



Universidad de Concepción

Facultad de Farmacia

**ESTUDIO DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL
RECEPTOR DE NEUROTROFINAS P75 EN LA SINAPSIS
NEUROMUSCULAR Y EN LA FIBRA MUSCULAR
DURANTE EL ENVEJECIMIENTO**

POR IGNACIO SEBASTIÁN AEDO CARES

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico/título profesional de Bioquímico

Profesor guía/ Profesor patrocinante: Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesora co-guía: Dra. Viviana Pérez Fernández
Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Agosto, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor de tesis Dr. Juan Pablo Henríquez por su contribución en mi formación tanto como persona, como estudiante y como científico, además de permitirme desarrollar esta Tesis en su laboratorio. A mi cotutora Dra. Viviana Pérez por su ayuda y enseñanza cuando ingresé al laboratorio, por su gran disposición, carisma y cariño. A mis compañeros del Laboratorio de Estudios Neuromusculares: Francisca Bernedo, Jessica Mella, Angelymar Medina, Ian Torres y Diego Zelada por todos sus consejos y enseñanzas para la realización de este trabajo.

Al Centro de Microscopía Avanzada (CMA-Biobío) por facilitar sus dependencias y equipos para la visualización de mis experimentos y a su personal siempre dispuesto a apoyar la investigación de estudiantes de la Universidad de Concepción.

A mis amigos de la carrera, Pablo, Camilo, Carol, Catalina, Luis, entre otros, quienes siempre estuvieron apoyando mi trabajo y permitiéndome parte de su tiempo para ensayar y mejorar, gracias a sus comentarios, este trabajo.

Finalmente, a mi familia, en especial a mi madre y padre, quienes siempre creyeron en mi carrera a pesar de no entender mucho a que me dedicaba. A mis hermanos Rocío, Rodrigo, Máximo y Maderick, quienes a pesar de la distancia siempre me apoyaron.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 La Unión Neuromuscular	5
3.1.1 Formación de la UNM	6
3.1.2 Maduración de la UNM	8
3.2 La UNM y la fibra muscular en el envejecimiento	12
3.2.1 Envejecimiento muscular	12
3.2.2 Envejecimiento de la unión neuromuscular	14
3.2.3 Rescate del envejecimiento en la UNM y la fibra muscular	17
3.3 La vía de señalización de Neurotrofinas	19
3.3.1 Neurotrofinas en la UNM y la fibra muscular	20
3.4 El receptor de neurotrofinas p75	24
3.4.1 El receptor p75 durante el envejecimiento	27
3.4.2 El receptor p75 en la UNM	28
4. HIPOTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL	31
5.1 Objetivos Específicos	31
6. MATERIALES	32
6.1 Animales de experimentación	32
6.2 Anticuerpos	32
6.3 Reactivos y soluciones en general	35
6.4 Kits comerciales	36
6.5 Materiales en general y equipos disponibles	36
7. MÉTODOS	38
7.1 Análisis Histológicos	38
7.1.1 Obtención de muestras	38
7.1.2 Tinción histoquímica para revelar la actividad NADH-Tiorreductasa	38

7.1.3	Adquisición de imágenes	39
7.1.4	Cuantificación del área de sección transversal	39
7.1.5	Cuantificación de los distintos tipos de fibra muscular	40
7.1.6	Tinción WGA-DAPI	40
7.2	Estudio de la dinámica del AChR	41
7.2.1	Cuantificación del recambio y densidad de AChRs en el músculo LAL	42
7.3	Western Blot	42
7.3.1	Extractos de proteínas totales	42
7.3.2	Cuantificación de proteínas	43
7.3.3	Electroforesis de proteínas	43
7.3.4	Transferencia a membrana de PVDF	44
7.3.5	Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado	45
7.3.6	Cuantificación de la intensidad de bandas	45
7.4	Inmunohistoquímica	46
7.4.1	Obtención de las muestras	46
7.4.2	Inmunohistoquímica del músculo Lumbrical y Levator Auris Longus.....	46
7.4.3	Inmunohistoquímica de fibronectina del músculo Tibial Anterior	47
7.5	Análisis de Imágenes	48
7.5.1	Adquisición de imágenes	48
7.5.2	Análisis de la morfología del aparato postsináptico	48
7.5.3	Análisis de la morfología del terminal presináptico.....	51
7.5.4	Análisis de área, perímetro y diámetro de Feret de los componentes de la UNM.....	53
7.5.5	Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico	53
7.5.6	Cuantificación de la aposición entre los diferentes componentes de la UNM.....	54
7.5.7	Cuantificación del número de células de Schwann terminales por UNM.....	54
7.6	Análisis Estadístico	57
8.	RESULTADOS.....	58

8.1 Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre el terminal postsináptico durante el envejecimiento	59
8.2 Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre las alteraciones del terminal presináptico durante el envejecimiento de la UNM.	65
8.3 Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre la innervación de la UNM envejecida.	69
8.4 Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la morfología y número de células de Schwann terminales durante el envejecimiento	72
8.5 Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre la estabilidad de los AChRs.....	75
8.6 Análisis de la composición de los AChRs ante el silenciamiento del receptor p75 durante el envejecimiento	79
8.7 Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la morfología de las fibras musculares durante el envejecimiento	82
8.8 Fibrosis, regeneración y atrofia muscular ante la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento	85
9. DISCUSIÓN	89
9.1 Rol de p75 sobre la arquitectura de la UNM durante el envejecimiento	91
9.2 Rol de p75 sobre el aparato postsináptico durante el envejecimiