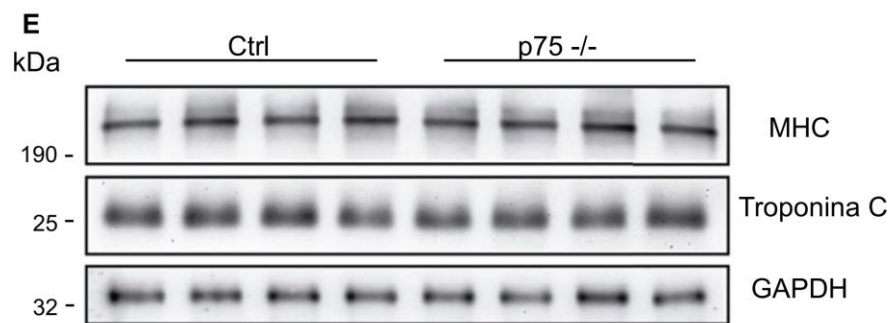
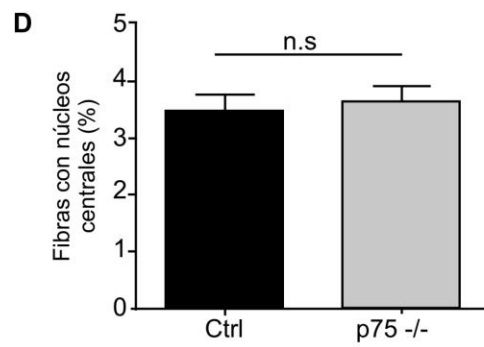
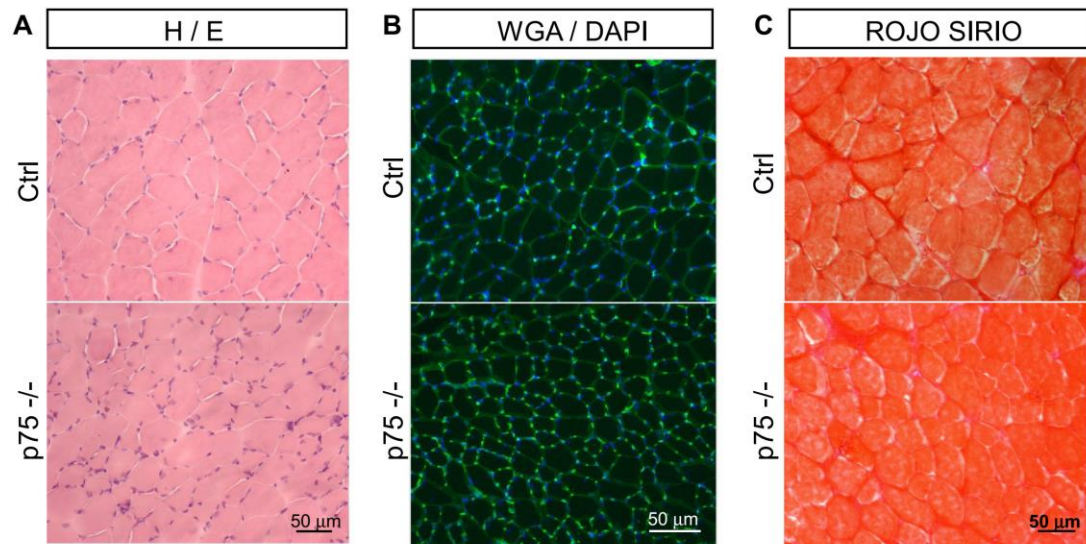


Figura 11: La ausencia del receptor p75 no produce defectos en regeneración, fibrosis o infiltración del tejido muscular

Criosecciones transversales de músculo Tibial anterior de ratones *p75*^{-/-} y sus pares control fueron evaluados mediante análisis histológico. **(A)** Tinción Hematoxilina / Cromotrope para determinar parámetros como distancias entre las fibras musculares y/o fibrosis. **(B)** Tinción de cortes con WGA para observar la membrana de las fibras musculares y tinción con DAPI para observar núcleos. La aparición de núcleos centrales en las criosecciones es un indicador de regeneración de fibras musculares. **(C)** Tinción histológica con Rojo Sirio para marcar colágeno como indicador de fibrosis en los tejidos musculares. **(D)** Cuantificación de número de núcleos centrales en criosecciones musculares. **(E)** Inmunodetección por Western Blot de músculo gastrocnemio para determinar la expresión de proteínas estructurales como MHC y Troponina C. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 8 músculos control y N: 8 músculos de animales *p75*^{-/-} (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$, test-t no pareado. En E cada carril contiene las muestras de un animal de cada genotipo (N: 4 control y N: 4 músculos de *p75*^{-/-}). Barra= 50 μ m. Fuente: Elaboración propia.

intermedias y lentas según sea su fuerza de contracción, resistencia a la fatiga y vía de obtención de ATP (Ashmore and Doerr 1971, Morgan and Proske 1984). Mediante la tinción de la actividad de la enzima NADH-Tiorreductasa (NADH-TR) es posible distinguir en color azul oscuro las fibras de contracción lenta, en celeste las fibras intermedias y en coloración clara las fibras de contracción rápida (Woehlbier et al. 2016b) **(Figura 12A)**. Los resultados indican que no existe diferencia en el tipo de fibras que componen los músculos de ratones *p75*^{-/-} en relación a los músculos de animales control **(Figura 12B)**.

A continuación, se cuantificó el área de sección transversal (CSA) de cortes transversales de músculo tibial anterior **(Figura 12C-D)**. Los datos fueron expresados en un histograma de distribución de abundancia del CSA. En relación a las fibras de contracción lenta, los ratones *p75*^{-/-} presentan el mayor porcentaje de CSA en el intervalo ente 700-1000 μm^2 (38,40 %), mientras que los animales control poseen 9,55 % de áreas dentro de dicho rango. A su vez, los animales control presentan una distribución mayoritaria de CSA de fibras lentas entre los rangos 2101-1500 y 1501-1800 μm^2 **(Figura 12C)**. Concordantemente, al analizar el CSA de fibras rápidas, los resultados indican que los músculos de los ratones *p75*^{-/-} son de menor tamaño, encontrando el mayor porcentaje de fibras (62,21 %) en el intervalo de 2000-2500 μm^2 en comparación con los animales control que poseen en este intervalo un 8,42 % de las áreas cuantificadas **(Figura 12D)**. De la misma manera, los ratones control poseen una distribución mayoritaria (32,01% y 35,72%) de CSA de fibras rápidas entre los rangos 2501-

3000 y 3001-3500 μm^2 , mientras que los ratones *p75*^{-/-} presentan sólo un 8,42% de las fibras en el último intervalo mencionado (**Figura 12D**). Por lo tanto, los resultados muestran que los ratones *p75*^{-/-} presentan un menor tamaño de fibras musculares tanto de tipo rápidas como lentas.

Para determinar si en edad avanzada las alteraciones en la contracción y debilidad muscular generan alteraciones en las fibras musculares, se realizaron similares estudios histológicos en músculos de ratones *p75*^{-/-} y sus pares control, ambos genotipos envejecidos (15-17 meses). Los resultados indican que no existen diferencias en el tipo de fibras musculares que componen el músculo tibial anterior, al igual que lo observado en ratones de edad 2-4 meses (**Figura 13A-B**). Tampoco fueron encontradas alteraciones histológicas en lo que respecta a infiltración de células mononucleadas y distancia entre las fibras musculares (**Figura 13C**), regeneración (**Figura 13D**) o fibrosis (**Figura 13E**). Por lo tanto, los trastornos en el comportamiento motor y contracción muscular de ratones *p75*^{-/-} no generan alteraciones musculares nuevas en animales envejecidos.

En su conjunto, los resultados sugieren que los ratones *p75*^{-/-} presentan menor CSA de las fibras musculares, lo cual podría contribuir a la debilidad muscular y disminución en la fuerza de contracción isométrica encontrada en estos animales.

Tibial anterior	Peso (g)	SEM	Análisis estadístico
Ctrl	0,0465	+/- 0,0015	n.s
KO p75	0,05917	+/- 0,0717	n.s
	Longitud (cm)	SEM	Análisis estadístico
Ctrl	1,319	+/- 0,0265	n.s
KO p75	1,1963	+/- 0,0717	n.s

Tabla 3: La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en peso y longitud de los músculos.

Los músculos Tibial anterior de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron disecados. Posteriormente, los músculos se pesaron y midieron en su longitud. Los resultados representan el promedio ± SEM de N: 4 músculos de ratones control y N: 6 músculos de ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

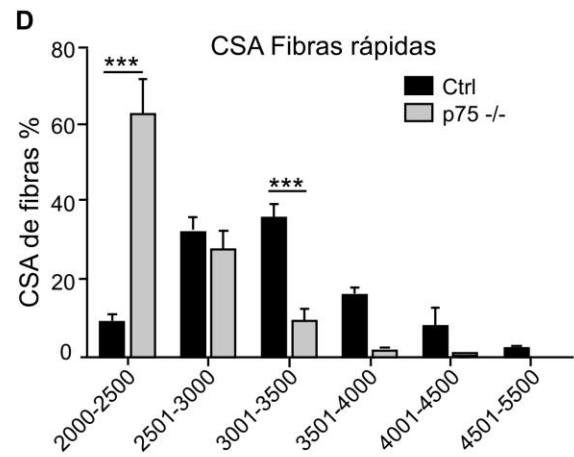
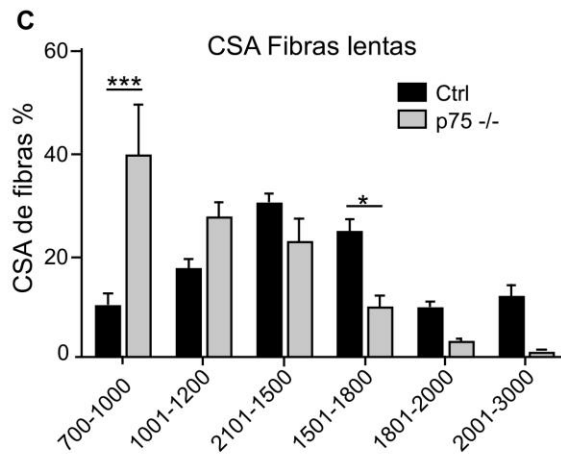
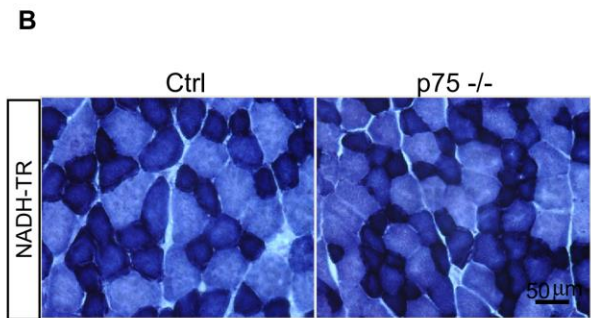
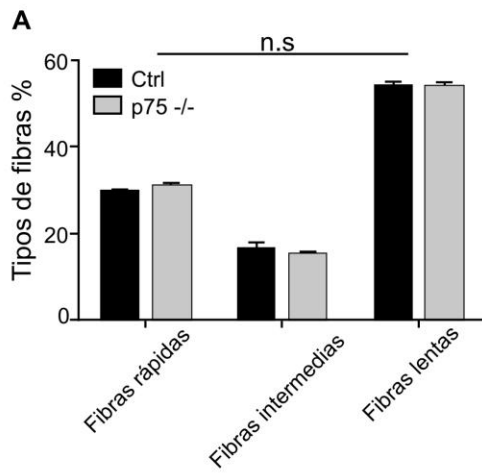


Figura 12: La ausencia del receptor p75 resulta en la disminución en el tamaño de las fibras musculares

Cortes transversales de músculo tibial anterior pertenecientes a ratones *p75*^{-/-} y sus pares control de edad 2-4 meses fueron teñidos mediante NADH-TR. Se observa en color azul oscuro las fibras de contracción lenta, en color celeste las fibras intermedias y en coloración clara las fibras de contracción rápida. **(A)** Cuantificación del tipo de fibras musculares presentes las criosecciones. Al menos 400 fibras fueron cuantificadas por músculo de cada animal, siendo los resultados expresados como porcentaje del total de las fibras cuantificadas presentes en una región de interés del músculo. **(B)** Imagen representativa obtenida luego de la tinción del músculo de ratones *p75*^{-/-} y control mediante la tinción NADH-TR. Barra = 50 μ m. **(C)** Cuantificación de área de sección transversal (CSA) de fibras de tipo lentas. **(D)** Cuantificación de CSA de fibras de tipo rápidas. En las cuantificaciones de CSA se consideraron al menos 100 fibras de cada tipo por animal, donde todos los análisis se realizaron mediante el uso del programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N:8 ratones control y N:8 ratones *p75*^{-/-} (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), 2-way ANOVA de dos colas. Fuente: Elaboración propia.

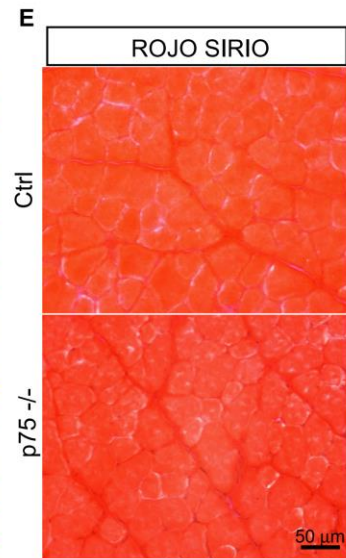
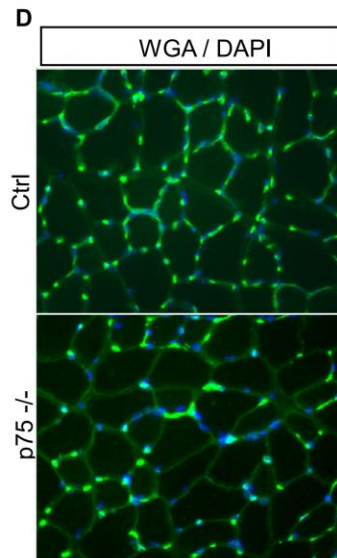
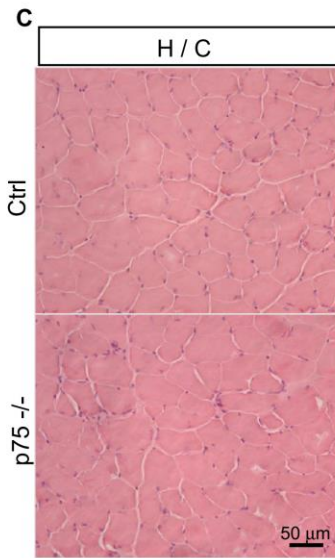
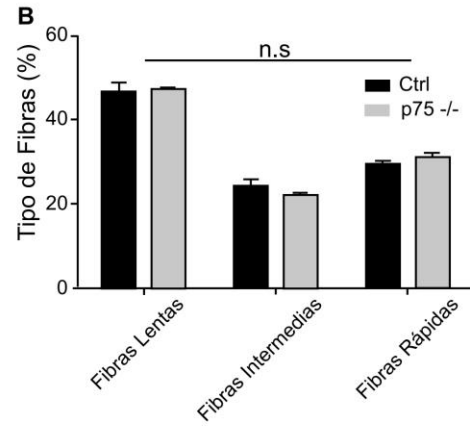
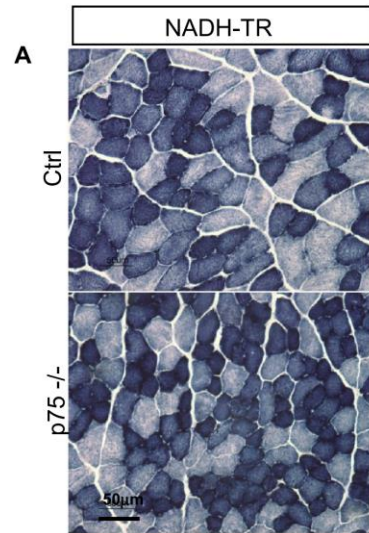


Figura 13: La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones histológicas musculares durante el envejecimiento.

Criosecciones transversales de músculo tibial anterior provenientes desde ratones *p75*^{-/-} y sus pares control de edades 15-17 meses fueron analizadas. **(A)** Tinción de actividad NADH-TR. Se observa en color azul oscuro las fibras de contracción lenta, en color celeste las fibras intermedias y en coloración clara las fibras de contracción rápida. **(B)** Cuantificación del tipo de fibra muscular presente en una región seleccionada del músculo Tibial anterior de los animales. Se utilizó el programa ImageJ para la cuantificación. **(C)** Tinción Hematoxilina / Cromotrofo de las criosecciones para determinar distancia entre fibras musculares y/o infiltración linfocitaria **(D)** Tinción de cortes marcados con WGA para observar la membrana de las fibras musculares y tinción con DAPI para observar núcleos. La aparición de núcleos centrales es utilizada como indicador de regeneración de las fibras musculares. **(E)** Tinción histológica Rojo Sirio para la detección de colágeno, siendo utilizado como marcador de fibrosis muscular. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-} (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$); 2-way ANOVA de dos colas. Barra= 50 μ m. Fuente: Elaboración propia.

5.4 La fusión de mioblastos en células musculares no se altera con la ausencia del receptor p75 de origen muscular.

¿Por qué las fibras musculares de ratones *p75*^{-/-} poseen menor CSA? Dado que se ha demostrado que p75 es requerido para la fusión de mioblastos en cultivo (Erck et al. 1998, Seidl et al. 1998), una posibilidad es que la miogénesis esté afectada en los ratones nulos para p75, alterando la fusión de los mioblastos para generar miotubos y con ello formando fibras musculares adultas de menor área. Para abordar esta posibilidad, se realizaron cultivos primarios de músculo gastrocnemio para la obtención de células satélites, que luego fueron diferenciadas hacia miotubos para el análisis de la formación del músculo (**Figura 14**). Los resultados muestran que no existe diferencias en la formación de los miotubos entre ratones *p75*^{-/-} y control, expresados como área de miotubos por campo de cultivo analizados (**Figura 14B**). Por lo tanto, la fusión de mioblastos para la formación de miotubos, no se encuentra alterada por la ausencia del receptor p75.

La coordinación motora depende del correcto funcionamiento del sistema nervioso, tanto en sus componentes sensoriales como motores. A este respecto, se ha descrito que la ausencia de p75 resulta en algunas alteraciones sensoriales (Lee et al. 1992, Lee et al. 1994a, Lee et al. 1994b), así como defectos en la neurotransmisión (Gonzalez et al. 2016) y en el proceso de eliminación de la poli-inervación de la UNM en el desarrollo post-natal temprano (Je et al. 2013).

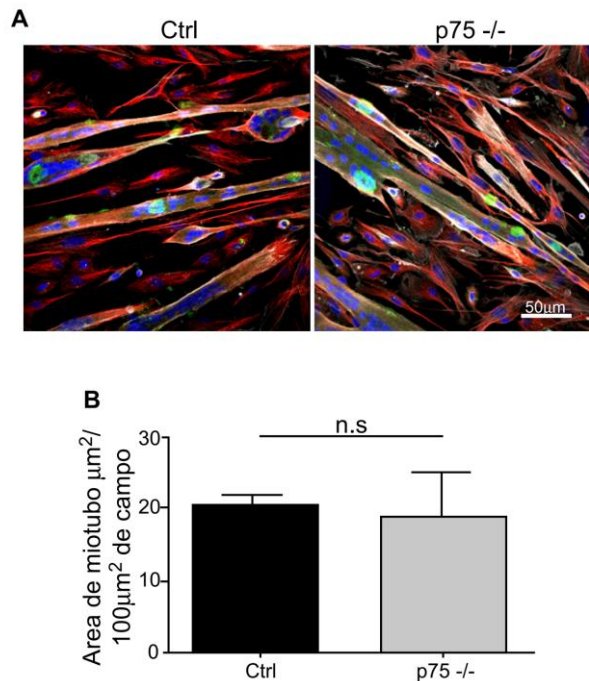


Figura 14: La ausencia del receptor p75 muscular no genera alteraciones en la formación de miotubos.

Se realizaron cultivos primarios de células satélites a partir de músculo gastrocnemio provenientes desde ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad. Las células satélites fueron diferenciadas a mioblastos y luego inducidas a fusionarse para la formación de miotubos. A partir del día en el cual se gatilló diferenciación a miotubos, los cultivos fueron mantenidos durante 5 días en cultivo. **(A)** Imagen representativa de miotubos obtenidos desde cultivo primario. Inmunocitoquímica de los miotubos, donde en color rojo se observa actina (faloidina), color blanco Tubulina (anticuerpo tubulina), verde AChR (α BTX) y en color azul los núcleos (DAPI). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barra= 50 μm . **(B)** Cuantificación de área de miotubos formados por campo de imagen analizada. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 ratones control y N: 4 ratones *p75*^{-/-}, siendo analizados 3 cultivos por cada animal. (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

Alteraciones en el Sistema Nervioso Central podrían contribuir a posibles deficiencias en la sinapsis muscular, las cuales más tarde podrían traducirse en los trastornos musculares observados en los animales nulos para p75. Para abordar esta idea, primeramente realizamos pruebas sensoriales a los ratones *p75*^{-/-} y sus pares control, con el fin de reproducir lo antes descrito para estos mutantes bajo nuestros parámetros experimentales e incrementando los análisis de los distintos sistemas sensoriales.

5.5 La ausencia de p75 produce alteraciones en la sensibilidad a la temperatura pero no en la sensibilidad mecánica.

En primer lugar, realizamos pruebas de sensibilidad mecánica (**Figura 15**). Se realizó el test Von Frey que consiste en presionar la planta de la extremidad posterior del animal con filamentos de distintos calibres, evaluando si el animal es capaz de percibir el estímulo. Los resultados muestran que no hubo diferencia en la respuestas entre los ratones *p75*^{-/-} y control (**Figura 15A**). Luego, se realizó el test de remoción del adhesivo, el cual mide respuestas sensorimotoras. De igual manera, no se encontraron diferencias entre ratones *p75*^{-/-} y control (**Figura 15B**). Por lo tanto, los resultados indican que la sensibilidad mecánica no se encuentra alterada en los ratones *p75*^{-/-}.

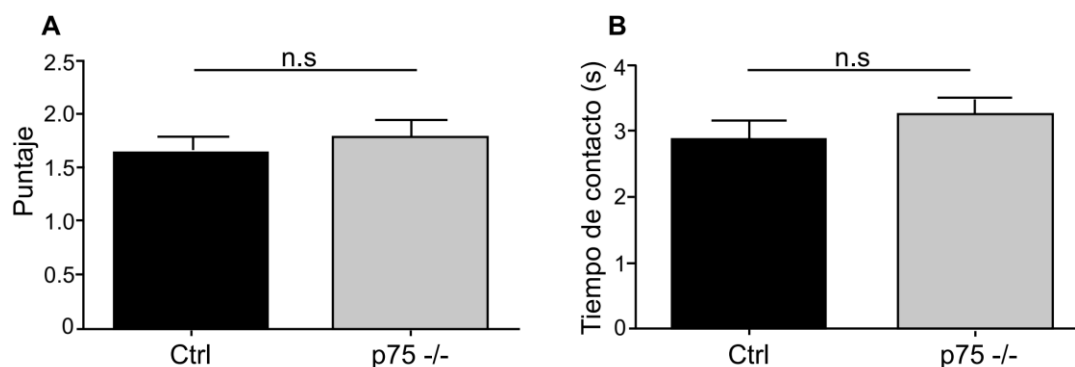


Figura 15: La ausencia del receptor p75 no genera alteraciones en la sensibilidad mecánica.

Ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados para evaluar sensibilidad mecánica mediante test sensoriales. **(A)** Test Von Frey, en el cual los animales fueron estimulados en la planta de la extremidad posterior con filamentos de distinto grosor, los que ejercen una presión determinada según sea su diámetro. Se cuantificó y asignó un puntaje, según sea el filamento que los animales sean capaces de percibir y retirar la extremidad. **(B)** En el test de remoción del adhesivo, éste fue posicionado entre la nariz y la boca de los animales y se midió el tiempo que demoran en remover el adhesivo. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 18 ratones control y N: 12 ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

En segundo lugar, evaluamos la sensibilidad a temperaturas extremas en los ratones *p75*^{-/-} y sus pares control. Para ello, se realizó el test hot plate para evaluar la sensibilidad al calor, mediante el estímulo de luz infrarroja en la planta de la extremidad posterior de los animales. Los ratones *p75*^{-/-} registraron un mayor tiempo de retirada de la extremidad de $7,06 \pm 0,25$ s y por ende, en percibir el estímulo en comparación a los animales control quienes retiran la extremidad luego de $5,68 \pm 0,24$ s (**Figura 16A**). Posteriormente, se analizó la sensibilidad al frío mediante la estimulación de la planta de la extremidad posterior del animal con acetona, midiendo el tiempo de respuesta del animal. Los resultados muestran que los ratones *p75*^{-/-} presentan un tiempo de duración de la respuesta de $3,25 \pm 0,62$ s en comparación con los ratones control que responden en $1,5 \pm 0,13$ s (**Figura 16B**).

Los resultados indican que la ausencia del receptor *p75* produce una disminución en la sensibilidad al calor acompañada de una hipersensibilidad al frío.

5.6 La ausencia del receptor *p75* produce alteraciones en la sinapsis neuromuscular.

Sin descartar la posible contribución de defectos sensoriales sobre las alteraciones en la coordinación motora encontrada en los ratones *p75*^{-/-}, evaluamos si la disminución en la fuerza de contracción y debilidad muscular observada en estos mutantes se correlaciona con una alteración en la sinapsis neuromuscular. Para ello, se realizaron ensayos de aproximación *in vivo* de la

sinapsis neuromuscular mediante análisis de electromiografía, donde se registró la contracción del músculo gastrocnemio en respuesta a estimulación eléctrica sobre el nervio ciático (**Figura 17**). Los resultados indican que existe una disminución en el tiempo requerido para generar la máxima contracción muscular en los ratones *p75*^{-/-}, los cuales registran un tiempo de $43,55 \pm 0,66$ s en comparación a los animales control quienes requieren de $45,84 \pm 0,57$ s para la contracción del músculo (**Figura 17A,C**). Sin embargo, no se encontraron diferencias en los tiempos de latencia o de relajación del músculo, este último tiempo en el cual se vuelve al estado de reposo (**Figura 17B,D**). Adicionalmente, al estimular el nervio con frecuencias crecientes de 1, 50 y 100 Hz (**Figura 18**), se observó que a alta frecuencia de estimulación eléctrica (100 Hz, tetánica), los ratones *p75*^{-/-} presentan fatiga muscular en comparación a los animales control (**Figura 18D**). Sin embargo, a bajas frecuencias de estimulación eléctrica (1 y 50 Hz) no se observaron diferencias en la fatiga muscular entre ambos tipos de animales (**Figura 18B-C**).

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la disminución en la fuerza de contracción isométrica, defecto producido en el músculo, podría relacionarse a defectos en la generación de la contracción muscular, evidenciadas por alteraciones en los registros de electromiografía tales como disminución en el tiempo de contracción y fatiga muscular presentes en los ratones *p75*^{-/-}.

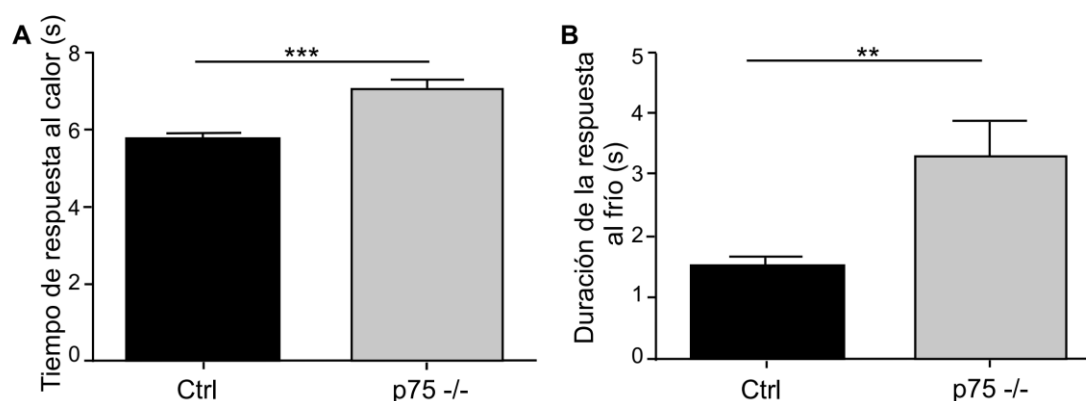


Figura 16: La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la sensibilidad a las temperaturas.

Ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados mediante pruebas de sensibilidad al calor y frío. **(A)** Test de sensibilidad al calor. Los animales fueron estimulados en la planta de una de sus extremidades posteriores con un láser infrarrojo midiendo el tiempo en el cual los animales retiran la extremidad. **(B)** Test de sensibilidad al frío. Los animales fueron estimulados en una de sus extremidades posteriores con una gota de acetona midiendo el tiempo en total que los animales manifiestan la percepción del estímulo mediante agitación de la extremidad. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 18 ratones control y N: 12 ratones *p75*^{-/-}. (* $p < 0,5$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

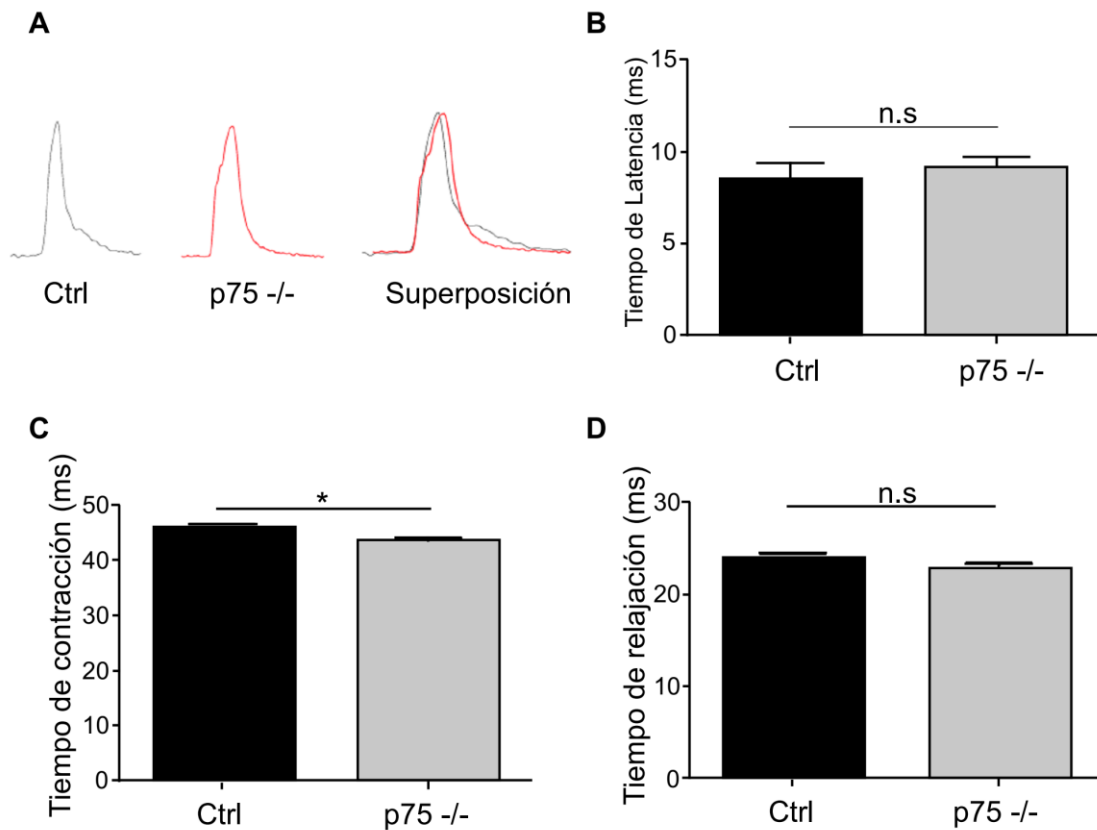


Figura 17: La ausencia del receptor p75 produce un aumento en el tiempo de contracción muscular.

Se realizaron ensayos de electromiografía en los cuales se estimuló eléctricamente el nervio ciático de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad, registrando la contracción del músculo gastrocnemio. **(A)** Registro representativo de una contracción producida por estimulación a baja frecuencia (1 Hz). **(B)** Cuantificación de tiempo de latencia, tiempo comprendido entre el gatillamiento de la contracción y el inicio de la relajación del músculo. **(C)** Tiempo requerido para el gatillamiento de la contracción muscular. **(D)** Tiempo de relajación del músculo requerido para que éste vuelva al estado de reposo. Las mediciones fueron registradas luego de la estimulación eléctrica de 1Hz del nervio ciático. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 7 ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

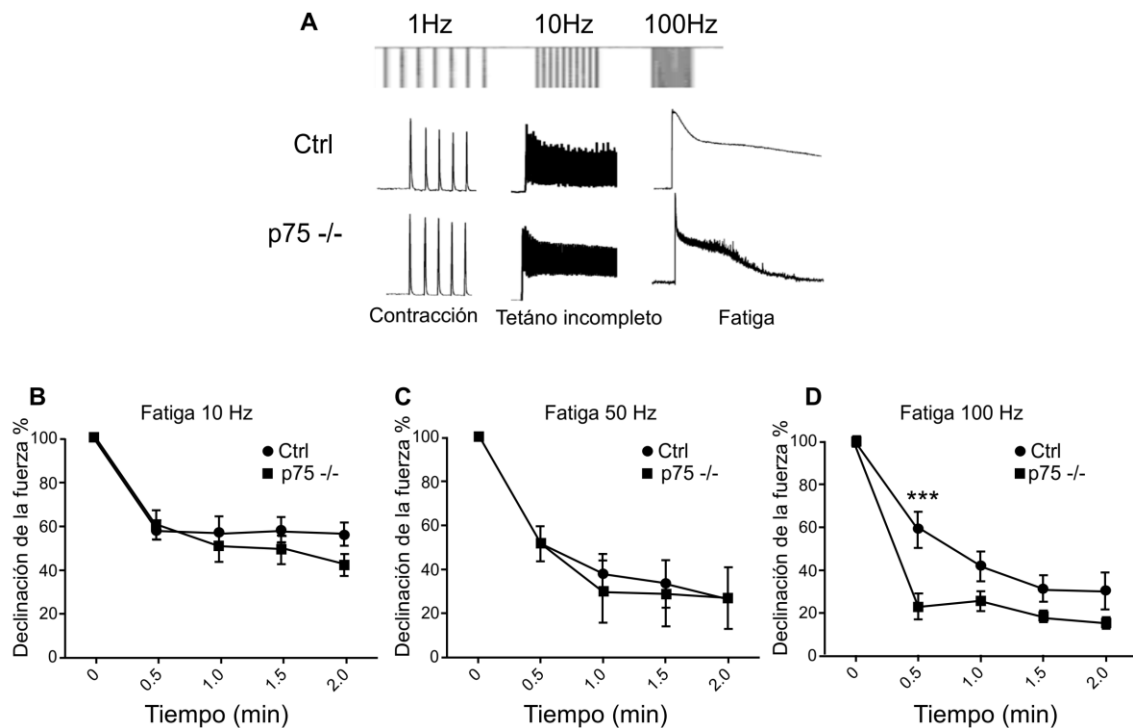


Figura 18: La ausencia del receptor p75 produce fatiga muscular.

Se estimuló eléctricamente el nervio ciático en ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad, registrando la contracción del músculo gastrocnemio. **(A)** Registro representativo de una contracción, un registro de tétano incompleto y posterior fatiga muscular. Los registros representativos fueron obtenidos a 1, 10 y 100 Hz de frecuencias de estimulación del nervio. **(B-D)** Cuantificación de la fuerza de declinación durante el tiempo como medida de fatiga muscular producida por frecuencias de estimulación de 1 Hz **(B)**, 50 Hz **(C)** y 100Hz **(D)** del nervio. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 7 ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), 2-way ANOVA de dos colas. Fuente: Elaboración propia.

Con esta idea, analizamos posibles defectos en la sinapsis neuromuscular en los ratones *p75*^{-/-} y sus pares control.

5.7 El receptor de neurotrofinas p75 es necesario para la maduración de la UNM adulta

Para abordar en más en detalle la sinapsis neuromuscular, se procedió a evaluar la morfología de la UNM para analizar la maduración del aparato postsináptico de ratones *p75*^{-/-} en el músculo diafragma (**Figura 19**). Para ello, se realizó un análisis morfológico de los AChR de esta sinapsis. La clasificación morfológica utilizada comprende desde estructuras con forma de O y C, predominantes en los primeros 21 días postnatales, Pretzels maduros que son altamente complejos y ramificados, predominantes en la edad adulta del ratón con UNM maduras, Pretzels fragmentados que son disgregaciones de los AChR que conforman los pretzels, que se observan fisiológicamente en animales envejecidos y, finalmente, Pretzels desmantelados, cuya estructura morfológica es indefinida (**Figura 19A**). Los resultados muestran que los ratones *p75*^{-/-} presentan un 33,53 % de estructuras en la clasificación *Forma C*, mientras que los animales control en esta misma categoría presentan 23.79 % de las estructuras. Adicionalmente, los animales control en su mayoría presentan la categoría *pretzels maduros* con el 67.28 % de las estructuras, mientras que los ratones *p75*^{-/-} poseen 52,42 % de pretzels maduros (**Figura 19B-C**). En concordancia, el número de fragmentos que componen los pretzels es menor en los ratones *p75*^{-/-}, obteniendo un mayor

porcentaje de estructuras compuestas de 1 sólo fragmento en relación al control **(Figura 19D)**.

Al avanzar la curva de maduración, los pretzels aumentan en complejidad y tamaño. Por esta razón, evaluamos en los pretzels parámetros de área, perímetro, volumen y superficie. Los resultados obtenidos del análisis de área muestran que, junto al retraso en la maduración de la morfología, existe una disminución en el área de los pretzels provenientes de ratones *p75*^{-/-} obteniendo un promedio de $230,6 \pm 7,73 \mu\text{m}^2$ en comparación a los animales control quienes presentan $252,9 \pm 5,26 \mu\text{m}^2$ de área de pretzels **(Figura 19E)**. Sin embargo, no fueron observadas diferencias en la medición de perímetro de los pretzels **(Figura 19E)**.

Concordante con el mayor porcentaje de pretzels inmaduros encontrados en ratones *p75*^{-/-}, y por ende menor complejidad de estas estructuras, los resultados muestran un menor valor de superficie **(Figura 20A-B)** y volumen **(Figura 20A,C)** del aparato postsináptico presentes en ratones *p75*^{-/-} en relación al control.

Para definir si el aumento de pretzels inmaduros observados en los ratones nulos para *p75* se debe a un estancamiento en la maduración de la UNM o en un retraso de esta, se evaluó la morfología del aparato postsináptico en animales envejecidos.

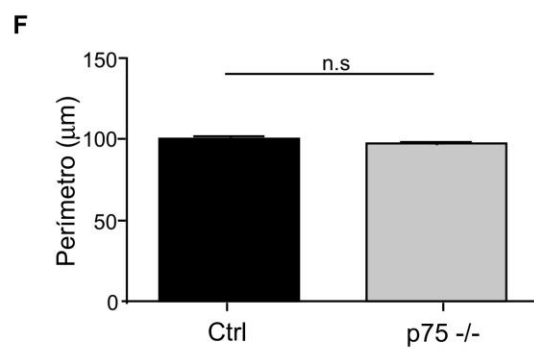
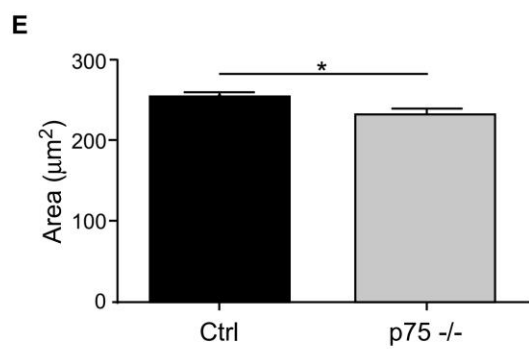
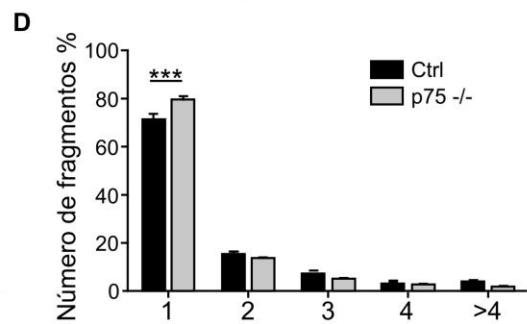
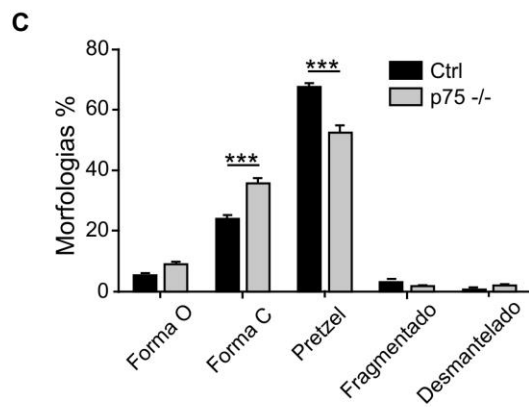
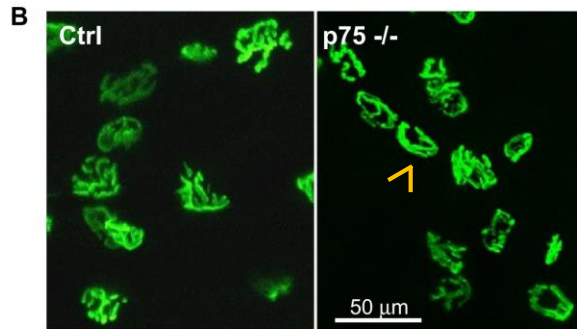
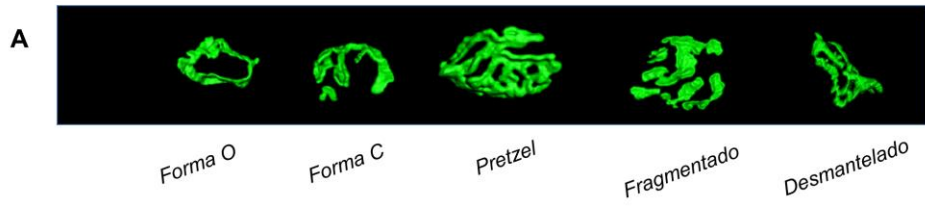


Figura 19: La ausencia del receptor p75 produce un retraso en la maduración del aparato postsináptico de la UNM adulta.

Diafragmas de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2 meses fueron analizados mediante tinción de los AChR con α BTX. **(A)** Clasificación morfológica del aparato postsináptico de la UNM. Para analizar la maduración de los pretzels estos fueron clasificados en *Forma O*: con una o más perforaciones en el interior, *Forma C*: con una apertura en la periferia, *Pretzel*: Pretzels maduros con más de una apertura, *Fragmentados*: Pretzels con más de 4 fragmentos que lo componen y *Desmantelados*: Pretzels sin estructura definida. **(B)** Imagen representativa de las morfologías encontradas en diafragmas de ratones *p75*^{-/-} y control. La imagen fue adquirida mediante microscopía confocal. Flecha indica un pretzel con forma C. Barra= 50 μ m. **(C)** Cuantificación de morfologías de pretzels presentes en diafragmas de ambos tipos de animales. Se analizaron 130-226 UNMs por cada animal. **(D)** Cuantificación del número de fragmentos que conforman un pretzel. Se analizaron 123-216 UNMs por cada animal. En C y D el resultado es expresado como porcentaje total de UNMs cuantificadas. **(E)** Cuantificación de Área promedio de los pretzels, en la cual fueron analizadas 50-100 UNMs por cada animal. **(F)** Cuantificación de perímetro de cada pretzel, en la cual fueron analizadas 50-100 UNMs por cada animal. Todas las cuantificaciones fueron realizadas mediante la utilización del programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 8 ratones control y N: 8 ratones *p75*^{-/-}. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), en C y D fue utilizado 2-way ANOVA de dos colas, en E y D test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

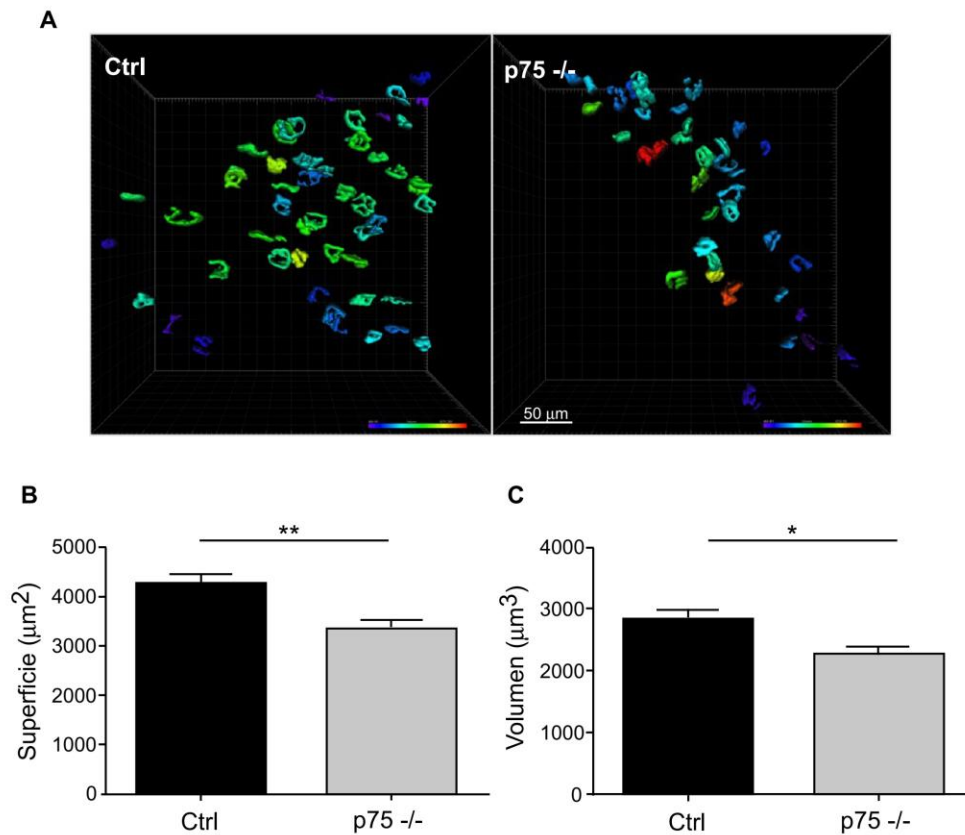


Figura 20: La ausencia del receptor de neurotrofinas p75 resulta en una menor superficie y volumen de los aparatos postsinápticos de la UNM.

Músculos diafragma de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2 meses fueron analizados mediante tinción de los AChR con α BTX. **(A)** Imagen representativa del análisis de volumen de ratones *p75*^{-/-} y control. Las imágenes fueron obtenidas mediante el procesamiento de imágenes a partir de una imagen de microscopía confocal, utilizando el programa Imaris (Bitplane) mediante la función Blend. Barra= 50 μ m. **(B)** Cuantificación de superficie de cada pretzels. **(C)** Cuantificación de volumen de cada pretzel. Las cuantificaciones fueron realizadas mediante el uso del programa ImageJ, siendo contabilizadas 50-100 UNMs por cada animal. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 8 ratones control y N: 8 ratones *p75*^{-/-} (* p <0,5; ** p <0,1, *** p <0,01), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados muestran que los ratones *p75*^{-/-} poseen mayor porcentaje de estructuras inmaduras (*Forma C*), en desmedro de un menor porcentaje de pretzels fragmentados en comparación a los ratones control (**Figura 21A-B**).

Sin embargo, no se observa diferencias en el área y perímetro de los pretzels entre ambos genotipos (**Figura 21C-D**).

Así, nuestros resultados muestran un retraso en la fragmentación de los pretzels de ratones *p75*^{-/-} envejecidos, además de un incremento de pretzels inmaduros encontrados en animales mutantes de edad 2-4 meses. En su conjunto, los datos indican que los ratones *p75*^{-/-} poseen un retraso en la progresión de la maduración postsináptica y no una detención en la maduración de la UNM. Por lo tanto, los datos demuestran que el receptor de neurotrofinas p75 es requerido para la progresión de la maduración de la UNM adulta.

5.8 El receptor p75 expresado en el músculo no contribuye al retraso en la maduración postsináptica de la UNM.

Como fue mencionado anteriormente, el receptor de neurotrofinas p75 se expresa en los 3 componentes de la UNM. Para determinar si el receptor p75 de origen muscular es el responsable del retraso en la progresión de la maduración observada en los pretzels de los ratones *p75*^{-/-}, se realizaron análisis a través de cultivos primarios musculares.

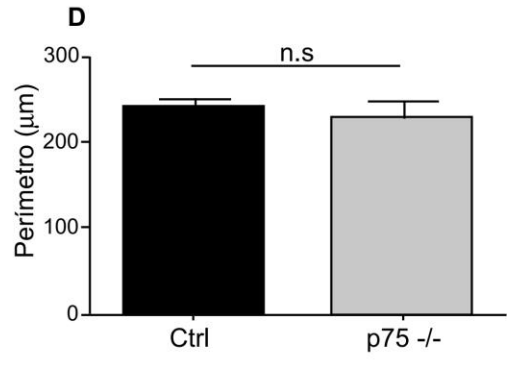
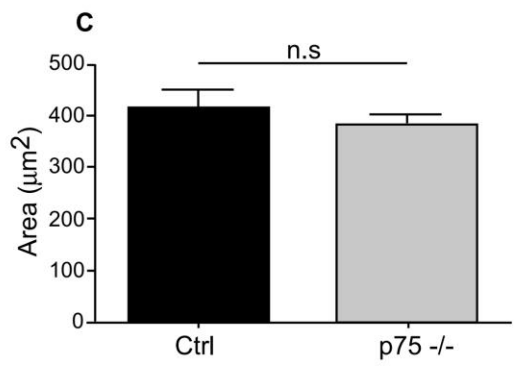
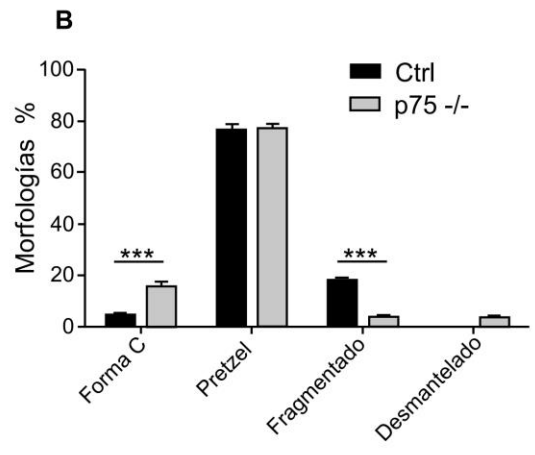
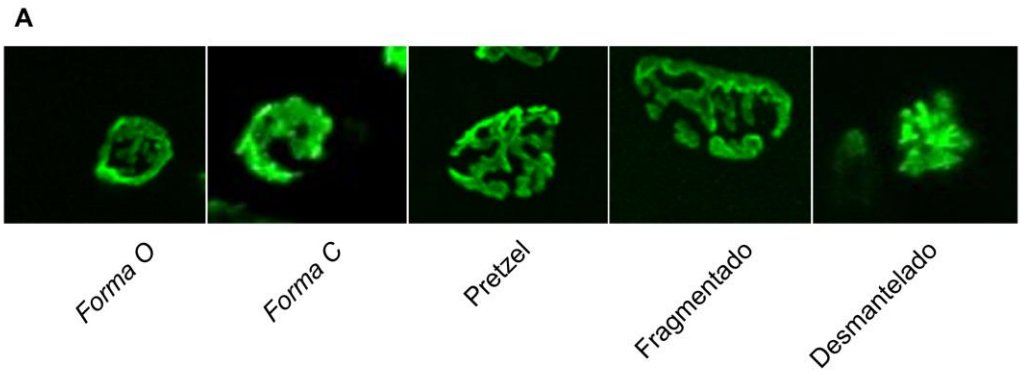
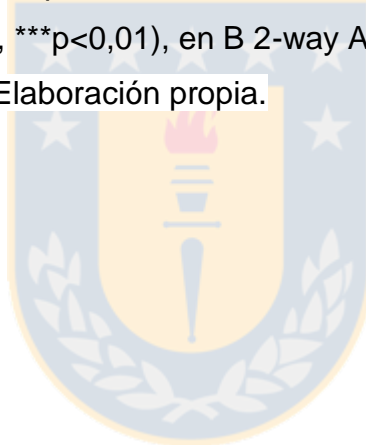


Figura 21: La ausencia del receptor p75 produce un retraso en la fragmentación del aparato postsináptico de la UNM.

Cortes longitudinales de músculo tibial anterior obtenidos desde ratones *p75*^{-/-} y control de 15-17 meses de edad fueron teñidos con α BTX para el análisis de los AChR. **(A)** Clasificación morfológica de los pretzels. **(B)** Cuantificación de morfologías de pretzels expresado en porcentaje del total de AChR presentes en los músculos. **(C)** Cuantificación del área de cada pretzels. **(D)** Cuantificación del perímetro de cada pretzels. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ, siendo cuantificadas al menos 20 UNMs por ratón. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-} (* p <0,5; ** p <0,1, *** p <0,01), en B 2-way ANOVA dos colas, en C y D test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.



Para ello, se adaptó una técnica descrita en literatura en la cual células musculares de línea C2C12 son sembradas sobre una matriz de laminina y luego de inducir la diferenciación a miotubos se permite la formación de agregados del AChR, formando estructuras similares a pretzels de forma aneural. Con los días en cultivo *in vitro*, estas estructuras aumentan su complejidad similar a la maduración del aparato postsináptico *in vivo*. En esta tesis se realizó una adaptación a esta técnica en donde el origen de las células musculares es a partir de cultivos primarios de células satélites provenientes de músculo gastrocnemio de ratones *p75*^{-/-} y control (**Figura 22**). En los cultivos primarios obtenidos, las estructuras tipo pretzels son comparables con las morfologías de los pretzels durante las primeras semanas postnatales *in vivo*. En esta clasificación se encuentran previo a la *Forma O* antes descrita, la clasificación de *Placa*, consistente en un óvalo de distribución homogénea de los AChR (**Figura 23A**). Los resultados indican que no existe diferencias en la morfología, y por lo tanto, de la complejidad de las estructuras similares a pretzels entre los AChR formados sobre miotubos de cultivos primarios tanto desde músculos de ratones *p75*^{-/-} como músculos de animales control. En ambos casos, la mayoría de las estructuras encontradas fueron placas (**Figura 23B**). Concordante con el análisis morfológico, los resultados no muestran diferencias en el análisis de área y perímetro de las estructuras de agregados del AChR analizadas entre ambos genotipos (**Figura 23C-D**). Para analizar si la formación de los agregados de AChR podría afectarse en ausencia de *p75* de origen muscular, fueron

cuantificados el número de estructuras tipo pretzels por unidad de área de miotubos. Los resultados muestran que no existe diferencias en la capacidad de formar los agregados de AChR en miotubos carentes de p75 en relación al control **(Figura 23E)**.

En su conjunto, los resultados sugieren que el receptor p75 expresado en músculo no es directamente el responsable de las alteraciones morfológicas observadas en los pretzels de ratones *p75^{-/-}*, por lo cual se hace necesario determinar si existen alteraciones en el axón motor y/o células de Schwann de estos mutantes.

5.9 La ausencia del receptor p75 no altera la inervación de la UNM ni la mielinización de axones periféricos.

Como primera aproximación para el análisis del axón motor, evaluamos el perfil de inervación del músculo Levator Auris Longus (LAL) de ratones *p75^{-/-}* y control. Dicho músculo posee ciertas ventajas experimentales ya que es un músculo plano, posee pocas capas de fibras musculares y presenta los pretzels en *face*, lo cual facilita el análisis de inervación de la UNM. El músculo LAL presenta 2 porciones; rostral y caudal, ambas inervadas por una rama posterior auricular del nervio facial, generando zonas de inervación en las distintas porciones. Así, en cada hemi-LAL en la porción rostral se encuentra las zonas de inervación R1-R5, mientras que en la porción caudal se generan las zonas de inervación C1 y C2 (Murray et al. 2008, Murray et al. 2010) **(Figura 24)**. Los resultados indican que

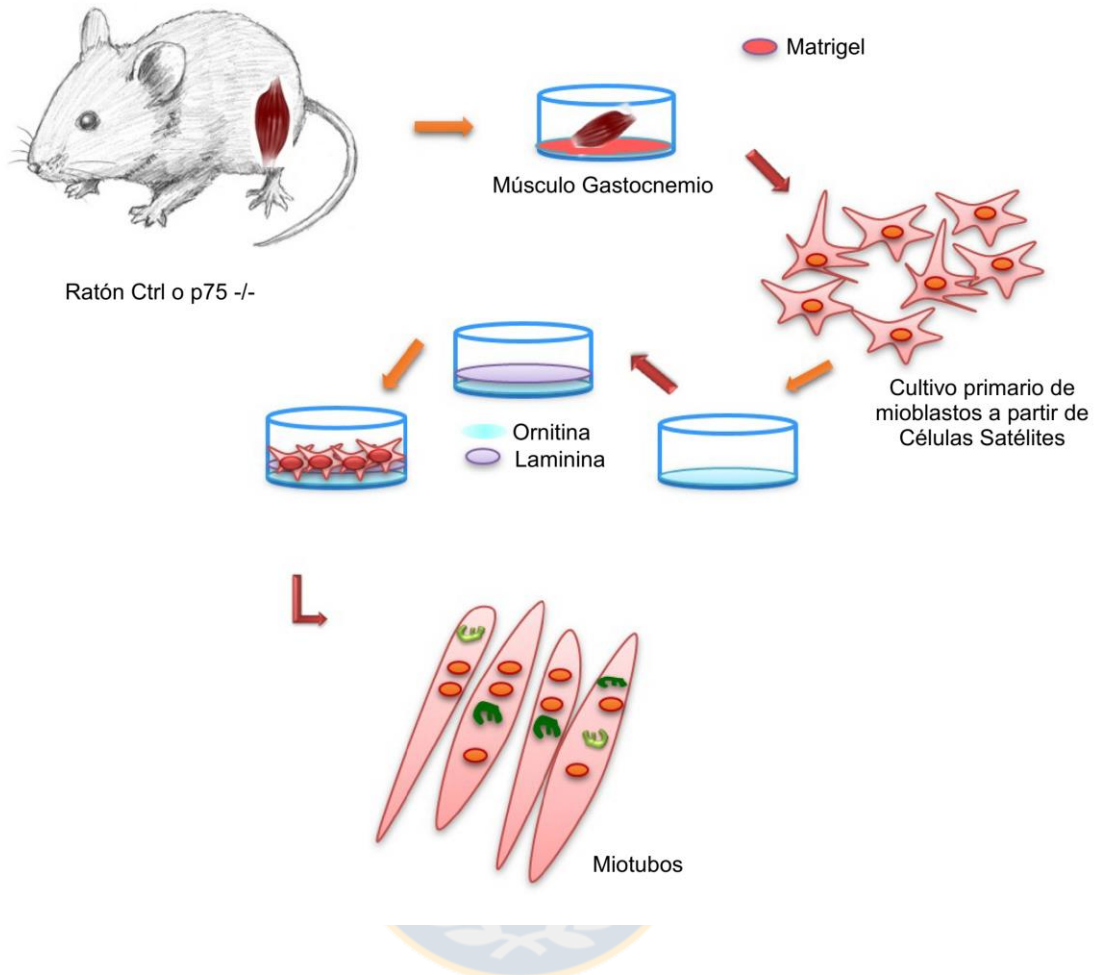


Figura 22: Obtención de estructuras tipo pretzels a partir de cultivos primarios.

Se obtuvieron cultivos primarios a partir de células satélite de músculo gastrocnemio de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad. Las células satélite fueron obtenidas y seleccionadas mediante el crecimiento de estas sobre una placa cubierta con matrigel. Posteriormente, los mioblastos obtenidos fueron sembrados sobre una matriz de Ornitina/Laminina e inducidos a fusionarse para formar miotubos. Luego de 5 días de cultivo *in vitro*, es posible obtener miotubos con agregados del AChR organizado en estructuras similares a pretzels que incrementan su complejidad según los días de cultivo *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

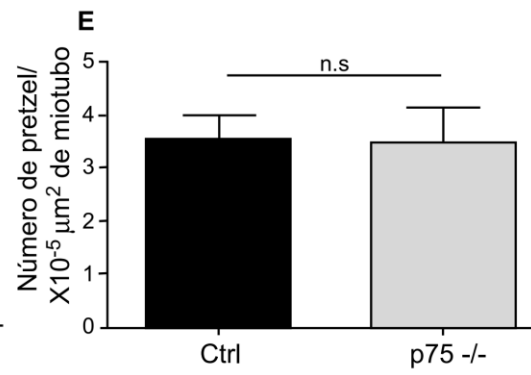
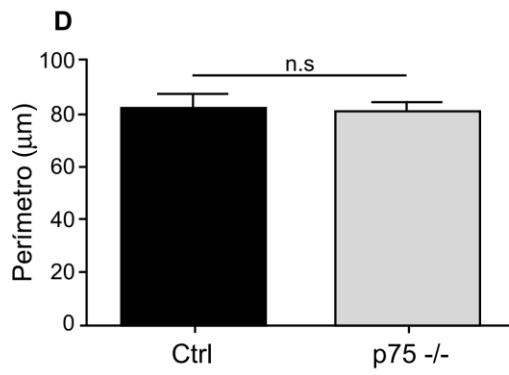
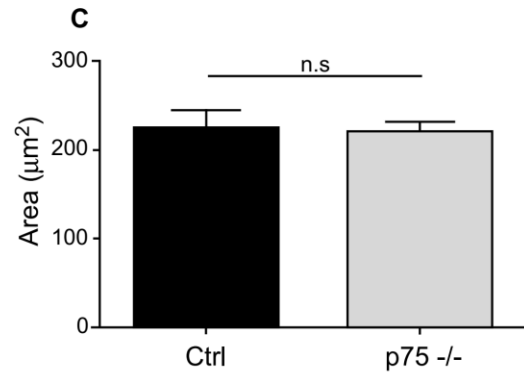
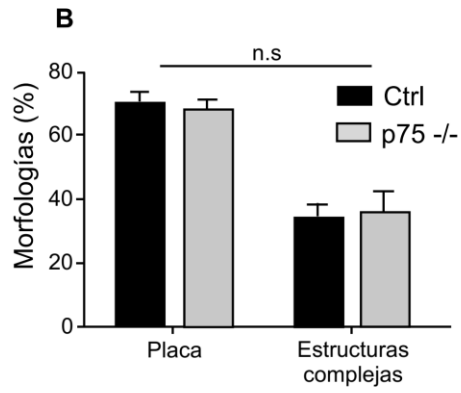
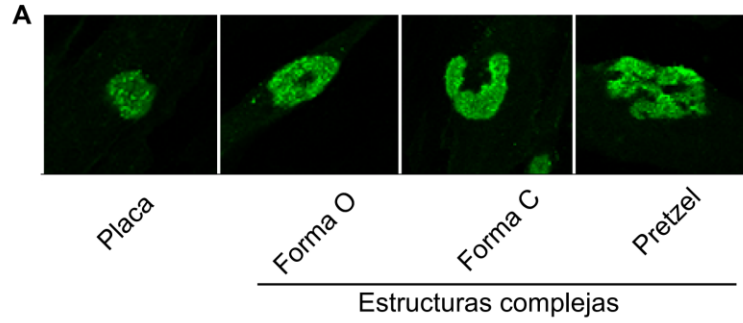


Figura 23: p75 muscular no afecta la morfología de los agregados del AChR tipo pretzels en cultivos de miotubos primarios.

Agregados del AChR tipo pretzels fueron obtenidos a partir de la formación de miotubos provenientes de cultivos primarios de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad. Los AChRs fueron teñidos con α BTX para el análisis morfológico de las estructuras. **(A)** Clasificación morfológica de estructuras tipo pretzels. *Placa*: óvalo conformado por agregados del AChR de distribución homogénea. *Forma O*: posee una o más perforaciones en el interior, *Forma C*: posee una apertura, *Pretzel*: Pretzels maduros con más de una apertura. Las morfologías correspondientes a Forma O, C y Pretzels fueron agrupadas en la categoría de estructuras complejas. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. **(B)** Cuantificación de morfologías de los agregados de AChR. El resultado es expresado como porcentaje total de estructuras tipo pretzels cuantificadas. **(C)** Cuantificación de Área de cada estructura tipo pretzel. **(D)** Cuantificación de perímetro de cada estructura tipo pretzel. **(E)** Cuantificación de número de pretzels por área de miotubo. Las cuantificaciones fueron realizadas mediante la utilización del programa ImageJ, siendo cuantificadas 30-50 estructuras por experimento. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-}, de tres cultivos por animal. (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$), en B 2-way ANOVA dos colas, en C-E test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

no existen diferencias en el perfil de inervación en los músculos de los ratones *p75*^{-/-}, debido a que se conservan las zonas de inervación en comparación a los animales control (**Figura 24A**). A este respecto, las ramificaciones que generan las zonas C2 (círculo rojo), R1 (círculo celeste) y R2 (círculo verde) se mantienen conservadas entre el músculo LAL de ratones *p75*^{-/-} y control (**Figura 24B**). Así, la ausencia del receptor de neurotrofinas p75 no produce alteraciones significativas en el perfil de inervación del músculo LAL.

Para evaluar inervación de los pretzels de ratones *p75*^{-/-} se analizó en mayor detalle la zona de inervación R3 (**Figura 25A-B**), región donde se observó una correcta aposición tanto del axón motor como de las células de Schwann sobre los aparatos postsinápticos de ambos animales (**Figura 25C-D**). La cuantificación de la aposición del terminal presináptico y los pretzels indica que no existe diferencia en la inervación entre el ratón *p75*^{-/-} y control, encontrando en ambos genotipos un alto porcentaje de aposición pre/postsináptica, indicando que los pretzels se encuentran correctamente inervados (**Figura 25D**). Posteriormente, se realizó un análisis en mayor profundidad mediante microscopía de super-resolución. Mediante esta técnica es posible observar una distribución estriada de los AChR, donde estos receptores son localizados a nivel ultraestructural sobre las invaginaciones de la membrana muscular en directa aposición a las zonas activas del terminal axónico. Los resultados muestran que las bandas de AChR presentes en los pretzels de ambos genotipos son correctamente inervadas por el axón motor tanto en ratones *p75*^{-/-} como control (**Figura 26**).

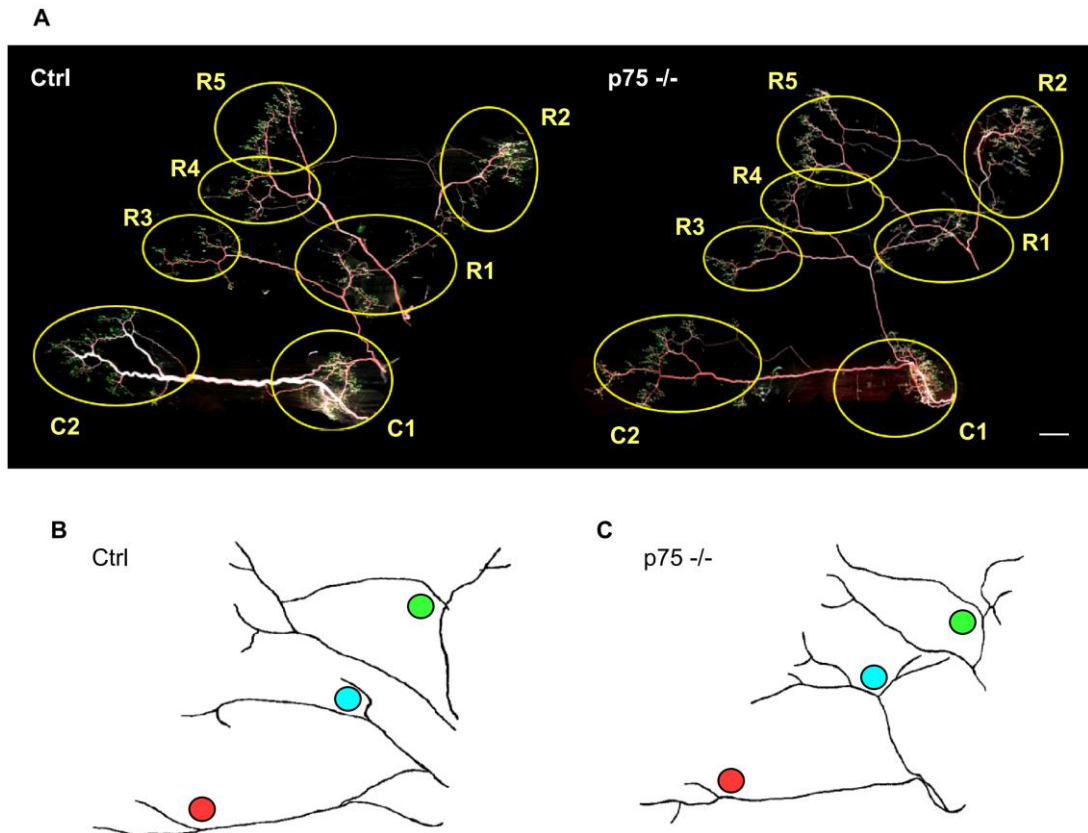


Figura 24: EL perfil de inervación del músculo LAL no se altera en ausencia del receptor p75.

Músculo Levator Auris Longus (LAL) de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados para evaluar el perfil de inervación. El hemi-LAL derecho de los animales fue analizado mediante inmunohistoquímica. En blanco se observa Células de Schwann (S-100), en rojo la motoneurona (2H3 + SV2) y en color verde AChR (α BTX). **(A)** Reconstrucción del hemi-LaL derecho, la cual fue realizada mediante imágenes obtenidas y procesadas utilizando el programa ImageJ y el plugin MosaicJ. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia, siendo consideradas alrededor de 50 fotos que componen la reconstrucción final. Barra= 500 μ m. **(B)** Esquema del perfil de inervación en animales control. **(C)** Esquema del perfil de inervación en ratones *p75*^{-/-}. En círculo rojo, la ramificación que conforma la zona de inervación C2, en celeste la zona R1 y en verde la zona R2. Fuente: Elaboración propia.

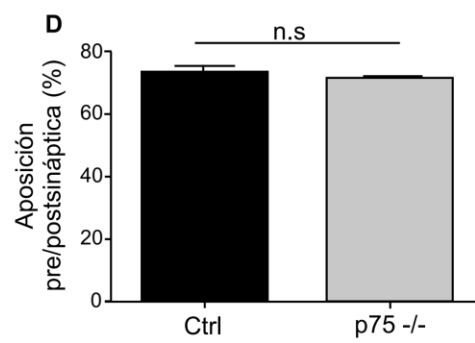
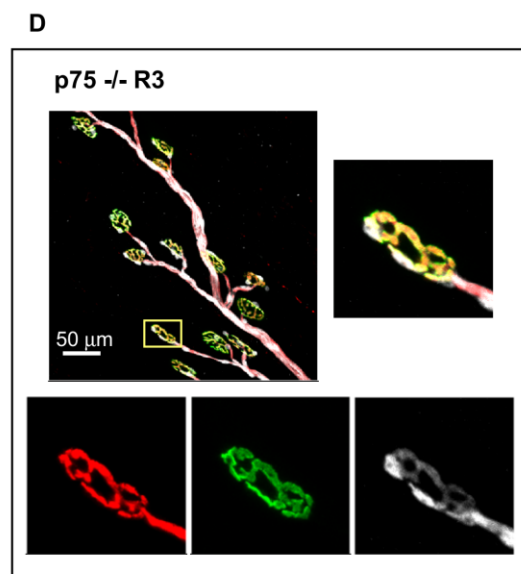
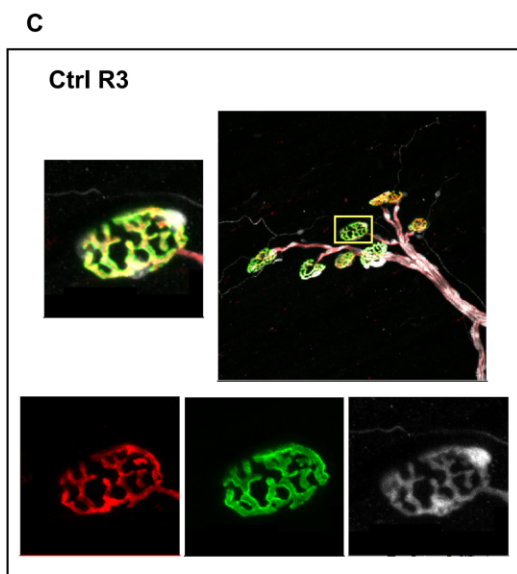
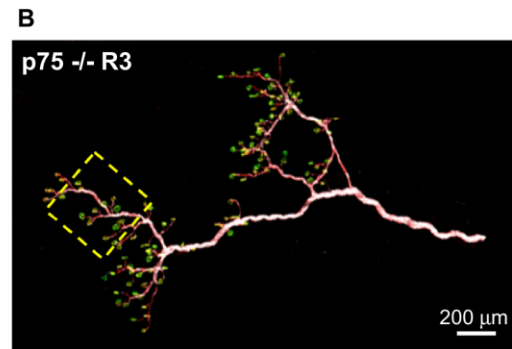
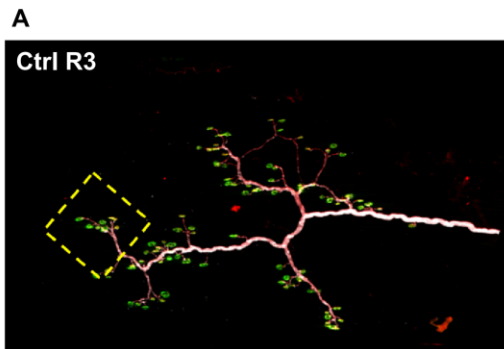


Figura 25: La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en la inervación del aparato postsináptico de la UNM.

Los músculos Levator Auris Longus (LAL) de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados para evaluar la inervación de los agregados de AChR en la UNM. El hemi-LAL derecho de los ratones fue analizado mediante inmunohistoquímica. En blanco se observa la tinción de células de Schwann (S-100), en rojo la de axones motores (2H3 + SV2) y en verde de los agregados del AChR (α BTX). **(A)** Región de inervación R3 de ratones control y *p75*^{-/-}. La reconstrucción fue realizada utilizando el programa ImageJ y el plugin MosaicJ y las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia, Barras= 200 μ m y 50 μ m. **(B)** Magnificación de la zona de inervación R3 de animal control **(C)** Magnificación de la zona de inervación R3 del ratón *p75*^{-/-}. **(D)** Cuantificación del porcentaje de aposición entre terminal axónico y pretzels. La cuantificación fue realizada mediante el uso del programa ImageJ, siendo analizadas 35 UNMs por cada ratón. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-} (n.s.= diferencias no significativas, $p < 0,5$ test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

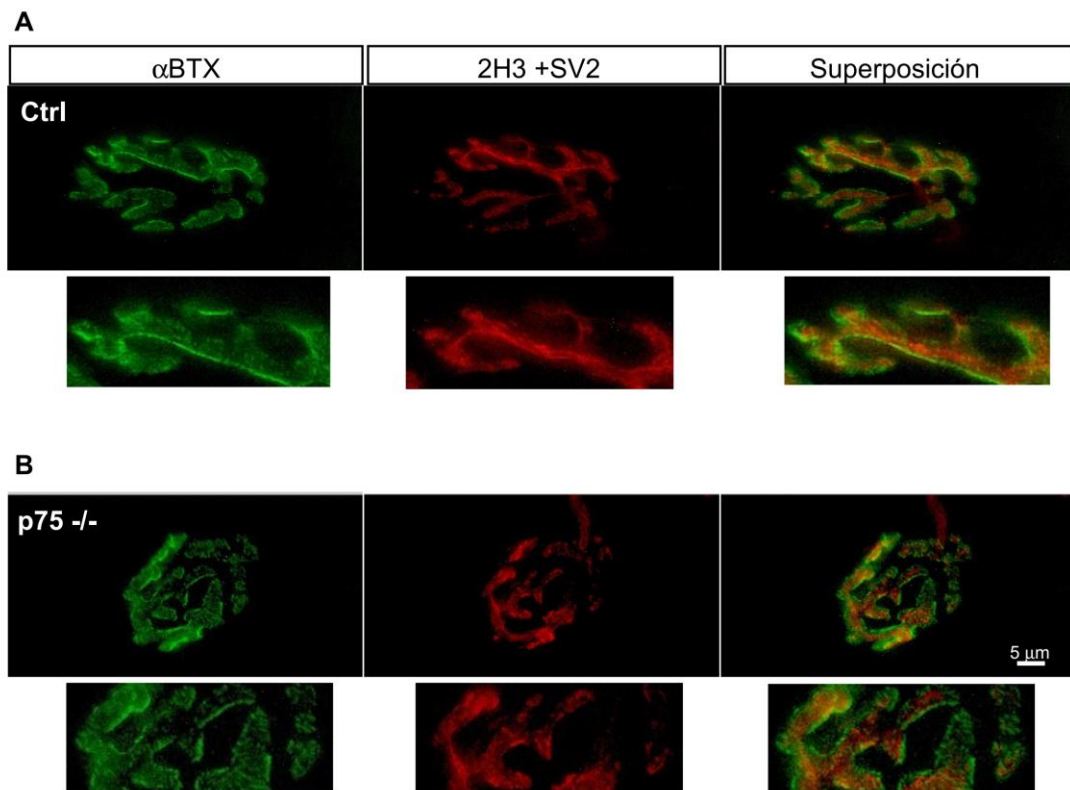


Figura 26: Análisis en microscopía de superresolución muestra una correcta aposición entre motoneurona y pretzels en ausencia de p75.

Los músculos Levator Auris Longus (LAL) de ratones **(A)** control y **(B)** *p75*^{-/-} de 2-4 meses de edad fueron analizados mediante microscopía de superresolución. La inmunohistoquímica muestra en color rojo el terminal axónico motor (2H3 + SV2) y en verde los agregados del AChR (α BTX), donde se observa la distribución en bandas de los AChR. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de superresolución SR-SIM (*Three Dimensional Structured Illumination Microscopy*) y adquiridas mediante un escaneo láser utilizando el sistema confocal ELYRA S.1 (SIM-SR) (Zeiss). Barra= 5 μ m. Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, se prosiguió con un análisis más en detalle del componente neuronal de la UNM de los ratones *p75*^{-/-}. Para evaluar si el número de axones que inervan los músculos se encuentra alterado, se cuantificó el número total de axones que componen el nervio ciático (**Figura 27A**). Los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} poseen un menor número de axones, presentando $992,0 \pm 79,39$ axones mientras que los animales control poseen $2164 \pm 121,2$ axones que componen una región de la sección transversal del nervio ciático (**Figura 27B**).

Concordantemente, al cuantificar la densidad de axones, se observa que los nervios de ratones *p75*^{-/-} presentan $0,007 \pm 0,00035$ axones por μm^2 de área de nervio mientras que los animales control poseen $0,008 \pm 0,00018$ axones (**Figura 27C**). Los resultados indican que existe un número reducido de axones totales que componen el nervio ciático.

Teniendo en consideración que existe un menor número de axones, se determinó si la mielinización realizada por las células de Schwann en el axón motor se encuentra alterada en los ratones *p75*^{-/-}. Sin embargo, tanto en el análisis mediante inmunohistoquímica del nervio ciático con un anticuerpo dirigido contra proteínas de unión a mielina (MBP) (**Figura 27A**) como en tinción histológica (**Figura 27D**), no se observaron diferencias en este parámetro. Más aún, mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión del nervio ciático se cuantificó el g-ratio, indicador del grosor de la mielina que rodea al axón. Los resultados indican que no existe diferencia en dicho parámetro entre los ratones *p75*^{-/-} y controles (**Figura 28A-B**).

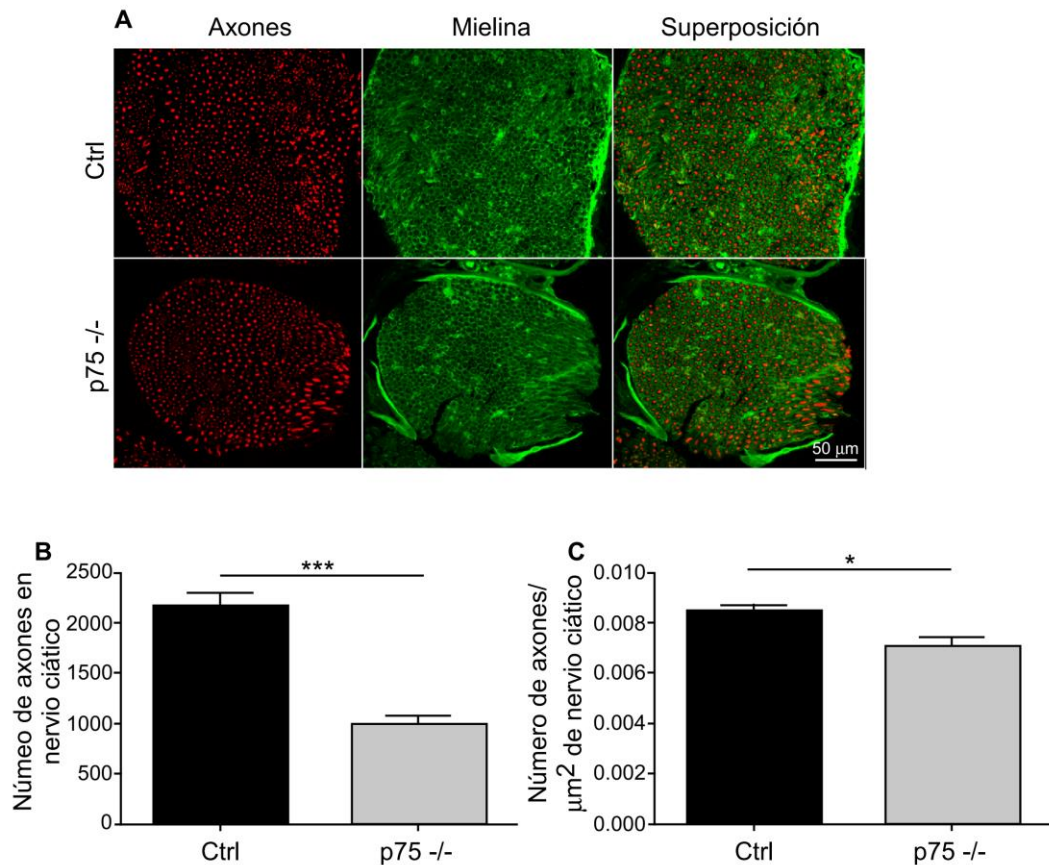


Figura 27: La ausencia del receptor p75 resulta en una disminución del número de axones en el nervio ciático.

Crio secciones transversales de nervio ciático provenientes de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron analizados. **(A)** Imagen representativa de inmunohistoquímica del nervio ciático. Se observa en rojo los axones (Neurofilamento) y en verde mielina (MBP). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barra= 50 μm . **(B)** Cuantificación de número de axones totales en un segmento del nervio ciático. **(C)** Cuantificación de densidad de axones. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-}. (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

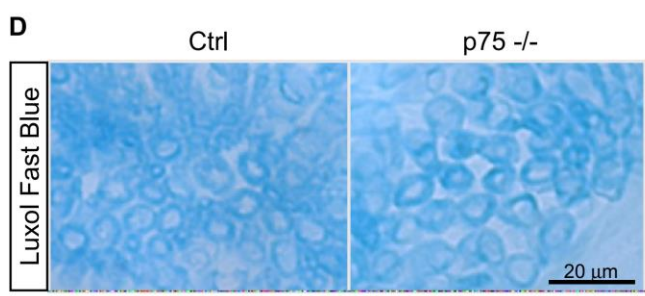
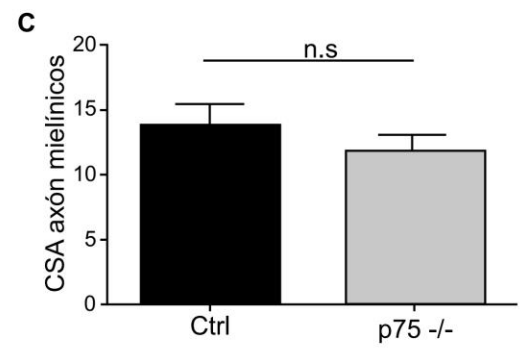
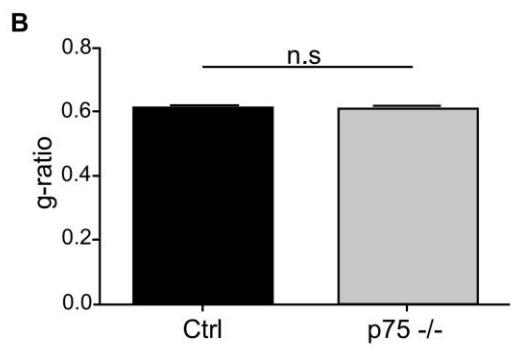
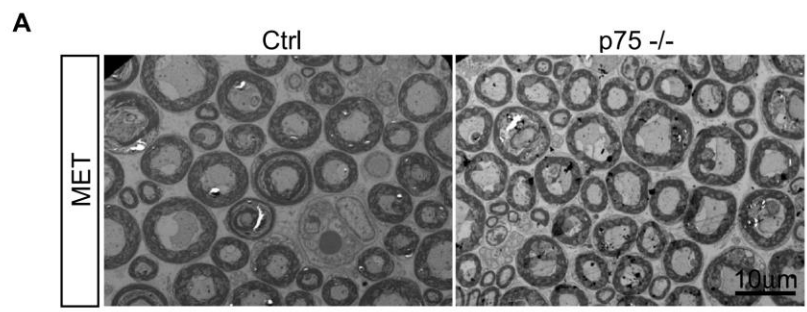


Figura 28: La ausencia del receptor p75 no afecta la mielinización de axones periféricos.

Cortes transversales de nervio ciático de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados para evaluar mielinización de los axones mediante tinción histológica y microscopía electrónica de transmisión (MET). **(A)** Imagen representativa de nervio ciático obtenida mediante MET de ambos genotipos. Barra= 10 μ m. **(B)** Determinación del g-ratio como indicador de mielinización. Dicho parámetro se calcula mediante la relación matemática entre el diámetro del axón en relación al diámetro del axón conjuntamente con la mielina que lo rodea. **(C)** Cuantificación del área de sección transversal de axones mielínicos (CSA) presentes en nervio ciático de ambos animales. Todas las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ. **(D)** Tinción histológica Kluve Barrera mediante Luxol Fast Blue de criosecciones del nervio ciático para marcar mielina en color azul. Barra= 20 μ m. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 4 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-}. (* p <0,5; ** p <0,1, *** p <0,01), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, no se encontraron diferencias en el CSA de los axones mielínicos presentes en el nervio ciático entre ambos animales (**Figura 28C**). Por lo tanto, en su conjunto los resultados sugieren que a pesar de poseer un menor número de axones, la mielinización de los axones en el nervio ciático de ratones *p75*^{-/-} no se encuentra alterada.

5.10 Ratones nulos para el receptor p75 presentan alteraciones en la ultraestructura de la UNM.

En consideración a las alteraciones morfológicas del aparato postsináptico encontrada en ratones *p75*^{-/-}, se determinó si estos mutantes presentan también alteraciones en la ultraestructura de la UNM, contribuyendo de esta manera a la descoordinación motora, debilidad muscular y defectos en la contracción del músculo encontrada en estos animales.

Para ello, se realizó un análisis a través de Microscopía electrónica de transmisión (MET). El análisis del terminal axónico indica que la ausencia del receptor p75 produce una drástica disminución en la densidad de vesículas en la sinapsis neuromuscular. Así, los ratones *p75*^{-/-} presentan $25,48 \pm 2,89$ vesículas por μm^2 de terminal, mientras que los animales control presentan $55,59 \pm 3,25$ vesículas por μm^2 de terminal (**Figura 29A-B**). En concordancia con este resultado, se encontró una significativa reducción en la densidad de vesículas disponibles para la liberación (*Readily Releasable Pool, RRP*) (**Figura 29C**), así como una disminución en el número de zonas activas (**Figura 29D**) en los

terminales neuromusculares de ratones *p75*^{-/-} en comparación con los animales control. Sin embargo, no fueron encontradas diferencias en el tamaño de las vesículas (**Figura 29E**) o en el número de vesículas acopladas a la membrana que se encuentran liberando neurotransmisor (**Figura 29F**).

En su conjunto, el análisis de la ultraestructura del componente presináptico de la UNM indica que el receptor de neurotrofinas p75 regula la disponibilidad de vesículas sinápticas en el terminal axonal de la UNM, sugiriendo que la ausencia del receptor p75 resulta en una disminución en la cantidad de neurotransmisor en esta sinapsis.

Por otra parte, se realizó el análisis de la ultraestructura del aparato postsináptico de la UNM, donde los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} poseen un reducido perímetro postsináptico, cuantificado como la longitud de las invaginaciones en la membrana del músculo que se observan en la zona de contacto con la motoneurona. Así, los ratones *p75*^{-/-} presentan $2,30 \pm 0,29 \mu\text{m}$ de longitud postsináptica en comparación con los animales control que presentan $3,41 \pm 0,16 \mu\text{m}$ de longitud postsináptica (**Figura 30B**). En concordancia, se observó un reducido número de invaginaciones de la membrana muscular o pliegues secundarios en los terminales neuromusculares de ratones *p75*^{-/-} en comparación a sus pares control. A este respecto, los ratones *p75*^{-/-} poseen $1,23 \pm 0,45$ pliegues por μm de aposición pre y postsináptica en los terminales, en comparación a $2,27 \pm 0,18$ pliegues encontrados en las UNMs de animales control (**Figura 30C**). No se encontraron diferencias en la profundidad y ancho

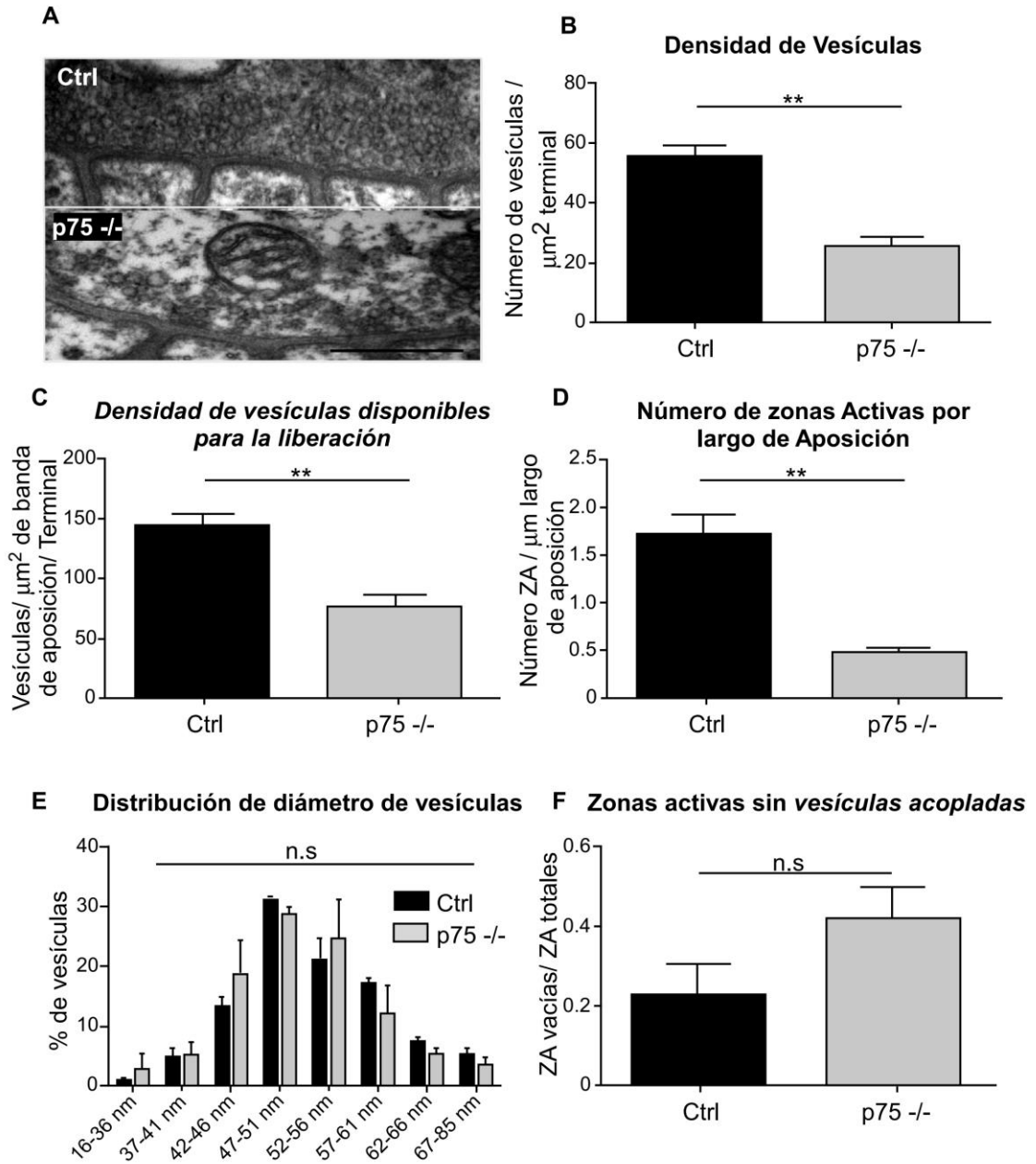


Figura 29: La ausencia del receptor p75 resulta en una disminución de vesículas en el terminal sináptico de la UNM.

Músculos diafragma de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). **(A)** Imagen representativa del terminal neuromuscular de animales control y *p75*^{-/-}. Barra= 500nm. **(B)** Cuantificación de densidad de vesículas. Fue cuantificado el número total de vesículas presentes en cada terminal axónico, siendo expresado en relación a unidad de área de terminal sináptico. **(C)** Cuantificación de densidad de vesículas disponibles para liberación (RRP). Fueron consideradas las vesículas que se localizan sobre una zona activa hasta 480nm por sobre la membrana presináptica del terminal axónico y el ancho del pliegue secundario que se encuentra en directa aposición a dicha zona activa. **(D)** Cuantificación del número de zonas activas. Fueron cuantificadas el número total de zonas activas, definidas como zonas electrodensas en directa aposición a pliegues secundarios. Los resultados fueron expresados en relación al largo de aposición pre/postsináptico. **(E)** Cuantificación de Diámetro de vesículas. Fueron cuantificadas 40-110 vesículas por imagen de terminal. **(F)** Cuantificación de zonas activas sin vesículas acopladas. Se consideraron como vesículas acopladas aquellas que se encuentran unidas a la membrana del terminal sináptico. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-}, cuantificadas 3-4 UNMs por cada ratón. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

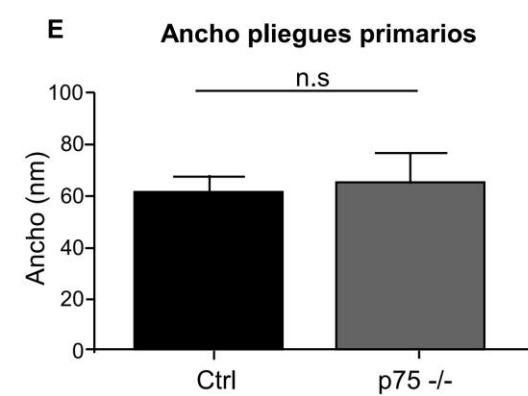
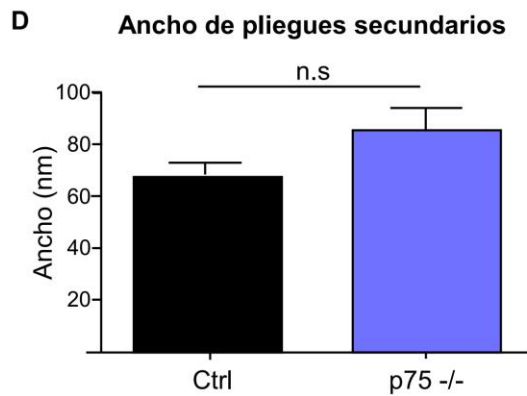
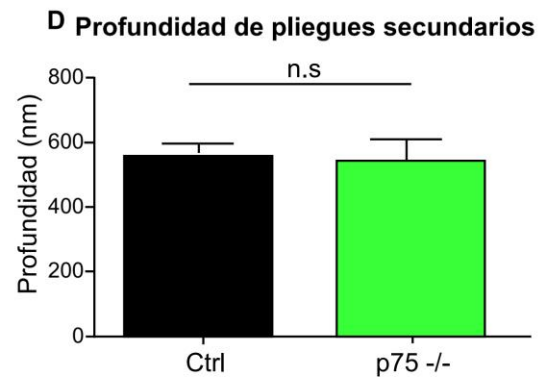
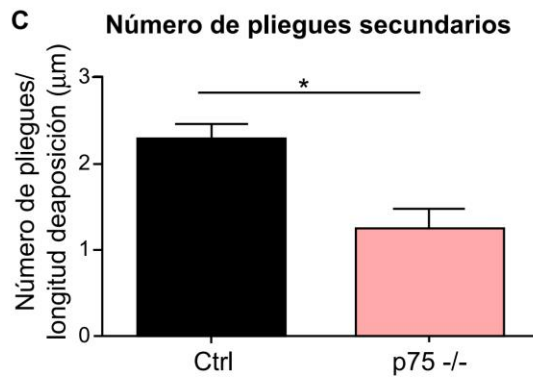
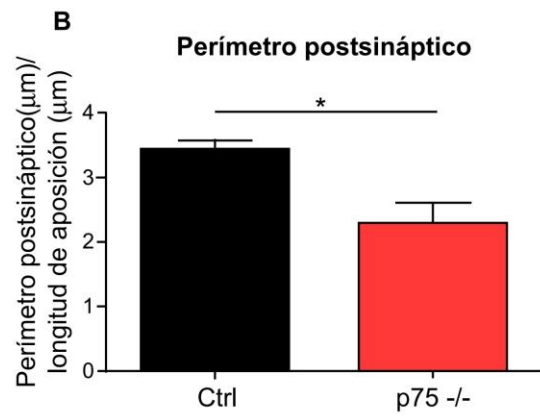
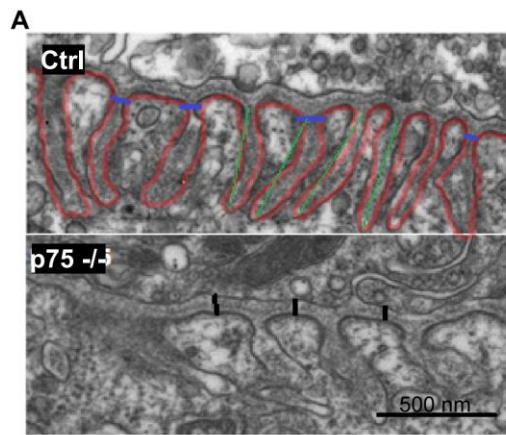


Figura 30: La ausencia del receptor p75 disminuye la complejidad en la ultraestructura del aparato postsináptico de la Unión Neuromuscular.

Músculos diafragma de ratones *p75*^{-/-} y control de 2-4 meses de edad fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión. **(A)** Imagen representativa una UNM de ratones control y *p75*^{-/-}. Barra= 500nm. **(B)** Cuantificación del perímetro postsináptico. Se cuantificó el perímetro de invaginaciones en la membrana muscular llamados pliegues secundarios (línea roja) expresado en relación al largo de aposición entre la zona de contacto pre y postsináptica. **(C)** Cuantificación de número de pliegues secundarios. Fueron cuantificados el número de pliegues expresados en relación al largo de aposición. **(D)** Cuantificación de profundidad de pliegue secundario. Se midió la distancia con una línea recta que existe entre el inicio de la invaginación hasta el punto de termino del pliegue en el músculo (línea verde). **(E)** Cuantificación de ancho de pliegue secundario (línea azul). **(F)** Cuantificación de ancho de pliegue primario (línea negra). El pliegue primario es el espacio sináptico, distancia entre el terminal axónico y la fibra muscular. Las cuantificaciones fueron realizadas utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 3 ratones control y N: 3 ratones *p75*^{-/-}, cuantificadas 3-4 UNMs por cada ratón. (n.s.= diferencias no significativas, * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), test-t no pareado. Fuente: Elaboración propia.

de las invaginaciones o pliegues secundarios (**Figura 30D-E**), así tampoco en el ancho del espacio sináptico o pliegue primario presentes en las UNMs de los animales de ambos genotipos (**Figura 30F**). Por lo tanto, los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} presentan una ultraestructura del aparato postsináptico de la UNM de menor complejidad en relación a los animales control.

En conjunto, el análisis de la ultraestructura del terminal axónico indica que los ratones *p75*^{-/-} presentan alteraciones, evidenciado por una significativa menor disponibilidad de vesículas sinápticas en el terminal neuromuscular, así como defectos en la complejidad del aparato postsináptico, evidenciado por disminución en el número de pliegues secundarios de la membrana muscular de la UNM. Por lo tanto, la ultraestructura de ambos componentes de esta sinapsis se encuentra alterada en los ratones *p75*^{-/-}, posiblemente contribuyendo a los defectos motores, musculares y neuromusculares encontrados en estos

5.11 El aumento en la disponibilidad del neurotransmisor acetilcolina recupera la función motora y fuerza muscular en ratones *p75*^{-/-}.

Los hallazgos del análisis ultraestructural respecto a que los ratones *p75*^{-/-} presentan una reducción en el número de vesículas sinápticas sugieren que existe una menor disponibilidad de neurotransmisor en la sinapsis neuromuscular de estos mutantes. Para abordar funcionalmente esta idea, se realizaron ensayos farmacológicos mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, la cual elimina el exceso de neurotransmisor disponible en la sinapsis, utilizando el

fármaco Bromuro de Piridostigmina. De esta manera, se aumenta la disponibilidad del neurotransmisor en el terminal neuromuscular. Los animales fueron inyectados vía subcutánea diariamente con una concentración de 1 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso y luego fueron desafiados a realizar el test rotarod para evaluar su coordinación motora (**Figura 31**). Los resultados muestran que los ratones *p75*^{-/-} tratados con piridostigmina aumentan su tiempo de latencia en el rotarod en mayor magnitud que los animales control tratados con el fármaco o que los animales tratados con suero fisiológico tanto control como *p75*^{-/-}. A este respecto, el tratamiento con piridostigmina incrementó el tiempo de latencia en el rotarod de los animales mutantes en mayor proporción al incremento observado en los animales control tratados con la droga en los días 2,3 y 5. Aún más interesante, el aumento en la disponibilidad del neurotransmisor incrementó el desempeño en el día 3 en ratones *p75*^{-/-} en $1,86 \pm 0,35$ veces, en relación al tiempo de latencia obtenido el primer día de ensayo, en comparación a los mutantes tratados con suero fisiológico los que presentaron un incremento de $1,29 \pm 0,16$ veces (**Figura 31A**). De manera similar, se administraron concentraciones de 3 $\mu\text{mol/Kg}$ o 5 $\mu\text{mol/Kg}$ del fármaco y se realizó el análisis de fuerza muscular mediante el test de pesos de cadenas. Los resultados indican que los ratones *p75*^{-/-} tratados con 3 $\mu\text{mol/Kg}$ de piridostigmina poseen mayor fuerza muscular en los días 2,3 y 5 de tratamiento registrando un puntaje de $3,83 \pm 0,32$, $3,89 \pm 0,37$ y $4,44 \pm 0,22$ en los días respectivos en comparación a los mutantes tratados con suero fisiológico que presentan un puntaje de $2,51 \pm 0,37$,

2,42 ± 0,34 y 3,18 ± 0,49 (**Figura 31B**). Similares resultados fueron obtenidos con la administración de 5 µmol/Kg de piridostigmina en los mutantes los cuales al cuarto día presentan un incremento significativo de la fuerza muscular en relación a los ratones *p75*^{-/-} control (**Figura 31C**).

Por lo tanto, los resultados indican que al aumentar la disponibilidad de acetilcolina en la sinapsis neuromuscular, existe una recuperación en las alteraciones motora y de fuerza muscular del ratón *p75*^{-/-}.

En su conjunto, los resultados de esta investigación indican que la ausencia del receptor de neurotrofinas *p75* altera la correcta estructura y mantención de la UNM adulta. Los datos sugieren que esta alteración podría ser producida por una disminución en la disponibilidad de vesículas sinápticas en el terminal neuromuscular, afectando con ello el funcionamiento de esta sinapsis. Dichos hallazgos en la ultraestructura de la UNM podrían contribuir al retraso en la maduración de los aparatos postsinápticos, alteraciones motoras, disminución en la fuerza y fatiga muscular, que a su vez probablemente genere fibras musculares de CSA reducido, todas alteraciones observadas en los ratones *p75*^{-/-}.

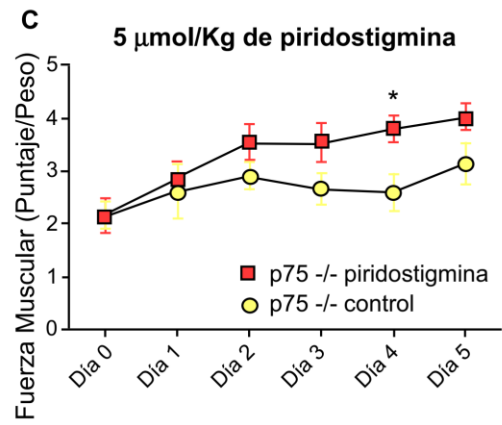
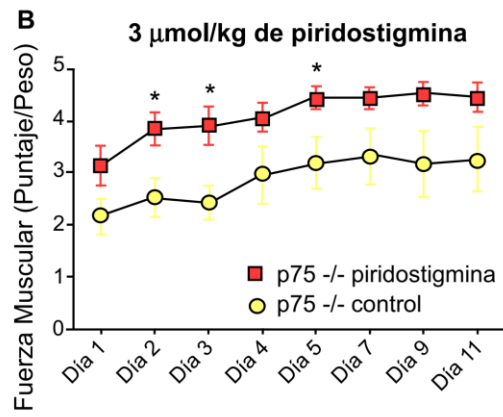
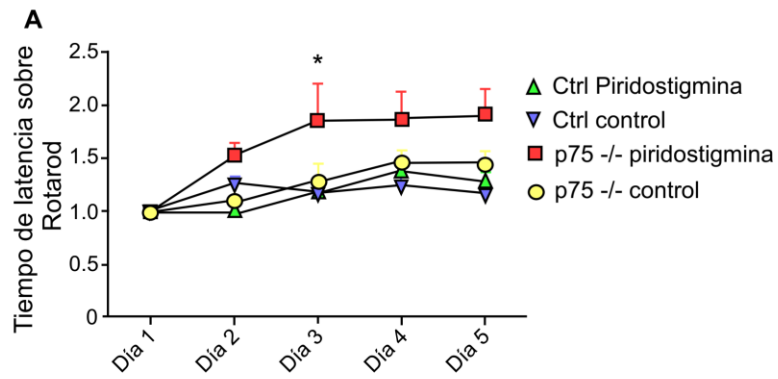


Figura 31: El aumento en la disponibilidad de acetilcolina mejora el rendimiento en actividad motora y fuerza muscular ante la ausencia del receptor $\alpha 7$.

Ratones $\alpha 7^{-/-}$ y control de 2-4 meses de edad fueron analizados mediante ensayos farmacológicos. Se les administró Bromuro de piridostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, mediante inyección subcutánea diaria a concentraciones 1, 3 o 5 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso del ratón, dependiendo de los requerimientos de cada experimento. Luego de 2 horas de la administración del fármaco los ratones fueron analizados mediante ensayos de coordinación en el rotarod o de fuerza muscular mediante el uso de la prueba de pesos de cadenas. **(A)** Análisis de tiempo de latencia en el rotarod posterior a la administración de 1 $\mu\text{mol/Kg}$ de piridostigmina. Los resultados fueron normalizados según los valores obtenidos por cada ratón en el día 1 de tratamiento, siendo obtenidas 8 mediciones por animal en cada día de tratamiento. **(B)** Cuantificación de fuerza muscular posterior a la administración de 3 $\mu\text{mol/Kg}$ o **(C)** 5 $\mu\text{mol/Kg}$ de piridostigmina. Los ratones fueron desafiados a realizar el test de pesos de cadenas. Los resultados representan el promedio \pm SEM de N: 5 ratones control y N: 5 ratones $\alpha 7^{-/-}$. (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$, *** $p < 0,01$), 2-way ANOVA dos colas, en B se utilizó test no pareado de 2 colas. Fuente: Elaboración propia.

6. DISCUSIÓN

La UNM es la conexión especializada entre el terminal axónico de una motoneurona y el músculo esquelético, siendo la integridad de esta sinapsis esencial para traducir la señal del axón motor e iniciar la contracción muscular. Por otra parte, vías de señalización activadas por neurotrofinas han sido vinculadas a la regulación de la transmisión de la sinapsis neuromuscular, así como a la mantención del aparato postsináptico de la UNM (Gonzalez et al. 1999, Kulakowski et al. 2011, Ceni et al. 2014). Sin embargo, la posible función de la señalización dependiente de neurotrofinas sobre la organización estructural y maduración de la UNM adulta no ha sido abordada en profundidad.

En la actualidad, se han descrito 840 enfermedades neuromusculares, de las cuales 418 han sido reportadas como miopatías puras, es decir, mutaciones genéticas presentes en proteínas del músculo (Kaplan et al. 2016, Bonne et al. 2017). Adicionalmente, las mutaciones que producen estas 840 enfermedades han sido descritas en 465 genes, dentro de estos genes están los que codifican para el receptor de neurotrofinas TrkA y al ligando NGF (Bonne et al. 2017). Los resultados encontrados en esta investigación muestran que la ausencia del receptor de neurotrofinas p75 genera severas alteraciones neuromusculares, reflejadas por un retraso en la maduración de la UNM, en conjunto con alteraciones ultraestructurales de esta sinapsis. De esta manera, los ratones *p75^{-/-}* presentan una menor complejidad postsináptica de la UNM, evidenciado por un menor número de pliegues secundarios y perímetro postsináptico.

Adicionalmente, estos mutantes presentan alteraciones en la ultraestructura del terminal axónico motor, reflejado en una significativa reducción en el número de vesículas sinápticas presentes en las UNMs de ratones *p75^{-/-}* en comparación a ratones control. Las alteraciones encontradas en la UNM de los animales nulos para *p75* podrían contribuir a los defectos motores encontrados en estos mutantes, los que correlacionan con defectos en la contracción y debilidad muscular.

Dado que el receptor de neurotrofinas *p75* es capaz de activar una gran diversidad de vías de señalización, gatillando una variedad de efectos biológicos, los resultados obtenidos utilizando como modelo el animal nulo para *p75* constituyen un aporte novedoso para entender algunos procesos fisiológicos en el contexto de la UNM. De esta manera, los efectos que genera la ausencia del receptor *p75* sobre la sinapsis neuromuscular nos permiten avanzar en la comprensión del desarrollo de la sinapsis neuromuscular.

De esta manera, nuestros resultados proponen al receptor de neurotrofinas *p75* como modulador esencial de la estructura de la UNM, permitiendo la maduración de la sinapsis adulta y consiguiente morfofisiología muscular.

6.1 Expresión de *p75* en la UNM adulta

Nuestros resultados indican que en la UNM adulta el receptor *p75* se localiza en la región de la sinapsis neuromuscular (**Anexo 1**), concordante con la localización previamente reportada en los tres componentes de la UNM adulta; músculo,

motoneurona y célula de Schwann (Mousavi 2006, Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2010c), así también como en la región sináptica como extrasináptica del músculo diafragma adulto (Mousavi 2006). Sin embargo, tanto nuestros resultados como los descritos por otros autores muestran una marca difusa para el receptor p75 localizado en UNM, evidencia de una baja expresión de este receptor en esta sinapsis.

Aun cuando los bajos niveles detectados del receptor p75 en la UNM adulta podrían sugerir una participación menor en la morfología y función de esta sinapsis, existen ejemplos de proteínas musculares que aun cuando presentan niveles de expresión bajos en la UNM madura, cumplen un rol fundamental en su mantención. El receptor MuSK se expresa en altos niveles en los estadios embrionarios de formación de la UNM, donde cumple un rol fundamental (Zhang et al. 2004); de hecho, animales nulos para el receptor MuSK no poseen rasgos de diferenciación postsináptica, por lo cual mueren al nacer (DeChiara et al. 1996). La expresión de MuSK decae a niveles prácticamente indetectables desde estadios perinatales hasta la adultez (Valenzuela et al. 1995). Sin perjuicio de ello, se han obtenido evidencias claras de la función de MuSK en la UNM adulta desde patologías. Por ejemplo, se ha descrito que el 85% de los pacientes de la enfermedad autoinmune Miastenia Gravis desarrollan anticuerpos contra AChR, del porcentaje restante, entre 40-70% de esos pacientes desarrollan auto-anticuerpos contra MuSK, lo que resulta en la disrupción de la UNM adulta tanto en su estructura como en su función (Plomp et al. 2015). Una posible función

neuroprotectora de MuSK ha sido analizada en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), enfermedad neurodegenerativa que cursa con denervación de la UNM previo a la muerte de neuronas motoras (Frey et al. 2000, Dupuis and Loeffler 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de MuSK en modelos de ELA resulta en rescate de la inervación de la UNM y, con ello, en un incremento en la función motora (Pérez-García and Burden 2012). Más aun, la administración de un anticuerpo contra MuSK que actúa como agonista de este receptor en ratones modelo de ELA igualmente resultó en un retraso en la denervación de la UNM y en el mejoramiento de comportamiento motor (Cantor et al. 2018).

En base a estos hallazgos y a los resultados de la presente investigación que muestran que la ausencia del receptor p75 genera la disrupción de la ultraestructura y maduración de la UNM, es posible especular respecto a las posibles analogías funcionales entre p75 y MuSK. Por ejemplo, en experimentos de daño por aplastamiento de nervio o denervación la expresión de MuSK es incrementada, decayendo nuevamente una vez que la regeneración fue exitosa (Valenzuela et al. 1995, Bowen et al. 1998). Similares resultados han sido descritos para el receptor de neurotrofinas p75, el cual es altamente expresado en motoneuronas en etapas embrionarias, mientras que postnatalmente disminuye su expresión, siendo detectado sólo en el 2-3% de las motoneuronas adultas (Yan and Johnson 1988, Ernfors et al. 1989). Adicionalmente, el receptor p75 incrementa su expresión frente a daño en el axón motor mediante

aplastamiento o procesos de regeneración muscular (Ernfors et al. 1989, Deponti et al. 2009).

Aun cuando la expresión de p75 es disminuida en los componentes de la UNM adulta, este receptor se encuentra presente en la sinapsis neuromuscular, siendo su presencia esencial para la liberación del neurotransmisor y correcto funcionamiento de la UNM (Garcia et al. 2009, Hurtado et al. 2017, Tomas et al. 2017).

Así, es posible sugerir utilizar la activación de p75 (y/o de la vía de señalización involucrada) como potencial blanco farmacológico en patologías asociadas a la UNM.

6.2 P75 en la regulación de la coordinación motora

Los resultados obtenidos muestran una significativa alteración en la coordinación motora y el equilibrio de ratones *p75*^{-/-}. Los datos obtenidos son concordantes con lo reportado por otros autores respecto al desempeño deficiente en el test de suspensión de la cola (Bogenmann et al. 2011a) y descoordinación motriz y desequilibrio reflejado por un menor tiempo de latencia sobre el rotarod de ratones *p75*^{-/-} en relación al control (Zanin et al. 2016). En esta investigación, se realizó un análisis en mayor profundidad complementando con otros test motores a los ya descritos, en todos los cuales los ratones nulos para p75 presentan un desempeño deficiente. A este respecto, se observó que los mutantes muestran irregularidades en la marcha evaluado por el test de medición de huellas, así

también como falencias en el equilibrio, analizado mediante los test de barras estáticas y barras horizontales, en comparación al control. Adicionalmente, los animales carentes para *p75* muestran un menor desempeño en el test de actividad espontánea en cilindro, indicando defectos tanto motores como sensorimotors. Los datos obtenidos son consistentes con las alteraciones en el comportamiento previamente descritas, en donde los ratones *p75*^{-/-} presentan una disminución en la velocidad de nado en el test *Water maze*. De manera interesante, no sólo se ha reportado deficiencias motoras sino también alteraciones motivacionales, ya que al remover la plataforma en el test *Water Maze*, los ratones *p75*^{-/-} requieren mayor tiempo para encontrar nuevamente la plataforma (Peterson et al. 1999). Conjuntamente al desempeño motor, parámetros como aprendizaje y memoria negativa, también se encuentran afectados en estos animales, evaluado mediante el test de comportamiento de aprendizaje inhibitorio (Peterson et al. 1999). De manera interesante, ha sido reportado que los ratones *p75*^{-/-} presentan un mayor comportamiento exploratorio en test de habituación (Peterson et al. 1999).

Otros modelos de ratones que presentan fallas motoras, debilidad muscular y deficiencias neuromusculares, son aquellos que poseen alteraciones en la vía de señalización mediada por el receptor MuSK. Estos mutantes presentan falencias anatómicas exhibiendo una curvatura en la columna vertebral, cuantificado como *índice de cifosis* (Messeant et al. 2015). Nuestros resultados mostraron que no existe variación en el índice de cifosis en ratones *p75*^{-/-} y por ende, se descarta

que alteraciones anatómicas de curvatura espinal pueda contribuir al fenotipo motor observado en estos animales.

Las explicaciones vinculadas al comportamiento motor de ratones *p75*^{-/-} radican en fallas en el sistema nervioso central. En este contexto, Zanin y colaboradores, demostraron que el receptor de neurotrofinas p75 regula la salida del ciclo celular y con ello la proliferación de células de la capa granular externa (EGL) del cerebelo. Los ratones carentes en p75 presentan un tamaño aumentado del cerebelo en relación a animales control, característica que se mantiene en ratones adultos. Adicionalmente, ratones nulos para el receptor p75 específicamente en células de EGL, presentan un tiempo de latencia intermedio entre los valores obtenidos en el ratón control y *p75*^{-/-} (Zanin et al. 2016), demostrando la contribución del receptor expresado en el cerebelo sobre el comportamiento motor.

Adicionalmente, a nivel central se ha propuesto que la ausencia del receptor p75 en las células hipocámpales contribuye a las alteraciones en el comportamiento (Catts et al. 2008, Colditz et al. 2009). Ratones *p75*^{-/-} presentan una reducción en la neurogénesis de células hipocámpales, lo cual se deba posiblemente a la muerte de precursores neuronales o neuronas inmaduras, resultando en una pérdida neta neuronal (Catts et al. 2008). En este contexto, el tratamiento con el fármaco fluoxetina incrementa el número de células en proliferación en el hipocampo, específicamente en el giro dentado de ratones *p75*^{-/-}. Sin embargo, este tratamiento no aumenta la generación de nuevas células en los mutantes,

como sí sucede en animales control (Colditz et al. 2009). Dichas falencias en el hipocampo podrían explicar el comportamiento alterado de los ratones $p75^{-/-}$. En contraposición a otros autores, el grupo de investigación de Catts y colaboradores no encuentra alteraciones locomotoras en animales nulos para $p75$ en relación a animales control (Catts et al. 2008).

De esta manera, se han descrito antecedentes contrapuestos en literatura respecto al comportamiento motor de ratones $p75^{-/-}$ y otras características **(Tabla 4)**. A este respecto, a la fecha se han descrito 3 ratones $p75^{-/-}$; $p75^{\text{exón III}}$ (Lee et al. 1992) el cual fue utilizado en esta tesis, $p75^{\text{exón IV}}$ (Naumann et al. 2002) y $p75^{\text{exón IV-VI}}$ (Bogenmann et al. 2011b) utilizados en distintas revisiones. Adicionalmente, han sido utilizados diferentes orígenes genéticos en los mutantes antes mencionados, pudiendo contribuir a la variabilidad de los antecedentes reportados.

Nuestros resultados muestran que la ausencia del receptor $p75$ en el modelo utilizado es suficiente para generar un robusto fenotipo motor evaluado en 4 test motores y análisis de la marcha del animal. Estos test evalúan principalmente equilibrio y coordinación motora a diferencia de otras pruebas reportadas previamente como *Water maze*, que adicionalmente evalúan la motivación del animal. Nuestros resultados contribuyen a dar una explicación a la alteración de la coordinación motora de ratones $p75^{-/-}$ originado en el sistema nervioso periférico, demostrando marcadas deficiencias en la ultraestructura de la sinapsis

Ensayo	Autores	Resultados	Ensayo nuestro	Resultados
Rotarod (motor)	Reddypalli 2005 Zanin 2016	-Alteración en test (dato no mostrado) - Disminución tiempo latencia	-Rotarod	Disminución tiempo latencia
Water maze Open Field (motor)	Peterson 1999 Catts 2008	- Disminuida velocidad de nado. No hay diferencias en open Field -No hay diferencias locomotoras	-Barra Triple Horizontal -Actividad espontánea en cilindro -Barras estáticas	Disminuida actividad motora
Hot plate (S. Calor) Tail Flick	Bergmann 1997 Lee 1992 Bergmann 1998	Disminuida sensibilidad al calor	-Hot plate	Sensibilidad al calor disminuida
Von frey (S.Mecánica)	Bergmann 1997	Disminuida sensibilidad mecánica	-Von Frey	No hay diferencias
Wire grip (fuerza)	Reddypalli 2005 Catts 2008	Debilidad muscular Falla en el test	-Reja invertida -Test de pesos -Propiedades contráctiles	Debilidad muscular

Tabla 4: Antecedentes respecto a coordinación motora y fuerza muscular en ratones p75 -/-. Resumen de los antecedentes antes descrito en literatura en relación a los análisis de comportamiento motor y fuerza muscular realizados en este trabajo. Fuente: Elaboración propia en base a datos obtenidos en publicaciones citadas en la tabla.

neuromuscular y alteración en la progresión de la maduración del aparato postsináptico de la UNM encontrada en estos animales.

6.3 Efectos del receptor p75 sobre el músculo

Las falencias en la coordinación motora encontrada en los ratones nulos para p75 se acompañaron con debilidad muscular en estos mutantes. Nuestros resultados son concordantes con los reportados previamente, los que señalan que ratones *p75*^{-/-} obtienen un bajo desempeño en test de fuerza muscular realizados a edades de entre 0 a 913 días (Reddypalli et al. 2005). Adicionalmente, nuestros resultados muestran una disminución tanto en la fuerza de contracción muscular isométrica como en la fuerza tetánica máxima en músculo Tibial anterior aislado, analizado por registros electrofisiológicos de propiedades contráctiles musculares. Dichos análisis fueron realizados mediante estimulación eléctrica directa en el músculo, dando cuenta de defectos intrínsecos de este tejido.

Dentro de los parámetros que podrían afectar la contracción muscular, se encuentra el tipo de fibra muscular, masa y área de sección transversal (CSA) de las fibras musculares (Maurissen et al. 2003, Jones et al. 2008). Nuestros resultados no muestran alteraciones musculares en animales jóvenes ni envejecidos en los análisis histológicos, variación en la cantidad de proteínas estructurales presentes en los músculos, presencia de fibrosis o regeneración muscular. A este respecto, estudios previos sugieren que el receptor p75 promueve procesos de regeneración muscular, donde la inyección de un péptido que compite con el ligando NGF por el sitio de unión a p75, retrasa la regeneración en músculo Tibial anterior luego de daño inducido (Deponti et al.

2009). Adicionalmente, se ha propuesto que p75, el cual es altamente expresado en células satélite regula procesos de regeneración muscular (Deponti et al. 2009, Colombo et al. 2011). A este respecto, nuestros resultados indican que la ausencia del receptor *per se* no promueve ciclos de degeneración/regeneración muscular evaluada por la aparición de núcleos centrales en las fibras musculares. Adicionalmente, no se encontraron diferencias en la masa ni en el tipo de fibras que componen el músculo Tibial anterior entre ambos genotipos. Estos datos son consistentes con los antecedentes previamente descritos que señalan que los ratones *p75*^{-/-} no presentan diferencias en tono muscular, peso o tamaño de los músculos en comparación a los controles (Catts et al. 2008). De manera interesante, encontramos una significativa reducción en el CSA tanto de fibras lentas como rápidas, alteración que contribuye a la debilidad muscular observada en los animales nulos para p75, siendo la fuerza muscular directamente dependiente de este parámetro (Jones et al. 2008).

Una condición que resulta en un menor CSA de las fibras musculares es alguna alteración en la miogénesis, sin embargo, bajo nuestros parámetros experimentales esta causa fue descartada. El rol de p75 sobre la miogénesis ha sido controversial. Por una parte, se ha descrito que la disminución de actividad de p75, tanto mediante el uso de un anticuerpo que bloquea su función, como mediante el uso de un péptido que compite por su unión a NGF e inhibe su función, o bien por la disminución de su expresión usando un siRNA en cultivo primario de mioblastos, resultó en una disminución en el índice de fusión de los

mioblastos para formar miotubos (Deponti et al. 2009, Colombo et al. 2011). Por otra parte, la sobre expresión del receptor con adición del ligando NGF tiene un efecto de represión de la diferenciación miogénica en mioblastos C2C12 (Seidl et al. 1998, Rende et al. 1999). Al respecto, se ha propuesto que p75 promueve la supervivencia y proliferación celular en mioblastos (Reddy et al. 2005) y conjuntamente con NGF regula propiedades de adhesión y/o arquitectura del citoesqueleto (Deponti et al. 2009).

Al evaluar miogénesis en cultivos primarios de mioblastos obtenidos de células satélites desde ratones *p75*^{-/-} y control, no encontramos diferencias en la capacidad de formar miotubos, sugiriendo un rol compensatorio en los ratones *p75*^{-/-} en la miogénesis. Situación similar de efectos compensatorios ha sido sugerida en el proceso de competición y retracción axonal en los primeros días de maduración postnatal de la UNM, donde p75 junto al ligando proBDNF regulan la retracción del axón motor débil, permitiendo la mono-inervación de los aparatos postsinápticos (Wang and Poo 1997, Yang et al. 2009, Je et al. 2012, Je et al. 2013). Sin embargo, el ratón *p75*^{-/-} compensa la carencia del receptor, debido a que no presenta alteraciones en la retracción axonal. El efecto compensatorio es mediado por el receptor sortilina, quien actúa como co-receptor para señalizar junto a p75. De esta manera, la inhibición de sortilina mediante la inyección de un péptido que inhibe la unión al ligando con este receptor en ratones *p75*^{-/-} resulta en un incremento en la poli-inervación de las UNM a p14. Por lo tanto, la

acción conjunta de ambos receptores es requerida para la retracción axonal de los pretzels poli-inervados (Je et al. 2013).

La expresión del receptor p75 muscular ha sido controversial. Por una parte, algunos autores señalan que el receptor es altamente expresado en mioblastos C2C12, pero disminuye luego de la fusión de los mioblastos para dar origen a los miotubos, siguiendo un patrón de expresión similar al del ligando NGF (Erck et al. 1998, Seidl et al. 1998). En contraposición, otros autores señalan que p75 se expresa en músculo adulto (Chevrel et al. 2006, Mousavi 2006, Garcia et al. 2010e). Más aún, se ha descrito que p75 aumenta su expresión de manera transiente luego de inducir la formación de miotubos en cultivos de mioblastos humanos y que dicho incremento regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo y contracción muscular (Colombo et al. 2011). En este contexto, el ligando BDNF promueve a los mioblastos a salir del ciclo celular e iniciar el programa de diferenciación miogénica a través de p75 (de Perini et al. 2017).

6.4 Función de p75 en el comportamiento sensorial

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el receptor de neurotrofinas p75 controla la sensibilidad térmica, donde la ausencia del receptor resulta en hipoalgesia al calor, al mismo tiempo que se detectó hiperalgesia al frío. Sin embargo, no se encontraron alteraciones en la sensibilidad mecánica de estos mutantes (**Tabla 4**).

Las neurotrofinas han sido involucradas ampliamente en la percepción del dolor. Específicamente, el ligando NGF produce hiperalgesia térmica y mecánica. Al respecto, al inyectar este ligando en la superficie plantar de ratas se observa que los animales presentan tanto alodinia, que significa que un estímulo que no debiese producir dolor sí lo genera, así también como hiperalgesia a estímulos mecánicos, detectada por el test Von frey. De manera interesante, previo al tratamiento con NGF, la inyección de un anticuerpo contra el receptor p75 previene el efecto de hiperalgesia producido tanto por NGF como por proNGF (Khodorova et al. 2013). La activación de p75, a su vez, produce la activación de la vía de esfingomielina y permite la liberación de ceramidas (Dobrowsky et al. 1994). Esta vía está relacionada con la hiperalgesia inducida por NGF, debido a que actúan como mediadores esfingomielinasa neuronal nSMASE, ceramidas, así como una proteína quinasa atípica (PKMf), los cuales al ser inhibidos previenen la hipersensibilidad mecánica aguda inducida por NGF (Khodorova et al. 2013).

De manera interesante, la inyección de un anticuerpo bloqueador contra p75 no tiene efecto sobre la respuesta mecánica *per se* (Khodorova et al. 2013), dato consistente con nuestros resultados, que no exhiben diferencias en la sensibilidad mecánica en los ratones nulos para p75.

En contraposición, se ha reportado que ratones *p75*^{-/-} presentan un aumento en los umbrales a estímulos nocivos mecánicos analizado mediante el test Von Frey (Bergmann et al. 1997). Concordante con estos antecedentes, mediante registros

neurofisiológicos en fibras aferentes de piel se determinó que el receptor de neurotrofinas p75 es requerido para la traducción de estímulos mecánicos en fibras tipo C, que son fibras no mielínicas, mientras que ratones *p75*^{-/-} presentan una sensibilidad normal en nociceptores de fibra tipo A, fibras que son mielínicas (Stucky and Koltzenburg 1997). A este respecto, el número de nociceptores en ratones *p75*^{-/-} se encuentra reducido, concordante con una disminuida sensibilidad al calor (Stucky and Koltzenburg 1997). A su vez, el ligando NGF también produce hiperalgesia térmica, provocando una disminución en el tiempo de latencia al calor (Khodorova et al. 2013, Mills et al. 2013).

Estos antecedentes son concordantes con nuestros resultados que muestran un mayor tiempo de latencia obtenido en el test de calor en ratones *p75*^{-/-}, datos que fueron reportados por otros autores (Lee et al. 1992, Bergmann et al. 1997).

Los resultados obtenidos en esta investigación respecto al incremento en la sensibilidad al frío encontrada en los animales nulos para p75 son contrapuestos con otros estudios que señalan que no se encontraron diferencias en la sensibilidad al frío en fibras mielínicas aferentes cutáneas tipo A entre ratones *p75*^{-/-} en relación a animales control (Stucky and Koltzenburg 1997).

De manera interesante, los animales nulos para p75 presentan un grosor disminuido de la piel en un 31%, una reducida inervación en la epidermis y una escasa inervación que rodea a las glándulas sudoríparas (Bergmann et al. 1997). Esta escasa inervación cutánea podría explicar la menor sensibilidad térmica reportada en nuestro estudio, conjuntamente con la reducción en el número de

neuronas sensoriales provenientes del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y del ganglio Trigeminal (Lee et al. 1992, Davies et al. 1993, Lee et al. 1994a, Lee et al. 1994b).

Por otra parte, se ha descrito que en el proceso de hiperalgesia térmica y mecánica inducida por NGF no sería relevante la modulación del receptor p75, sino más bien sería fundamental el receptor TrkA. En este contexto, la administración sistémica de NGF induce hiperalgesia mecánica y térmica en similar magnitud en ratones control y *p75*^{-/-}, sugiriendo que el receptor TrkA es suficiente para inducir hiperalgesia mediada por NGF (Bergmann et al. 1998). En contraposición, otros autores señalan que el receptor p75 sería el modulador de esta hiperalgesia, pues la inyección de una forma no hidrolizable de proNGF, el cual sólo se podrá unir al receptor p75, resulta en un aumento en la sensibilidad mecánica (Khodorova et al. 2013). Sin embargo, la inyección de un anticuerpo contra p75 previo al tratamiento con NGF no previene la hiperalgesia térmica, mientras que acorta el tiempo de duración de la hipersensibilidad (Khodorova et al. 2017). Además, el tratamiento con un inhibidor de TrkA previene la hiperalgesia térmica inducida por NGF en tiempos cortos luego del tratamiento con el ligando, para finalmente retornar a las 4 horas a la hiperalgesia normal (Khodorova et al. 2017).

Por lo tanto, la participación de los receptores p75 y TrkA sería temporal en la hiperalgesia inducida por NGF, aun cuando su rol en este proceso continúe siendo controversial.

Más aun, se ha reportado al receptor p75 como modulador del dolor en inflamación e injuria causada por la avulsión del plexo braquial, donde el tratamiento con un anticuerpo contra el receptor p75 produce una reducción en la hiperalgesia mecánica y el dolor neuropático (Iwakura et al. 2010, Matsuura et al. 2013, Kobayashi et al. 2015).

En base a los antecedentes antes expuestos, se hace fundamental dilucidar la participación que posee el receptor p75 en la sensibilidad mecánica y térmica, debido a que diversas enfermedades han sido vinculadas a un aumento o disminución en la expresión de NGF cutánea, desencadenando diversas patologías como neuropatía genética, diabetes neuropática, neuropatía traumática y dolor (Anand 2004).

Por lo tanto, nuestros resultados son concordantes con los datos obtenidos previamente respecto a la menor sensibilidad al calor encontrada en ratones *p75*^{-/-} y aportan nuevos antecedentes respecto a un hipersensibilidad al frío encontrada en estos mutantes.

6.5 Rol de p75 en el control funcional y arquitectura de la sinapsis neuromuscular

Al analizar la función neuromuscular mediante el registro de electromiografías, encontramos que los ratones *p75*^{-/-} no presentan diferencias en el tiempo de latencia ni relajación de la contracción muscular. Sin embargo, encontramos una disminución en el tiempo requerido en generar la máxima contracción del

músculo Gastrocnemio, quedando descartado que esto se deba a una alteración en el tipo de fibras que componen el músculo, debido a que previamente se demostró que no existe variación en este parámetro. De manera interesante, nuestros resultados indican que los ratones nulos en p75 se fatigan antes que los animales control luego de la aplicación de un estímulo tetánico de 100 Hz. Estos resultados son concordantes con los datos encontrados en ratones NT4-/- los que igualmente presentan fatiga muscular (Belluardo et al. 2001), siendo esta neurotrofina implicada en la actividad sináptica neuromuscular (Funakoshi et al. 1995).

En este trabajo de tesis, se llevó a cabo la primera caracterización de la posible función de p75 en la organización estructural y maduración del aparato postsináptico en la UNM adulta. Análisis morfológicos de la UNM en adultos muestra un significativo retraso en la progresión de la maduración normal del aparato postsináptico en ratones nulos en p75. Análisis morfológicos en animales envejecidos permiten descartar que los fenotipos observados se deban a una detención de la maduración del dominio postsináptico de la UNM, corroborando que ellos se deben a un retraso en este proceso. Estos datos son concordantes con el menor área, volumen, superficie y número de fragmentos que componen el aparato postsinápticos de los ratones *p75-/-*, debido a que al progresar la maduración de los pretzels, estos aumentan tanto en tamaño como en complejidad (Sanes and Lichtman 1999, Marques et al. 2000, Bolliger et al. 2010).

De manera interesante, otros receptores de neurotrofinas han sido involucrados en la regulación de la maduración de la UNM. En este contexto, se ha reportado que la disminución de la vía de señalización mediante el receptor TrkB produce la fragmentación del aparato postsináptico (Gonzalez et al. 1999, Kulakowski et al. 2011), mientras que un aumento en esta vía de señalización en animales *TrkB.t1-/-*, variante trunca endógena del receptor TrkB, produce agregados del AChR de mayor tamaño que los controles, favoreciendo la agregación del AChR (Dorsey et al. 2012). Adicionalmente, los ratones *NT4-/-*, ligando del receptor TrkB, también presentan fragmentación de los pretzels en la UNM (Belluardo et al. 2001). Estos datos sugieren que el receptor de neurotrofinas TrkB promueve una retención de la progresión de la maduración de la UNM, efecto contrapuesto al rol que sugerimos que cumple p75 sobre el control de la maduración de la sinapsis neuromuscular.

De manera interesante, similares efectos contrapuestos que proponemos que realizan los receptores p75 y TrkB han sido ampliamente reportados en el sistema nervioso central. A este respecto, BDNF regula el crecimiento de neuritas mediado por ambos receptores, resultando la señalización mediada por TrkB en el crecimiento de las dendritas, mientras que la señalización mediada por p75 en la inhibición de este crecimiento (Gonzalez et al. 2016).

Las neurotrofinas también han sido involucradas en la especialización postsináptica en el sistema nervioso central, donde el tratamiento con BDNF de cultivos de neuronas piramidales produce un aumento en el número y localización

de los agregados postsinápticos de receptores de NMDA (Elmariah et al. 2004). A su vez, el tratamiento con BDNF en neuronas hipocampales aumenta el número de agregados de receptores GABA_A postsinápticos. En ambos casos, la interrupción de la señalización mediada por TrkB mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra este receptor o adenovirus para su variante trunca, resulta en una dramática disminución y deslocalización de estos receptores postsinápticos (Elmariah et al. 2004). En concordancia, se ha descrito que la señalización mediada por NGF/TrkA en endosomas que viajan desde el axón, promueven la densidad de proteínas postsinápticas (PSD) en dendritas. En contraposición al efecto antes descrito para TrkA, p75 restringe la formación de PSD (Sharma et al. 2010), apoyando la idea del rol antagónico antes mencionado entre ambos receptores de neurotrofinas.

En la sinapsis neuromuscular, también las neurotrofinas han sido relacionadas a promover indirectamente la disponibilidad de los receptores postsinápticos de esta sinapsis. De esta manera, los ligandos NT3, NT4 y GDNF son liberados por el músculo y promueven la expresión del ARNm y de la proteína Neuregulina (NRG) en la motoneurona en co-cultivos neurona-músculo. Por su parte, NRG es liberada por el axón motor y estimula la síntesis de la subunidad α del AChR en la fibra muscular (Loeb and Fischbach 1997). Adicionalmente, la actividad eléctrica promueve la expresión de neurotrofinas musculares que son, a su vez, necesarias para la expresión de NRG en la motoneurona y su consiguiente

liberación en la sinapsis, permitiendo la mantención de la arquitectura de la UNM (Loeb et al. 2002).

¿Cómo la actividad eléctrica podría modular la estructura del aparato postsináptico de la UNM? Al respecto, se ha descrito que la disminución de actividad de la sinapsis neuromuscular mediante el tratamiento con curare, un antagonista de AChR, produce una reducción de dos veces en el tamaño de los agregados del AChR en embriones de pollo (Loeb et al. 2002). Adicionalmente, la denervación del músculo detiene la maduración de la UNM (Marques et al. 2000). Estos datos son consistentes con los resultados de esta tesis que evidencian una reducción en el tamaño, volumen y superficie de los pretzels en ratones *p75*^{-/-}. Antecedentes previos indican que *p75* es necesario para la correcta liberación del neurotransmisor ACh en la sinapsis neuromuscular (Garcia et al. 2009, Garcia et al. 2010d, Garcia et al. 2011, Hurtado et al. 2017). Por lo tanto, la probable disminución en la actividad sináptica de estos mutantes podría contribuir a la menor complejidad de los agregados del AChR encontrada en estos animales.

El retraso en la progresión de la maduración del aparato postsináptico encontrado en los ratones *p75*^{-/-} es concordante con una menor complejidad ultraestructural del componente postsináptico. Nuestros resultados muestran menor número de invaginaciones en la membrana muscular, o pliegues secundarios, lo que se traduce en un menor perímetro postsináptico. Al respecto, los pliegues en la membrana de la fibra muscular esquelética en la UNM se extienden hacia el

citoplasma e incrementan el área postsináptica en un factor de 2-8 veces (Slater 2017). Las invaginaciones favorecen la generación del potencial de acción y con ello la eficiente contracción muscular debido a que en los valles de estos pliegues se localizan los canales de sodio dependientes de voltaje $Na_{v1.4}$, los cuales permiten la despolarización de membrana y generación del potencial de acción (Slater 2008). Por lo tanto, un mayor número de pliegues favorece la densidad de $Na_{v1.4}$ presentes en la sinapsis neuromuscular. A su vez, la geometría de las invaginaciones de membrana favorecen *per se* la generación del potencial de acción debido a que ellos generan mayor cantidad de citoplasma y con ello una alta resistencia eléctrica, favoreciendo la propagación de la despolarización en la membrana (Slater 2008). Por lo tanto, la menor complejidad ultraestructural postsináptica encontrada en la UNM de ratones *p75*^{-/-} sugiere una capacidad reducida para despolarizar la membrana y con ello gatillar la contracción muscular. Adicionalmente, en las crestas de los pliegues se localizan los agregados del AChR, inmediatamente opuestos a las zonas activas (York and Zheng 2017). Por lo tanto, un menor número de estos pliegues también se traduce en una menor densidad de AChRs postsinápticos disponibles en la UNM. Similares hallazgos a los encontrados en el mutante *p75* han sido reportados en pacientes con la patología neuromuscular *Myasthenia Gravis*, en la cual se observa una disrupción de los pliegues postsinápticos, presentando un número reducido de invaginaciones y por lo tanto, generando una menor disponibilidad de los canales de Sodio dependientes de voltaje y de AChR, resultando en una menor

eficiencia de transmisión sináptica (Slater 2008, Plomp et al. 2015). En concordancia, los pacientes que poseen esta patología, de igual manera a lo encontrado en ratones carentes de p75, presentan debilidad muscular (Plomp et al. 2015). Por lo tanto, alteraciones en la ultraestructura de la UNM generan deficiencias funcionales de esta sinapsis.

Por otra parte, a pesar de las alteraciones morfológicas del aparato postsináptico encontradas en los ratones *p75^{-/-}*, no se encontraron diferencias en la localización de proteínas postsinápticas de andamiaje como p35 y Nestina **(Anexo 2)**.

Por otra parte, no se encontraron alteraciones en la formación y tamaño de agregados del AChR en cultivos primarios de mioblastos provenientes desde células satélites desde músculos de ratones *p75^{-/-}* y control. Estos resultados sugieren que la ausencia de p75 en células satélite no genera alteraciones en la formación de agregados complejos de AChR, similares a los observados *in vivo*. Por lo tanto, el receptor de neurotrofinas p75 expresado en el músculo, no sería requerido para modular el ensamblaje de los AChR en la membrana postsináptica, así tampoco regularía la capacidad de agregación de los AChR. Estos resultados son relevantes, debido a que con ello se descarta una contribución directa de p75 muscular sobre el proceso de formación de los agregados de AChR.

Otra estrategia experimental utilizada para discriminar la contribución del receptor p75 expresado en algún tejido en particular es mediante el uso de animales

transgénicos tejido específico, alternativamente es posible analizar la contribución de ambos componentes de la sinapsis neuromuscular mediante la realización de co-cultivos entre células musculares y motoneuronas. En esta tesis montamos la técnica de co-cultivos compartimentalizados en cámaras de silicona entre un explante de médula espinal y cultivos primarios de miotubos, permitiendo la formación de UNMs *in vitro* (Ionescu et al. 2016). Dicha técnica permite que las prolongaciones de las motoneuronas de los explantes crezcan dirigidas hacia el cultivo de miotubos primarios (**Anexo 3A-B**), generando en las zonas de contacto la formación de agregados del AChR, similar a una UNM *in vivo* (**Anexo 3C**). Se observa además, que proyecciones neuronales son positivo para el marcador ChAT, indicando que se trata de neuronas colinérgicas, posiblemente motoneuronas (**Anexo 3C**). Futuros trabajos permitirán abordar en más profundidad la contribución del receptor p75 expresado en motoneuronas y/o en fibras musculares sobre la formación y mantención de los agregados de AChR mediante el uso de tejidos del animal nulo para p75.

Por lo tanto, dado los resultados obtenidos mediante cultivos primarios, estos datos sugieren que p75 de origen muscular no participaría directamente en la formación ni complejidad morfológica de los agregados de AChR sobre la membrana muscular.

6.6 Función del receptor p75 en la mielinización y estructura del terminal presináptico de la UNM

El rol del receptor p75 en la mielinización por parte de las células de Schwann ha sido controversial, donde algunos autores señalan que este receptor es necesario para la correcta mielinización (Cosgaya et al. 2002, Song et al. 2006), mientras que otros autores no observan diferencias en el grosor de la vaina de mielina de axones regenerados de ratones *p75*^{-/-} (Ferri et al. 1998). Mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión, nuestros resultados indican que, respecto a animales control, no existe diferencia en el g-ratio de axones periféricos en ratones *p75*^{-/-}, indicador de mielinización axonal calculado mediante la relación matemática entre el diámetro del axón en relación al diámetro de la fibra con mielina.

Respecto al terminal presináptico, nuestros resultados no mostraron diferencias en el perfil de inervación de las UNMs del músculo LAL ni en la aposición pre/post sináptica de UNMs de ratones *p75*^{-/-} respecto al control. De esta manera, nuestros análisis sugieren que las alteraciones ultraestructurales encontradas en los mutantes y posibles fallas en la transmisión sináptica no se atribuyen directamente a alteraciones en la aposición del axón motor con los AChR ni con denervación, como sucede en otros contextos patológicos (Pérez-García and Burden 2012, Chand et al. 2017).

De forma interesante, es posible detectar pretzels poli-inervados en edad adulta en algunos ratones *p75*^{-/-} (**Anexo 4**), concordante con el rol que cumple este

receptor junto a proBDNF en controlar la retracción axonal durante el periodo de poli-inervación de la UNM (Yang et al. 2009, Je et al. 2012, Je et al. 2013). Estos hallazgos fueron inesperados debido a que reportes previos señalan que el ratón *p75*^{-/-} posee una correcta mono-inervación de la UNM a los 14 días postnatales, compensando la carencia de p75 (Je et al. 2013). Estos datos son consistentes con los encontrados en esta investigación respecto a la maduración retrasada de los aparatos postsinápticos en UNMs de ratones *p75*^{-/-}, en concordancia con el rol que sugerimos de p75 el cual proponemos es favorecer la maduración de la UNM adulta.

Por otra parte, encontramos que el número de axones presentes en cortes transversales de nervio ciático es significativamente menor en comparación a los ratones control, así también como la densidad de axones que componen el nervio. Estos datos son concordantes con antecedentes previos encontrados en ratones *p75*^{-/-} los cuales presentan un número menor de axones motores totales que componen el nervio tibial mediante el marcaje retrógrado, así como una disminución de motoneuronas faciales (Ferri et al. 1998, Boyd and Gordon 2001). Adicionalmente, los ratones carentes en p75 poseen un menor número de neuronas sensoriales que provienen de los DRG (Lee et al. 1992). Concordantemente, encontramos que el área de sección trasversal del nervio es de menor tamaño, resultados similares a reportes previos (Song et al. 2006). Luego del análisis ultraestructural de la UNM, observamos alteraciones presinápticas significativas en ratones *p75*^{-/-}. Se observó una reducción en el

número de vesículas sinápticas en el terminal del axón motor de animales nulos para p75 a un valor cercano a la mitad de lo observado en los ratones control. Adicionalmente, encontramos una significativa reducción en el número de zonas activas (ZA), así como en la densidad de vesículas disponibles para la liberación presentes en las ZAs de ratones carentes en p75. Estos resultados sugieren que existe una menor disponibilidad del neurotransmisor ACh en la UNM, que conjuntamente con el menor número de invaginaciones postsinápticas encontradas en los ratones *p75*^{-/-} resultan en una función sináptica neuromuscular deficiente.

En condiciones fisiológicas, el número de ZAs aumenta de forma lineal con el tamaño de la sinapsis neuromuscular; por lo tanto, la densidad de ZAs no cambia con el transcurso de la edad. De igual manera, la densidad de vesículas disponibles para la liberación en las ZAs también aumenta según incrementa el tamaño de la sinapsis y la edad (Cano et al. 2013, Cano and Tabares 2016). Por lo tanto, es necesaria una densidad constante de vesículas y ZAs en la sinapsis neuromuscular, no siendo así en los ratones *p75*^{-/-} donde los análisis realizados en esta investigación fueron expresados en relación al tamaño de la sinapsis, demostrando que existe una significativa reducción de la densidad de vesículas sinápticas en la UNM presentes en estos mutantes.

Más aún, nuestros resultados muestran que al aumentar la disponibilidad del neurotransmisor mediante el uso de un fármaco inhibidor de la acetilcolinesterasa, enzima que degrada a ACh en el espacio sináptico de la

UNM, se obtiene una recuperación de la coordinación motora y fuerza muscular en ratones *p75*^{-/-}, sugiriendo que la menor disponibilidad del neurotransmisor contribuye a las alteraciones motoras encontradas en estos mutantes.

Estos interesantes hallazgos sugieren que el receptor de neurotrofinas p75 regula la disponibilidad de vesículas sinápticas en la sinapsis neuromuscular, controlando con ello la disponibilidad del neurotransmisor y el correcto funcionamiento de la sinapsis.

6.7 Función de neurotrofinas en la regulación de proteínas de vesículas sinápticas

Se ha reportado la participación de las neurotrofinas en la regulación de la expresión y localización de proteínas de vesículas sinápticas o que componen la membrana presináptica en el sistema nervioso central. Al respecto, la exocitosis del neurotransmisor requiere de un conjunto de proteínas llamadas SNARE (*soluble-N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*). Las 3 principales proteínas necesarias para este proceso son sinaptobrevina, proteína que forma la vesícula sináptica, syntaxina1 y SNAP-23, todas ellas proteínas de membrana. La formación de este SNARE ternario permitirá la fusión de membranas y liberación del neurotransmisor (Darios et al. 2009). En este contexto, lípidos como esfingosinas permiten que sinaptobrevina forme el complejo ternario (Darios et al. 2009).

La incubación de cultivos de neuronas hipocampales con BDNF incrementa 2 veces los niveles de proteínas integrales de la membrana de vesículas sinápticas como sinaptofisina y sinaptobrevina, mientras que la incubación con este ligando produce un incremento de 5 veces en la cantidad de sinaptotagmina, proteína de vesícula sináptica que censa el calcio que permite la fusión de las vesículas con la membrana presináptica (Tartaglia et al. 2001). Adicionalmente, los cambios en los niveles de proteínas no están asociados a la síntesis de nuevas proteínas, debido a que la incubación de estos cultivos con un inhibidor de la síntesis proteica no altera el incremento inducido por BDNF de sinaptofisina ni sinaptobrevina (Tartaglia et al. 2001). Por otra parte, el tratamiento con BDNF o NT3 en neuronas espinales causa una marcada segregación de la proteína sinaptofisina en varicosidades, efecto que es prevenido mediante el tratamiento con el inhibidor de receptores Trk, K252a, sólo en el caso de NT3 (Wang et al. 1995). A partir de estos resultados, es posible plantear que el receptor p75, el cual señala conjuntamente con TrkB en respuesta a BDNF, podría participar en regular la localización de sinaptofisina, concentrándola en los terminales presinápticos en cultivos de neuronas espinales.

Adicionalmente, la cantidad de proteínas sinaptobrevina y sinaptofisina fue reducida en fracciones sinaptosomales del hipocampo de ratones heterocigotos para BDNF. Al respecto, el tratamiento con BDNF sobre cultivos de neuronas hipocampales provenientes del ratón *BDNF*^{+/-} revierte este efecto, incrementando los niveles de las proteínas sinaptobrevina y sinaptofisina (Pozzo-

Miller et al. 1999). En concordancia con el rol propuesto para las neurotrofinas en la regulación de la expresión de proteínas que componen las vesículas sinápticas, los ratones *TrkB*^{-/-} presentan una reducción de las proteínas sinaptofisina, sinapsina I y sinaptotagmina en el hipocampo. Proteínas pertenecientes a la membrana sináptica t-SNARE como SNAP-25 y sinapsina I, esenciales para la exocitosis dependiente de calcio, presentan una reducción dramática en los ratones nulos para TrkB. Adicionalmente, los niveles de la proteína pequeña de unión a GTP, Rab3, la que regula la fusión de vesículas a la membrana presináptica, de igual manera se encuentra disminuida en estos mutantes (Martinez et al. 1998). Concordantemente, ratones nulos para el receptor TrkC presentan una moderada reducción de las proteínas sinaptotagmina, sinaptobrevina 2, syntaxina I, así como una marcada reducción en la expresión de sinapsina I (Martinez et al. 1998).

Estos antecedentes sugieren que la señalización mediada por BDNF modifica el procesamiento postranscripcional o redistribución de las distintas reservas de las proteínas analizadas (Tartaglia et al. 2001), modulando el ensamblaje o estabilización de las vesículas sinápticas mediante las modificaciones postraduccionales de las proteínas del complejo SNARE (Pozzo-Miller et al. 1999, Tartaglia et al. 2001, Elmariah et al. 2004).

Por otra parte, las neurotrofinas también han sido asociadas a la fusión de las vesículas en el terminal nervioso, facilitando la liberación del neurotransmisor. A este respecto, distintos grupos de vesículas se encuentran en los terminales

axónicos. Vesículas en *docking*, las cuales se definen como vesículas a una distancia de 50nm de la zona activa, mientras que el resto de vesículas pertenecientes al terminal nervioso son definidas como la agrupación de vesículas de reserva (Tartaglia et al. 2001). Otra agrupación es definida inmediatamente continua a la zona activa, hasta 480nm por sobre esta, definida como las vesículas listas para ser liberadas o parte del *RRP* (Poort et al. 2016). Respecto a estas agrupaciones de vesículas sinápticas, la incubación con el ligando BDNF en cultivos hipocampales, incrementa el número de vesículas en *docking* por ZA. Este efecto es bloqueado por el inhibidor de receptores Trk K252a, sugiriendo que el incremento de las vesículas en contacto con la membrana presináptica es mediado al menos por el receptor TrkB (Tyler and Pozzo-Miller 2001). Sin embargo, el número de vesículas del pool de reserva no fue alterado bajo ningún tratamiento y sólo hubo un incremento del 11% del tamaño de la ZA luego del tratamiento con BDNF. Por lo tanto, BDNF incrementa la densidad de empaquetamiento de las vesículas en *docking* en la ZA con un menor efecto sobre el tamaño de las sinapsis (Tyler and Pozzo-Miller 2001). Adicionalmente, análisis por microscopía electrónica muestran que el ratón BDNF^{-/-} presenta una reducción del número de vesículas en *docking* en las zonas sinápticas de cultivos neuronales hipocampales (Pozzo-Miller et al. 1999). En concordancia a la reducción de vesículas sinápticas encontradas en la UNM de ratones *p75*^{-/-}, ratones *TrkB* ^{-/-} de igual manera presentan una disminución en la densidad de vesículas en las sinapsis de neuronas hipocampales. El

número de vesículas presentes cercana a la ZA también es reducido en estos animales, así como ocurre en ratones *TrkC*^{-/-} (Martinez et al. 1998).

En la sinapsis neuromuscular, también se ha reportado que las neurotrofinas modulan a proteínas de vesículas sinápticas. En co-cultivos de nervio-músculo de *Xenopus* tratados con NT3 se observó un incremento en la marca para sinapsina I, siendo este efecto inhibido con K252a. De manera interesante, en condiciones control, las neuritas que se encuentran en contacto con los miotubos presentan con mayor frecuencia la tinción sinapsina I positiva, sugiriendo que NT3 liberado por el músculo pudiese estimular la expresión de sinapsina I en la motoneurona (Wang et al. 1995). Adicionalmente, la sobreexpresión de sinapsina I en blastómeros de *Xenopus laevis*, permite una aceleración funcional en la maduración de la UNM de co-cultivos nervio-músculo. La sobreexpresión de sinapsina I produce cambios en la ultraestructura de la UNM, incrementando el número de vesículas en el terminal, aumentando la liberación del neurotransmisor y con ello favoreciendo la actividad de la sinapsis (Valtorta et al. 1995). Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que el ligando NT3 a través de sinaptofisina I regula la maduración de la UNM.

De esta manera, los receptores de neurotrofinas y sus ligandos son necesarios para la correcta liberación del neurotransmisor y disponibilidad de vesículas sinápticas, así como de la regulación de la expresión de las distintas proteínas que componen los complejos SNARE tanto de los pertenecientes a las vesículas, como de las proteínas presentes en la membrana presináptica.

En consideración que el receptor de neurotrofinas p75 puede ser transportado retrógradamente en la motoneurona hacia el soma (Deinhardt et al. 2006, Deinhardt et al. 2007, Ascano et al. 2012, Terenzio et al. 2014), especulamos que este receptor podría contribuir a la disponibilidad de vesículas sinápticas y con ello del neurotransmisor mediante mecanismos tales como señalización local de p75 en el terminal del axón motor o por transporte retrogrado del receptor hacia el soma de la motoneurona que permita la regulación génica de proteínas que componen las vesículas sinápticas, modulando su disponibilidad, ensamblaje, reciclaje y liberación en la UNM **(Anexo 5)**.

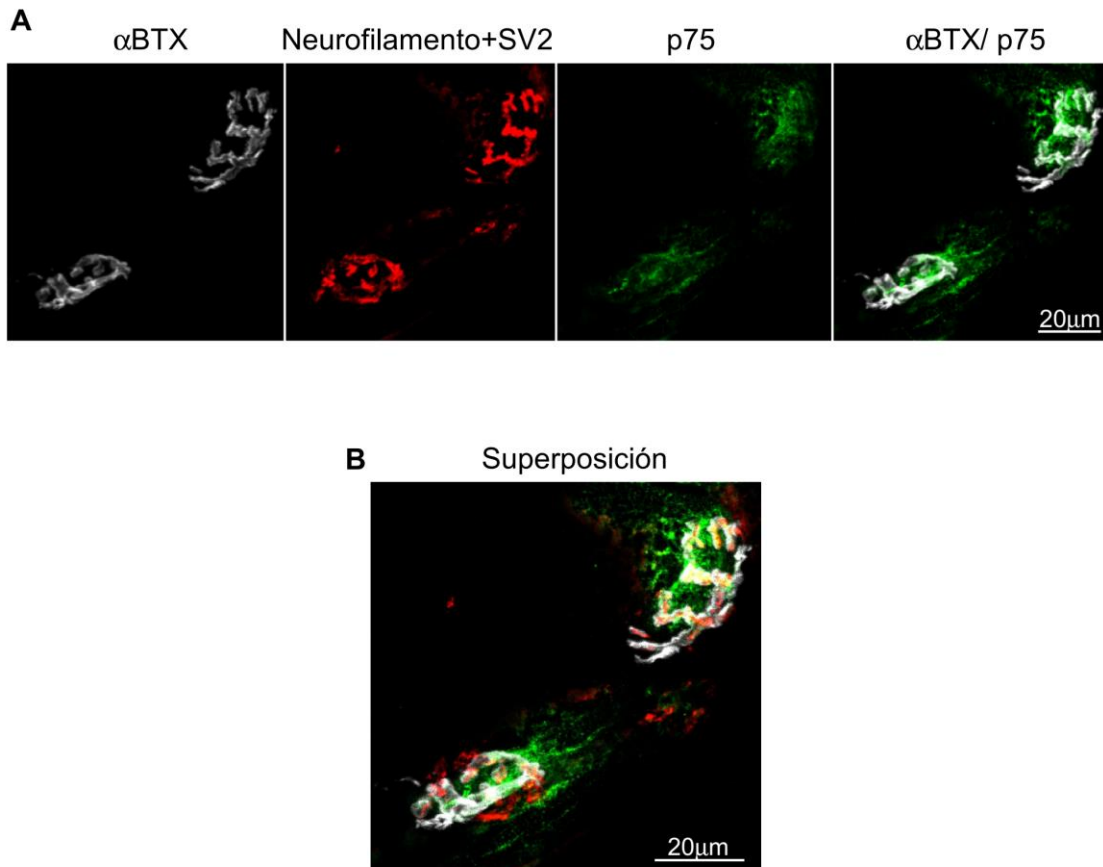


7. CONCLUSIONES

En esta investigación se sugiere que el receptor de neurotrofinas p75 es requerido para la progresión de la maduración de la UNM, siendo necesario para la organización de la morfología y estructura de la sinapsis neuromuscular. Así, este receptor es necesario para la invaginación de la membrana muscular en la zona de contacto con el axón motor, aumentando con ello el perímetro postsináptico, mientras que en el terminal motor, el receptor de neurotrofinas permite la concentración de vesículas sinápticas y con ello de la disponibilidad del neurotransmisor de esta sinapsis.

Los resultados obtenidos sugieren que las modificaciones ultraestructurales y morfológicas en la maduración de la UNM encontradas en el ratón *p75*^{-/-} contribuyen a la debilidad muscular y a las alteraciones en el comportamiento motor presentadas en estos animales, a través de alterar la morfofisiología neuromuscular. Por lo tanto, el receptor de neurotrofinas p75 regula la maduración de la UNM adulta.

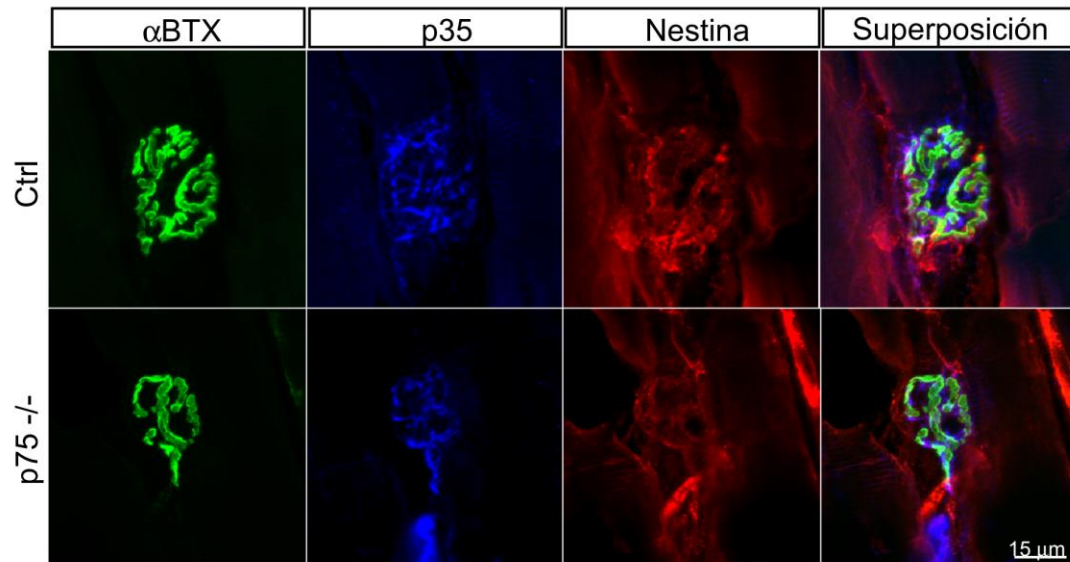
8. ANEXOS



Anexo 1: El receptor de neurotrofinas p75 se localiza en la placa terminal.

Cortes longitudinales de músculo Tibial anterior de ratones *p75*^{-/-} y sus pares controles de edad 2-4 meses fueron analizados mediante inmunohistoquímica.

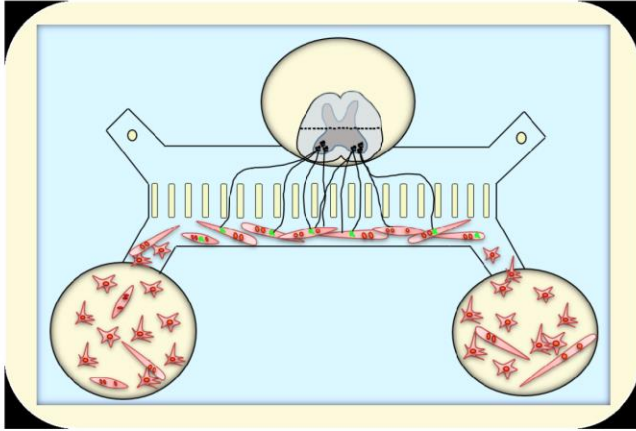
(A) Imagen representativa obtenida mediante microscopía confocal de músculo control. Se observa en blanco los AChR teñidos con α BTX, en color rojo el axón motor mediante el uso de anticuerpos anti 3A10+SV2 y en color verde el receptor de neurotrofinas p75. **(B)** Imagen de superposición de los canales analizados. Microscopia confocal. Barra= 20 μ m. Fuente: Elaboración propia.



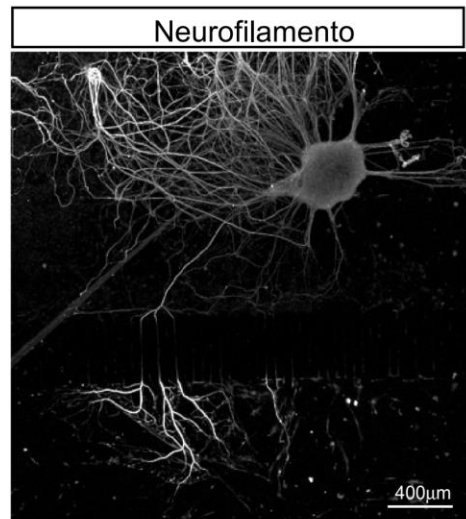
Anexo 2: Proteínas postsinápticas estructurales p35 y Nestina no alteran su distribución ante la usencia de p75.

Criosecciones de corte longitudinal de músculo Tibial anterior de ratones *p75*^{-/-} y control de 15-17 meses de edad, fueron analizadas mediante inmunohistoquímica. Imagen representativa adquirida mediante microscopía confocal. Barra = 15 μ m. En verde AChR (α BTX), en color azul p35 y en rojo Nestina utilizando sus respectivos anticuerpos. Fuente: Elaboración propia.

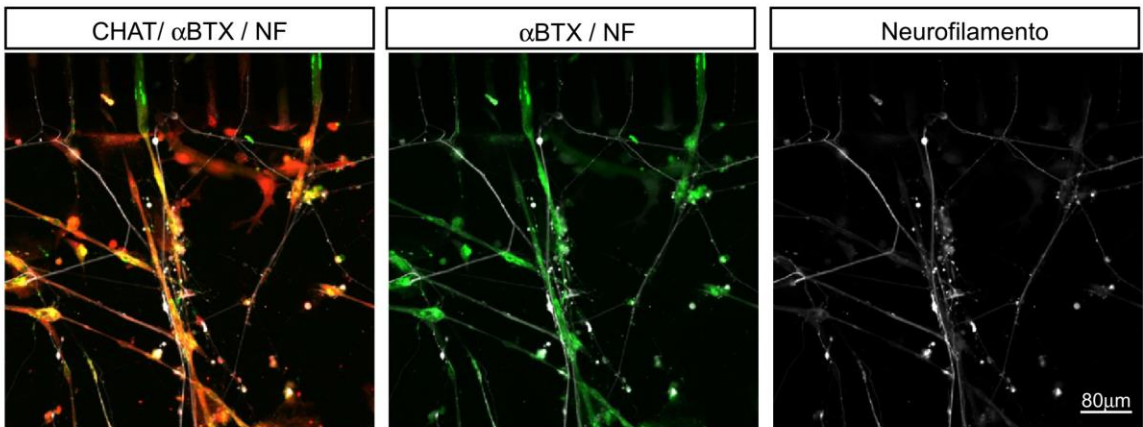
A



B

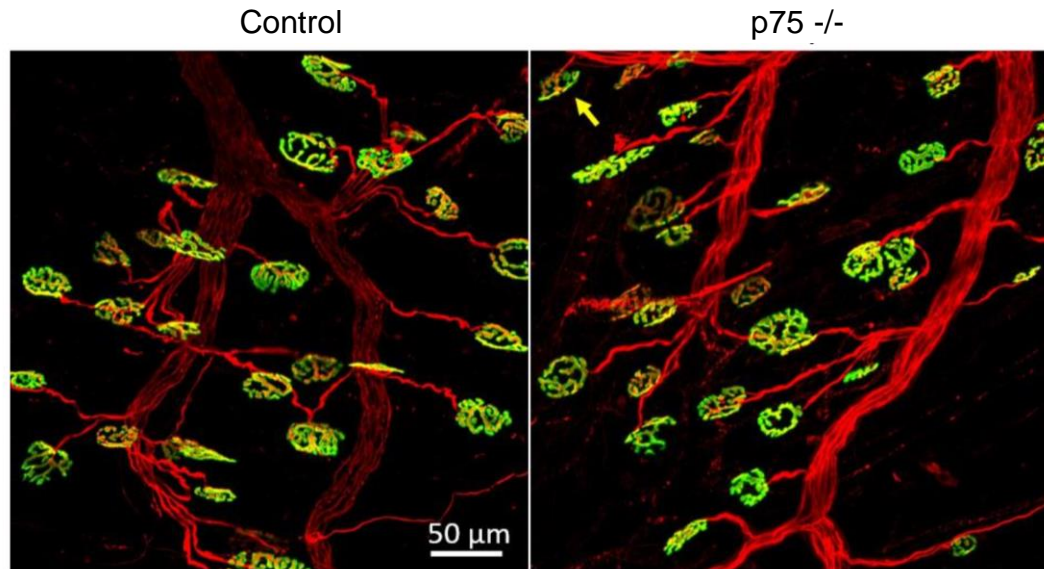


C



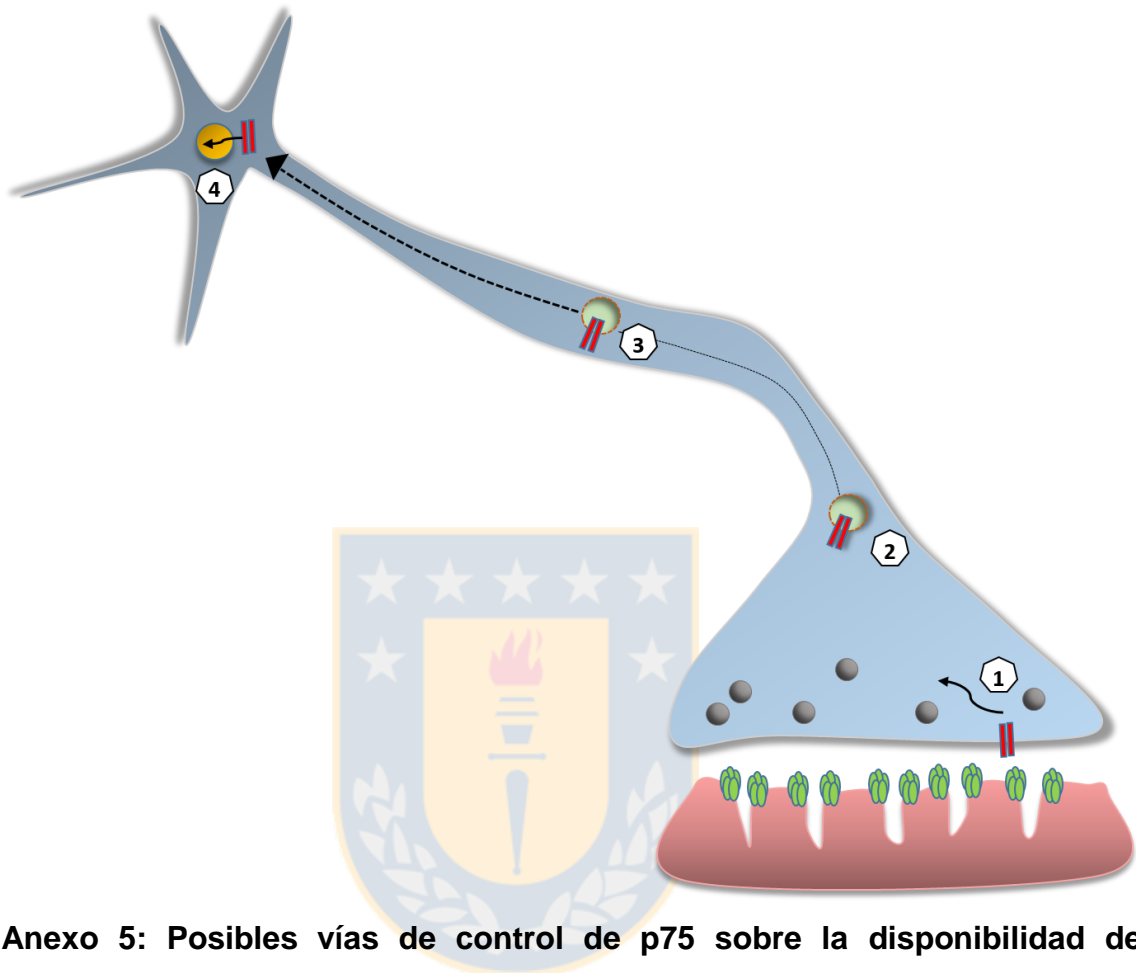
Anexo 3: Co-cultivo entre células musculares y motoneuronas desde asta ventral de la médula espinal.

Sistema de co-cultivo entre células musculares obtenidas a partir de cultivo primario de células satélites y motoneuronas obtenidas del asta ventral de la médula espinal. **(A)** Esquema representativo del co-cultivo en cámaras de silicona. En la porción proximal de la cámara fue sembrado un explante de la región ventral de la médula espinal de embriones de ratón E.13.5. En la porción distal de la cámara fueron sembrados cultivos primarios de células musculares. **(B)** Reconstrucción de cámara de cultivo obtenida mediante imágenes adquiridas por microscopía confocal. Barra= 400µm. **(C)** Imagen obtenida del compartimento distal de la cámara de silicona en donde las motoneuronas crecieron sus prolongaciones a través de los canales que separan ambos compartimentos, haciendo contacto con los miotubos. Se realizó una inmunocitoquímica donde se observa en rojo acetiltransferasa de colina como marcador de neuronas colinérgicas (ChAT), en verde AChR (α BTX) y en color blanco axón motor (neurofilamento). Barra= 80µm. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Fuente: Elaboración propia.



Anexo 4: La ausencia del receptor p75 genera una discreta poli-inervación del aparato postsináptico de la UNM.

Músculo Levator Auris Longus (LAL) de ratones *p75*^{-/-} y control de edad 2-4 meses fueron analizados mediante inmunohistoquímica. En rojo la motoneurona (2H3 + SV2) y en color verde AChR (α BTX). Se observa con flecha amarilla un pretzel inervado por más de un axón motor. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal. Barra= 50 μ m. Fuente: Elaboración propia.



Anexo 5: Posibles vías de control de p75 sobre la disponibilidad de vesículas sinápticas de la UNM.

El receptor de neurotrofinas p75 se localiza en el terminal axonal de la UNM. Por lo cual existen diversas vías por las cuales puede estar controlando la disponibilidad de vesículas sinápticas en esta sinapsis: **1** Mediante una señalización local mediada por el receptor controlando el ensamblaje y reciclaje de vesículas. **2** Mediante el transporte retrógrado de p75 hacia el soma de la motoneurona que permita; **4** la activación génica, modificación postraduccionales o activación de vías de señalización que permitan tener mayor disponibilidad de vesículas. **3** Mediante el transporte retrógrado del receptor este se encuentre señalizando durante el transporte en la vesícula. Fuente: Elaboración propia.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Abrigo, J., J. C. Rivera, J. Aravena, D. Cabrera, F. Simon, F. Ezquer, M. Ezquer and C. Cabello-Verrugio (2016). High Fat Diet-Induced Skeletal Muscle Wasting Is Decreased by Mesenchymal Stem Cells Administration: Implications on Oxidative Stress, Ubiquitin Proteasome Pathway Activation, and Myonuclear Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1-13.
- 2 Akay, T., W. G. Tourtellotte, S. Arber and T. M. Jessell (2014). Degradation of mouse locomotor pattern in the absence of proprioceptive sensory feedback. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(47): 16877-16882.
- 3 Amos, M. L. and M. E. Smith (1998). The effect of pyridostigmine administration on the expression of pro-opiomelanocortin-derived peptides in motoneurons. *Neurotoxicology* 19(6): 799-807.
- 4 Anand, P. (2004). Neurotrophic factors and their receptors in human sensory neuropathies. *Prog Brain Res* 146: 477-492.
- 5 Anton, E. S., G. Weskamp, L. F. Reichardt and W. D. Matthew (1994). Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2795-2799.
- 6 Ascano, M., D. Bodmer and R. Kuruvilla (2012). Endocytic trafficking of neurotrophins in neural development. *Trends in Cell Biology* 22(5): 266-273.
- 7 Ashmore, C. R. and L. Doerr (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp Neurol* 31(3): 408-418.
- 8 Badawi, Y. and H. Nishimune (2018). Presynaptic active zones of mammalian neuromuscular junctions: Nanoarchitecture and selective impairments in aging. *Neurosci Res* 127: 78-88.
- 9 Barik, A., L. Li, A. Sathyamurthy, W. C. Xiong and L. Mei (2016). Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *Journal of Neuroscience* 36(38): 9770-9781.
- 10 Belluardo, N., H. Westerblad, G. Mudó, A. Casabona, J. Bruton, G. Caniglia, O. Pastoris, F. Grassi and C. F. Ibáñez (2001). Neuromuscular Junction Disassembly and Muscle Fatigue in Mice Lacking Neurotrophin-4. *Molecular and Cellular Neuroscience* 18(1): 56-67.
- 11 Bentley, C. A. and K. F. Lee (2000). p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. *J Neurosci* 20(20): 7706-7715.
- 12 Bergmann, I., J. V. Priestley, S. B. McMahon, E. B. Brocker, K. V. Toyka and M. Koltzenburg (1997). Analysis of cutaneous sensory neurons in transgenic mice lacking the low affinity neurotrophin receptor p75. *Eur J Neurosci* 9(1): 18-28.
- 13 Bergmann, I., R. Reiter, K. V. Toyka and M. Koltzenburg (1998). Nerve growth factor evokes hyperalgesia in mice lacking the low-affinity neurotrophin receptor p75. *Neurosci Lett* 255(2): 87-90.
- 14 Bogenmann, E., P. S. Thomas, Q. Li, J. Kim, L.-T. Yang, B. Pierchala and V. Kaartinen (2011a). Generation of mice with a conditional allele for the p75NTR neurotrophin receptor gene. *genesis* 49(11): 862-869.
- 15 Bogenmann, E., P. S. Thomas, Q. Li, J. Kim, L. T. Yang, B. Pierchala and V. Kaartinen (2011b). Generation of mice with a conditional allele for the p75(NTR) neurotrophin receptor gene. *Genesis* 49(11): 862-869.
- 16 Bolte, S. and F. Cordelieres (2006a). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy* 224(3): 213-232.
- 17 Bolte, S. and F. P. Cordelieres (2006b). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224(Pt 3): 213-232.
- 18 Bolliger, M. F., A. Zurlinden, D. Luscher, L. Butikofer, O. Shakhova, M. Francolini, S. V. Kozlov, P. Cinelli, A. Stephan, A. D. Kistler, T. Rulicke, 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.
- 19 Bonne, G., F. Rivier and D. Hamroun (2017). The 2018 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscular Disorders* 27(12): 1152-1183.
- 20 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.
- 21 Boyd, J. G. and T. Gordon (2001). The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *Journal of Neurobiology* 49(4): 314-325.
- 22 Brooks, S. P., R. C. Trueman and S. B. Dunnett (2012). Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests.
- 23 Bruneau, E., D. Sutter, R. I. Hume and M. Akaaboune (2005). Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *J Neurosci* 25(43): 9949-9959.
- 24 Bruneau, E. G. and M. Akaaboune (2006). The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* 133(22): 4485-4493.
- 25 Calvo, M., N. Zhu, C. Tsantoulas, Z. Ma, J. Grist, J. A. Loeb and D. L. H. Bennett (2010). Neuregulin-ErbB Signaling Promotes Microglial Proliferation and Chemotaxis Contributing to Microgliosis and Pain after Peripheral Nerve Injury. *Journal of Neuroscience* 30(15): 5437-5450.
- 26 Cano, R. and L. Tabares (2016). The Active and Periaxial Zone Organization and the Functional Properties of Small and Large Synapses. *Front Synaptic Neurosci* 8: 12.
- 27 Cano, R., L. Torres-Benito, R. Tejero, A. I. Biea, R. Ruiz, W. J. Betz and L. Tabares (2013). Structural and functional maturation of active zones in large synapses. *Mol Neurobiol* 47(1): 209-219.
- 28 Cantor, S., W. Zhang, N. Delestree, L. Remedio, G. Z. Mentis and S. J. Burden (2018). Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *Elife* 7.
- 29 Carrasco, D. I., K. L. Seburn and M. J. Pinter (2016). Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Experimental Neurology* 275: 172-181.
- 30 Casaccia-Bonnel, P., C. Gu, G. Khursigara and M. V. Chao (1999). p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech* 45(4-5): 217-224.
- 31 Catts, V. S., N. Al-Menhali, T. H. J. Burne, M. J. Colditz and E. J. Coulson (2008). The p75 neurotrophin receptor regulates hippocampal neurogenesis and related behaviours. *European Journal of Neuroscience* 28(5): 883-892.
- 32 Ceni, C., N. Unsain, M. P. Zeinieh and P. A. Barker (2014). Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handb Exp Pharmacol* 220: 193-221.
- 33 Colditz, M. J., V. S. Catts, N. Al-menhali, G. W. Osborne, P. F. Bartlett and E. J. Coulson (2009). p75 neurotrophin receptor regulates basal and fluoxetine-stimulated hippocampal neurogenesis. *Experimental Brain Research* 200(2): 161-167.
- 34 Colombo, E., S. Romaggi, E. Medico, R. Menon, M. Mora, C. Falcone, H. Lochmüller, P. Confalonieri, R. Mantegazza, L. Morandi and C. Farina (2011). Human Neurotrophin Receptor p75NTR Defines Differentiation-Oriented Skeletal Muscle Precursor Cells: Implications for Muscle Regeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70(2): 133-142.
- 35 Cosgaya, J. M., J. R. Chan and E. M. Shooter (2002). The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 298(5596): 1245-1248.
- 36 Court, F. A., R. Midha, B. A. Cisterna, J. Grochmal, A. Shakhbazov, W. T. Hendriks and J. Van Minnen (2011). Morphological evidence for a transport of ribosomes from Schwann cells to regenerating axons. *Glia* 59(10): 1529-1539.
- 37 Chakravarthy, B., M. Menard, S. Ito, C. Gaudet, I. Dal Pra, U. Armato and J. Whitfield (2012). Hippocampal membrane-associated p75NTR levels are increased in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 30(3): 675-684.

- 38 Chan, J. R., J. M. Cosgaya, Y. J. Wu and E. M. Shooter (2001). Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(25): 14661-14668.
- 39 Chand, K. K., K. M. Lee, N. A. Lavidis and P. G. Noakes (2017). Loss of laminin- α 4 results in pre- and postsynaptic modifications at the neuromuscular junction. *The FASEB Journal* 31(4): 1323-1336.
- 40 Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 4(4): 299-309.
- 41 Chaudhry, N., C. Bachelin, V. Zujovic, M. Hilaire, K. T. Baldwin, R. M. Follis, R. Giger, B. D. Carter, A. Baron-Van Evercooren and M. T. Filbin (2017). Myelin-Associated Glycoprotein Inhibits Schwann Cell Migration and Induces Their Death. *The Journal of Neuroscience* 37(24): 5885-5899.
- 42 Chen, Y., J. Zeng, L. Cen, Y. Chen, X. Wang, G. Yao, W. Wang, W. Qi and K. Kong (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med Res* 37(2): 281-288.
- 43 Chevrel, G., R. Hohlfeld and M. Sendtner (2006). The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions. *Muscle Nerve* 33(4): 462-476.
- 44 Chomiak, T. and B. Hu (2009). What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 4(11): e7754.
- 45 Chowdary, P. D., D. L. Che and B. Cui (2012). Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport. *Annu Rev Phys Chem* 63: 571-594.
- 46 Darios, F., C. Wasser, A. Shakirzyanova, A. Giniatullin, K. Goodman, J. L. Munoz-Bravo, J. Raingo, J. Jorgačevski, M. Kreft, R. Zorec, J. M. Rosa, L. Gandia, L. M. Gutiérrez, T. Binz, R. Giniatullin, E. T. Kavalali and B. Davletov (2009). Sphingosine Facilitates SNARE Complex Assembly and Activates Synaptic Vesicle Exocytosis. *Neuron* 62(5): 683-694.
- 47 Davies, A. M., K. F. Lee and R. Jaenisch (1993). p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins. *Neuron* 11(4): 565-574.
- 48 de Perini, A., I. Dimauro, G. Duranti, C. Fantini, N. Mercatelli, R. Ceci, L. Di Luigi, S. Sabatini and D. Caporossi (2017). The p75NTR-mediated effect of nerve growth factor in L6C5 myogenic cells. *BMC Research Notes* 10(1).
- 49 Deacon, R. M. J. (2013a). Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments*(75).
- 50 Deacon, R. M. J. (2013b). Measuring the Strength of Mice. *Journal of Visualized Experiments*(76).
- 51 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.
- 52 Deinhardt, K., A. Reversi, O. Berninghausen, C. R. Hopkins and G. Schiavo (2007). Neurotrophins Redirect p75NTR from a Clathrin-Independent to a Clathrin-Dependent Endocytic Pathway Coupled to Axonal Transport. *Traffic* 8(12): 1736-1749.
- 53 Deinhardt, K., S. Salinas, C. Verastegui, R. Watson, D. Worth, S. Hanrahan, C. Bucci and G. Schiavo (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52(2): 293-305.
- 54 Deponti, D., R. Buono, G. Catanzaro, C. De Palma, R. Longhi, R. Meneveri, N. Bresolin, M. T. Bassi, G. Cossu, E. Clementi and S. Brunelli (2009). The Low-Affinity Receptor for Neurotrophins p75NTR Plays a Key Role for Satellite Cell Function in Muscle Repair Acting via RhoA. *Molecular Biology of the Cell* 20(16): 3620-3627.
- 55 Dixon, W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 441-462.

- 56 Dobrowsky, R. T., M. H. Werner, A. M. Castellino, M. V. Chao and Y. A. Hannun (1994). Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 265(5178): 1596-1599.
- 57 Dorsey, S. G., R. M. Lovering, C. L. Renn, C. C. Leitch, X. Liu, L. J. Tallon, L. D. Sadzewicz, A. Pratap, S. Ott, N. Sengamalay, K. M. Jones, C. Barrick, G. Fulgenzi, J. Becker, K. Voelker, R. Talmadge, B. K. Harvey, R. M. Wyatt, E. Vernon-Pitts, C. Zhang, K. Shokat, C. Fraser-Liggett, R. J. Balice-Gordon, L. Tessarollo and C. W. Ward (2012). Genetic deletion of *trkB.T1* increases neuromuscular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(1): C141-153.
- 58 Dupuis, L. and J. P. Loeffler (2009). Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models. *Curr Opin Pharmacol* 9(3): 341-346.
- 59 Elmariah, S. B., E. G. Hughes, E. J. Oh and R. J. Balice-Gordon (2004). Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses. *Neuron Glia Biol* 1(4): 1-11.
- 60 Erck, C., C. Meisinger, C. Grothe and K. Seidl (1998). Regulation of nerve growth factor and its low-affinity receptor (p75NTR) during myogenic differentiation. *J Cell Physiol* 176(1): 22-31.
- 61 Ernfors, P., A. Henschen, L. Olson and H. Persson (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2(6): 1605-1613.
- 62 Fan, G., R. Jaenisch and J. Kucera (1999). A role for p75 receptor in neurotrophin-3 functioning during the development of limb proprioception. *Neuroscience* 90(1): 259-268.
- 63 Ferri, C. C., F. A. Moore and M. A. Bisby (1998). Effects of facial nerve injury on mouse motoneurons lacking the p75 low-affinity neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 34(1): 1-9.
- 64 Fleming, S. M., O. R. Ekhatior and V. Ghisays (2013). Assessment of Sensorimotor Function in Mouse Models of Parkinson's Disease. *Journal of Visualized Experiments*(76).
- 65 Fox, M. A. and H. Umemori (2006). Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem* 97(5): 1215-1231.
- 66 Frey, D., C. Schneider, L. Xu, J. Borg, W. Spooren and P. Caroni (2000). Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. *J Neurosci* 20(7): 2534-2542.
- 67 Friedman, W. J. (2010). Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. *Neuroscientist* 16(3): 244-252.
- 68 Fry, E. J., C. Ho and S. David (2007). A role for Nogo receptor in macrophage clearance from injured peripheral nerve. *Neuron* 53(5): 649-662.
- 69 Funakoshi, H., N. Belluardo, E. Arenas, Y. Yamamoto, A. Casabona, H. Persson and C. Ibanez (1995). Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 268(5216): 1495-1499.
- 70 Gai, W. P., X. F. Zhou and R. A. Rush (1996). Analysis of low affinity neurotrophin receptor (p75) expression in glia of the CNS-PNS transition zone following dorsal root transection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 22(5): 434-439.
- 71 Gao, X., R. L. Daugherty and W. G. Tourtellotte (2007). Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75NTR) by early growth response (Egr) transcriptional regulators. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36(4): 501-514.
- 72 Garcia, N., M. M. Santafe, M. Tomàs, M. A. Lanuza, N. Besalduch and J. Tomàs (2009). Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the functional elimination of synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development. *Journal of Neuroscience Research: NA-NA*.
- 73 Garcia, N., M. M. Santafé, M. Tomàs, M. A. Lanuza, N. Besalduch, M. Priego and J. Tomàs (2010a). The glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) does not acutely change acetylcholine release in developing and adult neuromuscular junction. *Neuroscience Letters* 480(2): 127-131.

- 74 Garcia, N., M. M. Santafe, M. Tomas, M. A. Lanuza, N. Besalduch and J. Tomas (2010b). Neurotrophin-4 couples to locally modulated ACh release at the end of neuromuscular synapse maturation. *Neuroscience Letters* 468(1): 72-74.
- 75 Garcia, N., M. M. Santafé, M. Tomàs, M. A. Lanuza, N. Besalduch and J. Tomàs (2010c). Involvement of neurotrophin-3 (NT-3) in the functional elimination of synaptic contacts during neuromuscular development. *Neuroscience Letters* 473(2): 141-145.
- 76 Garcia, N., M. Tomas, M. M. Santafe, N. Besalduch, M. A. Lanuza and J. Tomas (2010d). The Interaction between Tropomyosin-Related Kinase B Receptors and Presynaptic Muscarinic Receptors Modulates Transmitter Release in Adult Rodent Motor Nerve Terminals. *Journal of Neuroscience* 30(49): 16514-16522.
- 77 Garcia, N., M. Tomas, M. M. Santafe, M. A. Lanuza, N. Besalduch and J. Tomas (2010e). Localization of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, tropomyosin-related kinase b receptor, and p75 NTR receptor by high-resolution immunohistochemistry on the adult mouse neuromuscular junction. *J Peripher Nerv Syst* 15(1): 40-49.
- 78 Garcia, N., M. Tomàs, M. M. Santafe, M. A. Lanuza, N. Besalduch and J. Tomàs (2011). Blocking p75NTR receptors alters polyinnervation of neuromuscular synapses during development. *Journal of Neuroscience Research* 89(9): 1331-1341.
- 79 Gautam, M., P. G. Noakes, J. Mudd, M. Nichol, G. C. Chu, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377(6546): 232-236.
- 80 Genç, B., J. H. Jara, M. C. Schultz, M. Manuel, M. J. Stanford, M. Gautam, J. L. Klessner, G. Sekerkova, D. B. Heller, G. A. Cox, C. J. Heckman, C. J. DiDonato and P. H. Özdinler (2016). Absence of UCHL 1 function leads to selective motor neuropathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3(5): 331-345.
- 81 Georgiou, J. and M. P. Charlton (1999). Non-myelin-forming perisynaptic schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27(2): 101-109.
- 82 Glass, D. J., D. C. Bowen, T. N. Stitt, C. Radziejewski, J. Bruno, T. E. Ryan, D. R. Gies, S. Shah, K. Mattsson, S. J. Burden, P. S. DiStefano, D. M. Valenzuela, T. M. DeChiara and G. D. Yancopoulos (1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85(4): 513-523.
- 83 Gonzalez, A., G. Moya-Alvarado, C. Gonzalez-Billaut and F. C. Bronfman (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton* 73(10): 612-628.
- 84 Gonzalez, M., F. P. Ruggiero, Q. Chang, Y. J. Shi, M. M. Rich, S. Kraner and R. J. Balice-Gordon (1999). Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions. *Neuron* 24(3): 567-583.
- 85 He, X. L. and K. C. Garcia (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304(5672): 870-875.
- 86 Henriquez, J. P. and P. C. Salinas (2012). Dual roles for Wnt signalling during the formation of the vertebrate neuromuscular junction. *Acta Physiol (Oxf)* 204(1): 128-136.
- 87 Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- 88 Huang, W., M. Calvo, T. Pheby, D. L. H. Bennett and A. S. C. Rice (2017). A rodent model of HIV protease inhibitor indinavir induced peripheral neuropathy. *Pain* 158(1): 75-85.
- 89 Hurtado, E., V. Cilleros, L. Nadal, A. Simó, T. Obis, N. Garcia, M. M. Santafé, M. Tomàs, K. Halievski, C. L. Jordan, M. A. Lanuza and J. Tomàs (2017). Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKC α and cPKC β I. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10.
- 90 Ionescu, A., E. E. Zahavi, T. Gradus, K. Ben-Yaakov and E. Perlson (2016). Compartmental microfluidic system for studying muscle-neuron communication and neuromuscular junction maintenance. *Eur J Cell Biol* 95(2): 69-88.
- 91 Irmady, K., K. A. Jackman, V. A. Padow, N. Shahani, L. A. Martin, L. Cerchietti, K. Unsicker, C. Iadecola and B. L. Hempstead (2014). MiR-592 Regulates the Induction and Cell

- Death-Promoting Activity of p75NTR in Neuronal Ischemic Injury. *Journal of Neuroscience* 34(9): 3419-3428.
- 92 Iwakura, N., S. Ohtori, S. Orita, M. Yamashita, K. Takahashi and K. Kuniyoshi (2010). Role of low-affinity nerve growth factor receptor inhibitory antibody in reducing pain behavior and calcitonin gene-related Peptide expression in a rat model of wrist joint inflammatory pain. *J Hand Surg Am* 35(2): 267-273.
- 93 Jang, Y. C. and H. Van Remmen (2011). Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 46(2-3): 193-198.
- 94 Je, H. S., F. Yang, Y. Ji, G. Nagappan, B. L. Hempstead and B. Lu (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): 15924-15929.
- 95 Je, H. S., F. Yang, Y. Ji, S. Potluri, X. Q. Fu, Z. G. Luo, G. Nagappan, J. P. Chan, B. Hempstead, Y. J. Son and B. Lu (2013). ProBDNF and Mature BDNF as Punishment and Reward Signals for Synapse Elimination at Mouse Neuromuscular Junctions. *Journal of Neuroscience* 33(24): 9957-9962.
- 96 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.
- 97 Johnson, H., T. Hokfelt and B. Ulfhake (1999). Expression of p75(NTR), trkB and trkC in nonmanipulated and axotomized motoneurons of aged rats. *Brain Res Mol Brain Res* 69(1): 21-34.
- 98 Jones, E. J., P. A. Bishop, A. K. Woods and J. M. Green (2008). Cross-sectional area and muscular strength: a brief review. *Sports Med* 38(12): 987-994.
- 99 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).
- 100 Kaplan, J.-C., D. Hamroun, F. Rivier and G. Bonne (2016). The 2017 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscular Disorders* 26(12): 895-929.
- 101 Khodorova, A., G. D. Nicol and G. Strichartz (2013). The p75NTR signaling cascade mediates mechanical hyperalgesia induced by nerve growth factor injected into the rat hind paw. *Neuroscience* 254: 312-323.
- 102 Khodorova, A., G. D. Nicol and G. Strichartz (2017). The TrkA receptor mediates experimental thermal hyperalgesia produced by nerve growth factor: Modulation by the p75 neurotrophin receptor. *Neuroscience* 340: 384-397.
- 103 Ko, C.-P. and R. Robitaille (2015). Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(10): a020503.
- 104 Kobayashi, T., K. Yamauchi, Y. Matsuura, K. Kuniyoshi, K. Takahashi and S. Ohtori (2015). The Effects of Generally Administered Anti-Nerve Growth Factor Receptor (p75NTR) Antibody on Pain-Related Behavior, Dorsal Root Ganglia, and Spinal Glia Activation in a Rat Model of Brachial Plexus Avulsion. *J Hand Surg Am* 40(10): 2017-2025.
- 105 Kontinen, V. K. and A. H. Dickenson (2000). Effects of midazolam in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain in rats. *Pain* 85(3): 425-431.
- 106 Kraemer, B. R., S. O. Yoon and B. D. Carter (2014). The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor. *Handb Exp Pharmacol* 220: 121-164.
- 107 Krol, K. M., E. J. Stein, J. Elliott and M. D. Kawaja (2001). TrkA-expressing trigeminal sensory neurons display both neurochemical and structural plasticity despite a loss of p75NTR function: responses to normal and elevated levels of nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 13(1): 35-47.

- 108 Kulakowski, S. A., S. D. Parker and K. E. Personius (2011). Reduced TrkB expression results in precocious age-like changes in neuromuscular structure, neurotransmission, and muscle function. *J Appl Physiol* (1985) 111(3): 844-852.
- 109 Kummer, T. T., T. Misgeld, J. W. Lichtman and J. R. Sanes (2004). Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *J Cell Biol* 164(7): 1077-1087.
- 110 Kuner, P., R. Schubengel and C. Hertel (1998). Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 54(6): 798-804.
- 111 Lanuza, M. A., N. Garcia, M. Santafe, C. M. Gonzalez, I. Alonso, P. G. Nelson and J. Tomas (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *J Neurosci Res* 67(5): 607-617.
- 112 Laws, N. and A. Hoey (2004). Progression of kyphosis in mdx mice. *J Appl Physiol* (1985) 97(5): 1970-1977.
- 113 Lee, C. W., J. Han, J. R. Bamburg, L. Han, R. Lynn and J. Q. Zheng (2009). Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking. *Nat Neurosci* 12(7): 848-856.
- 114 Lee, K. F., K. Bachman, S. Landis and R. Jaenisch (1994a). Dependence on p75 for innervation of some sympathetic targets. *Science* 263(5152): 1447-1449.
- 115 Lee, K. F., A. M. Davies and R. Jaenisch (1994b). p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development* 120(4): 1027-1033.
- 116 Lee, K. F., E. Li, L. J. Huber, S. C. Landis, A. H. Sharpe, M. V. Chao and R. Jaenisch (1992). Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell* 69(5): 737-749.
- 117 Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng and B. L. Hempstead (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294(5548): 1945-1948.
- 118 Lin, W., R. W. Burgess, B. Dominguez, S. L. Pfaff, J. R. Sanes and K. F. Lee (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410(6832): 1057-1064.
- 119 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.
- 120 Linnoila, J., Y. Wang, Y. Yao and Z. Z. Wang (2008). A mammalian homolog of *Drosophila* tumorous imaginal discs, *Tid1*, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction. *Neuron* 60(4): 625-641.
- 121 Lintern, M. C., M. E. Smith and C. B. Ferry (1997). Effect of repeated treatment with pyridostigmine on acetylcholinesterase in mouse muscles. *Hum Exp Toxicol* 16(3): 158-165.
- 122 Loeb, J. A. and G. D. Fischbach (1997). Neurotrophic factors increase neuregulin expression in embryonic ventral spinal cord neurons. *J Neurosci* 17(4): 1416-1424.
- 123 Loeb, J. A., A. Hmadcha, G. D. Fischbach, S. J. Land and V. L. Zakarian (2002). Neuregulin expression at neuromuscular synapses is modulated by synaptic activity and neurotrophic factors. *J Neurosci* 22(6): 2206-2214.
- 124 Mantilla, C. B., W. Z. Zhan and G. C. Sieck (2004). Neurotrophins improve neuromuscular transmission in the adult rat diaphragm. *Muscle Nerve* 29(3): 381-386.
- 125 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.
- 126 Márquez-Miranda, V., J. Abrigo, J. C. Rivera, I. Araya-Duran, J. Aravena, F. Simon, N. Pacheco, F. D. Gonzalez-Nilo and C. Cabello-Verrugio (2017). The complex of PAMAM-OH dendrimer with Angiotensin (1–7) prevented the disuse-induced skeletal muscle atrophy in mice. *International Journal of Nanomedicine Volume 12: 1985-1999*.
- 127 Martinez, A., S. Alcantara, V. Borrell, J. A. Del Rio, J. Blasi, R. Ojal, N. Campos, A. Boronat, M. Barbacid, I. Silos-Santiago and E. Soriano (1998). TrkB and TrkC signaling are

- required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. *J Neurosci* 18(18): 7336-7350.
- 128 Matsuura, Y., N. Iwakura, S. Ohtori, T. Suzuki, K. Kuniyoshi, K. Murakami, R. Hiwatari, K. Hashimoto, S. Okamoto, M. Shibayama, T. Kobayashi, Y. Ogawa, K. Sukegawa and K. Takahashi (2013). The effect of Anti-NGF receptor (p75 Neurotrophin Receptor) antibodies on nociceptive behavior and activation of spinal microglia in the rat brachial plexus avulsion model. *Spine (Phila Pa 1976)* 38(6): E332-338.
- 129 Maurissen, J. P. J., B. R. Marable, A. K. Andrus and K. E. Stebbins (2003). Factors affecting grip strength testing. *Neurotoxicology and Teratology* 25(5): 543-553.
- 130 Meabon, J. S., R. De Laat, K. Ieguchi, J. C. Wiley, M. P. Hudson and M. Bothwell (2015a). LINGO-1 protein interacts with the p75 neurotrophin receptor in intracellular membrane compartments. *J Biol Chem* 290(15): 9511-9520.
- 131 Meabon, J. S., R. De Laat, K. Ieguchi, J. C. Wiley, M. P. Hudson and M. Bothwell (2015b). LINGO-1 Protein Interacts with the p75 Neurotrophin Receptor in Intracellular Membrane Compartments. *Journal of Biological Chemistry* 290(15): 9511-9520.
- 132 Meeker, R. and K. Williams (2014). Dynamic Nature of the p75 Neurotrophin Receptor in Response to Injury and Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 9(5): 615-628.
- 133 Meeker, R. and K. Williams (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research* 10(5): 721.
- 134 Messeant, J., A. Dobbertin, E. Girard, P. Delers, M. Manuel, F. Mangione, A. Schmitt, D. Le Denmat, J. Molgo, D. Zytnicki, L. Schaeffer, C. Legay and L. Strohlic (2015). MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *J Neurosci* 35(12): 4926-4941.
- 135 Messéant, J., A. Dobbertin, E. Girard, P. Delers, M. Manuel, F. Mangione, A. Schmitt, D. Le Denmat, J. Molgó, D. Zytnicki, L. Schaeffer, C. Legay and L. Strohlic (2015). MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *The Journal of Neuroscience* 35(12): 4926-4941.
- 136 Middlemas, D. S., R. A. Lindberg and T. Hunter (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 11(1): 143-153.
- 137 Mills, C. D., T. Nguyen, F. Y. Tanga, C. Zhong, D. M. Gauvin, J. Mikusa, E. J. Gomez, A. K. Salyers and A. W. Bannon (2013). Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pain* 17(4): 469-479.
- 138 Morales, M. G., C. Cabello-Verrugio, C. Santander, D. Cabrera, R. Goldschmeding and E. Brandan (2011). CTGF/CCN-2 over-expression can directly induce features of skeletal muscle dystrophy. *The Journal of Pathology* 225(4): 490-501.
- 139 Morales, M. G., D. Cabrera, C. Cespedes, C. P. Vio, Y. Vazquez, E. Brandan and C. Cabello-Verrugio (2013). Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2). *Cell Tissue Res* 353(1): 173-187.
- 140 Morales, María G., H. Olgún, G. Di Capua, E. Brandan, F. Simon and C. Cabello-Verrugio (2015). Endotoxin-induced skeletal muscle wasting is prevented by angiotensin-(1-7) through a p38 MAPK-dependent mechanism. *Clinical Science* 129(6): 461-476.
- 141 Morgan, D. L. and U. Proske (1984). Vertebrate slow muscle: its structure, pattern of innervation, and mechanical properties. *Physiol Rev* 64(1): 103-169.
- 142 Mousavi, K. (2006). BDNF Is Expressed in Skeletal Muscle Satellite Cells and Inhibits Myogenic Differentiation. *Journal of Neuroscience* 26(21): 5739-5749.
- 143 Mowla, S. J., H. F. Farhadi, S. Pareek, J. K. Atwal, S. J. Morris, N. G. Seidah and R. A. Murphy (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276(16): 12660-12666.
- 144 Mufson, E. J., B. He, M. Nadeem, S. E. Perez, S. E. Counts, S. Leurgans, J. Fritz, J. Lah, S. D. Ginsberg, J. Wu and S. W. Scheff (2012). Hippocampal ProNGF Signaling Pathways and

- β -Amyloid Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(11): 1018-1029.
- 145 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.
- 146 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.
- 147 Nadal, L., N. Garcia, E. Hurtado, A. Simo, M. Tomas, M. A. Lanuza, V. Cilleros and J. Tomas (2017). Presynaptic Muscarinic Acetylcholine Receptors and TrkB Receptor Cooperate in the Elimination of Redundant Motor Nerve Terminals during Development. *Front Aging Neurosci* 9: 24.
- 148 Naumann, T., E. Casademunt, E. Hollerbach, J. Hofmann, G. Dechant, M. Frotscher and Y. A. Barde (2002). Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurosci* 22(7): 2409-2418.
- 149 Nguyen, Q. T. and J. W. Lichtman (1996). Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 6(1): 104-112.
- 150 Nishimune, H., Y. Badawi, S. Mori and K. Shigemoto (2016). Dual-color STED microscopy reveals a sandwich structure of Bassoon and Piccolo in active zones of adult and aged mice. *Sci Rep* 6: 27935.
- 151 Nishimune, H., J. R. Sanes and S. S. Carlson (2004). A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432(7017): 580-587.
- 152 Noakes, P. G., M. Gautam, J. Mudd, J. R. Sanes and J. P. Merlie (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature* 374(6519): 258-262.
- 153 Notterpek, L. (2003). Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends Neurosci* 26(5): 232-234.
- 154 Nykjaer, A. and T. E. Willnow (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences* 35(4): 261-270.
- 155 Okada, K., A. Inoue, M. Okada, Y. Murata, S. Kakuta, T. Jigami, S. Kubo, H. Shiraishi, K. Eguchi, M. Motomura, T. Akiyama, Y. Iwakura, O. Higuchi and Y. Yamanashi (2006). The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312(5781): 1802-1805.
- 156 Palandri, A., V. R. Salvador, J. Wojnacki, A. L. Vivinetto, R. L. Schnaar and P. H. H. Lopez (2015). Myelin-associated glycoprotein modulates apoptosis of motoneurons during early postnatal development via NgR/p75NTR receptor-mediated activation of RhoA signaling pathways. *Cell Death & Disease* 6(9): e1876-e1876.
- 157 Patton, B. L. (2003). Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *J Neurocytol* 32(5-8): 883-903.
- 158 Patton, B. L., J. M. Cunningham, J. Thyboll, J. Kortessmaa, H. Westerblad, L. Edstrom, K. Tryggvason and J. R. Sanes (2001). Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci* 4(6): 597-604.
- 159 Pedraza, C. E., P. Podlesniy, N. Vidal, J. C. Arevalo, R. Lee, B. Hempstead, I. Ferrer, M. Iglesias and C. Espinet (2005). Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol* 166(2): 533-543.
- 160 Pérez-García, María J. and Steven J. Burden (2012). Increasing MuSK Activity Delays Denervation and Improves Motor Function in ALS Mice. *Cell Reports* 2(3): 497-502.
- 161 Peterson, D. A., H. A. Dickinson-Anson, J. T. Leppert, K. F. Lee and F. H. Gage (1999). Central neuronal loss and behavioral impairment in mice lacking neurotrophin receptor p75. *J Comp Neurol* 404(1): 1-20.
- 162 Plomp, J. J., M. Morsch, W. D. Phillips and J. J. G. M. Verschuuren (2015). Electrophysiological analysis of neuromuscular synaptic function in myasthenia gravis patients and animal models. *Experimental Neurology* 270: 41-54.

- 163 Poort, J. E., M. B. Rheuben, S. M. Breedlove and C. L. Jordan (2016). Neuromuscular junctions are pathological but not denervated in two mouse models of spinal bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 25(17): 3768-3783.
- 164 Pozzo-Miller, L. D., W. Gottschalk, L. Zhang, K. McDermott, J. Du, R. Gopalakrishnan, C. Oho, Z. H. Sheng and B. Lu (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19(12): 4972-4983.
- 165 Proszynski, T. J., J. Gingras, G. Valdez, K. Krzewski and J. R. Sanes (2009). Podosomes are present in a postsynaptic apparatus and participate in its maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(43): 18373-18378.
- 166 Reddypalli, S., K. Roll, H.-K. Lee, M. Lundell, E. Barea-Rodriguez and E. F. Wheeler (2005). p75NTR-mediated signaling promotes the survival of myoblasts and influences muscle strength. *Journal of Cellular Physiology* 204(3): 819-829.
- 167 Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1545-1564.
- 168 Rende, M., E. Brizi, G. Sorci, R. Bianchi, C. Provenzano, R. Bruno and R. Donato (1999). Regulation of the p75 neurotrophin receptor in a rat myogenic cell line (L6). *Histochem J* 31(9): 589-601.
- 169 Richter, F., J. Gerstenberger, A. Bauer, C.-C. Liang and A. Richter (2017). Sensorimotor tests unmask a phenotype in the DYT1 knock-in mouse model of dystonia. *Behavioural Brain Research* 317: 536-541.
- 170 San Martin, L., F. Cerda, C. Jin, V. Jimenez, G. E. Yevenes, T. Hernandez, D. Nova, J. Fuentealba, L. G. Aguayo and L. Guzman (2016). Reversal of Ethanol-induced Intoxication by a Novel Modulator of G β Protein Potentiation of the Glycine Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 291(36): 18791-18798.
- 171 Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22: 389-442.
- 172 Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2(11): 791-805.
- 173 Sato, K., C. Sumi-Ichinose, R. Kaji, K. Ikemoto, T. Nomura, I. Nagatsu, H. Ichinose, M. Ito, W. Sako, S. Nagahiro, A. M. Graybiel and S. Goto (2008). Differential involvement of striosome and matrix dopamine systems in a transgenic model of dopa-responsive dystonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(34): 12551-12556.
- 174 Schmidt, N., S. Basu, S. Sladeczek, S. Gatti, J. van Haren, S. Treves, J. Pielage, N. Galjart and H. R. Brenner (2012). Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular junction synaptic membrane. *J Cell Biol* 198(3): 421-437.
- 175 Seidah, N. G., S. Benjannet, S. Pareek, M. Chretien and R. A. Murphy (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 379(3): 247-250.
- 176 Seidl, K., C. Erck and A. Buchberger (1998). Evidence for the participation of nerve growth factor and its low-affinity receptor (p75NTR) in the regulation of the myogenic program. *J Cell Physiol* 176(1): 10-21.
- 177 Sharma, N., C. D. Deppmann, A. W. Harrington, C. St Hillaire, Z. Y. Chen, F. S. Lee and D. D. Ginty (2010). Long-distance control of synapse assembly by target-derived NGF. *Neuron* 67(3): 422-434.
- 178 Slater, C. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2183.
- 179 Slater, C. R. (2008). Structural Factors Influencing the Efficacy of Neuromuscular Transmission. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1132(1): 1-12.
- 180 Song, X.-Y., F. H. H. Zhou, J.-H. Zhong, L. L. Y. Wu and X.-F. Zhou (2006). Knockout of p75NTR impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. *Journal of Neurochemistry* 96(3): 833-842.

- 181 Stucky, C. L. and M. Koltzenburg (1997). The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J Neurosci* 17(11): 4398-4405.
- 182 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.
- 183 Tartaglia, N., J. Du, W. J. Tyler, E. Neale, L. Pozzo-Miller and B. Lu (2001). Protein Synthesis-dependent and -independent Regulation of Hippocampal Synapses by Brain-derived Neurotrophic Factor. *Journal of Biological Chemistry* 276(40): 37585-37593.
- 184 Terenzio, M., M. Golding, M. R. G. Russell, K. B. Wicher, I. Rosewell, B. Spencer-Dene, D. Ish-Horowicz and G. Schiavo (2014). Bicaudal-D1 regulates the intracellular sorting and signalling of neurotrophin receptors. *The EMBO Journal* 33(14): 1582-1598.
- 185 Tomas, J., N. Garcia, M. A. Lanuza, M. M. Santafe, M. Tomas, L. Nadal, E. Hurtado, A. Simo and V. Cilleros (2017). Presynaptic Membrane Receptors Modulate ACh Release, Axonal Competition and Synapse Elimination during Neuromuscular Junction Development. *Front Mol Neurosci* 10: 132.
- 186 Troy, C. M., J. E. Friedman and W. J. Friedman (2002). Mechanisms of p75-mediated Death of Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 277(37): 34295-34302.
- 187 Tyler, W. J. and L. D. Pozzo-Miller (2001). BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21(12): 4249-4258.
- 188 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.
- 189 Valenzuela, D. M., T. N. Stitt, P. S. DiStefano, E. Rojas, K. Mattsson, D. L. Compton, L. Nunez, 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.
- 190 Valtorta, F., N. Iezzi, F. Benfenati, B. Lu, M. M. Poo and P. Greengard (1995). Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* 7(2): 261-270.
- 191 Vera, G., A. Chiarlone, P. A. Cabezos, D. Pascual, M. I. Martín and R. Abalo (2007). WIN 55,212-2 prevents mechanical allodynia but not alterations in feeding behaviour induced by chronic cisplatin in the rat. *Life Sciences* 81(6): 468-479.
- 192 Vilar, M., I. Charalampopoulos, R. S. Kenchappa, A. Simi, E. Karaca, A. Reversi, S. Choi, M. Bothwell, I. Mingarro, W. J. Friedman, G. Schiavo, P. I. H. Bastiaens, P. J. Verveer, B. D. Carter and C. F. Ibáñez (2009). Activation of the p75 Neurotrophin Receptor through Conformational Rearrangement of Disulphide-Linked Receptor Dimers. *Neuron* 62(1): 72-83.
- 193 Volosin, M., C. Trotter, A. Cragolini, R. S. Kenchappa, M. Light, B. L. Hempstead, B. D. Carter and W. J. Friedman (2008). Induction of Proneurotrophins and Activation of p75NTR-Mediated Apoptosis via Neurotrophin Receptor-Interacting Factor in Hippocampal Neurons after Seizures. *Journal of Neuroscience* 28(39): 9870-9879.
- 194 Wang, T., K. Xie and B. Lu (1995). Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses. *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4796-4805.
- 195 Wang, X. H. and M. M. Poo (1997). Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron* 19(4): 825-835.
- 196 Weston, C., C. Gordon, G. Teressa, E. Hod, X. D. Ren and J. Prives (2003). Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J Biol Chem* 278(8): 6450-6455.
- 197 Weston, C., B. Yee, E. Hod and J. Prives (2000). Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 150(1): 205-212.

- 198 Wheeler, E. F. and M. Bothwell (1992). Spatiotemporal patterns of expression of NGF and the low-affinity NGF receptor in rat embryos suggest functional roles in tissue morphogenesis and myogenesis. *J Neurosci* 12(3): 930-945.
- 199 Woehlbier, U., A. Colombo, M. J. Saaranen, V. Perez, J. Ojeda, F. J. Bustos, C. I. Andreu, M. Torres, V. Valenzuela, D. B. Medinas, P. Rozas, R. L. Vidal, R. Lopez-Gonzalez, J. Salameh, S. Fernandez-Collemani, N. Munoz, S. Matus, R. Armisen, A. Sagredo, K. Palma, T. Irrazabal, S. Almeida, P. Gonzalez-Perez, M. Campero, F. B. Gao, P. Henny, B. van Zundert, L. W. Ruddock, M. L. Concha, J. P. Henriquez, R. H. Brown and C. Hetz (2016a). ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *EMBO J* 35(8): 845-865.
- 200 Woehlbier, U., A. Colombo, M. J. Saaranen, V. Pérez, J. Ojeda, F. J. Bustos, C. I. Andreu, M. Torres, V. Valenzuela, D. B. Medinas, P. Rozas, R. L. Vidal, R. Lopez-Gonzalez, J. Salameh, S. Fernandez-Collemani, N. Muñoz, S. Matus, R. Armisen, A. Sagredo, K. Palma, T. Irrazabal, S. Almeida, P. Gonzalez-Perez, M. Campero, F. B. Gao, P. Henny, B. van Zundert, L. W. Ruddock, M. L. Concha, J. P. Henriquez, R. H. Brown and C. Hetz (2016b). ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *The EMBO Journal* 35(8): 845-865.
- 201 Wu, H., W. C. Xiong and L. Mei (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137(7): 1017-1033.
- 202 Xie, K., T. Wang, P. Olafsson, K. Mizuno and B. Lu (1997). Activity-dependent expression of NT-3 in muscle cells in culture: implications in the development of neuromuscular junctions. *J Neurosci* 17(9): 2947-2958.
- 203 Yan, Q. and E. M. Johnson, Jr. (1988). An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci* 8(9): 3481-3498.
- 204 Yang, F., H.-S. Je, Y. Ji, G. Nagappan, B. Hempstead and B. Lu (2009). Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. *The Journal of Cell Biology* 185(4): 727-741.
- 205 Yang, J., B. Dominguez, F. de Winter, T. W. Gould, J. E. Eriksson and K.-F. Lee (2011). Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature Neuroscience* 14(3): 324-330.
- 206 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.
- 207 Yeo, T. T., J. Chua-Couzens, L. L. Butcher, D. E. Bredesen, J. D. Cooper, J. S. Valletta, W. C. Mobley and F. M. Longo (1997). Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation. *J Neurosci* 17(20): 7594-7605.
- 208 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): ENEURO.0232-0217.2017.
- 209 Zanin, J. P., E. Abercrombie and W. J. Friedman (2016). Proneurotrophin-3 promotes cell cycle withdrawal of developing cerebellar granule cell progenitors via the p75 neurotrophin receptor. *Elife* 5.
- 210 Zhang, J., J. L. Lefebvre, S. Zhao and M. Granato (2004). Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice. *Nat Neurosci* 7(12): 1303-1309.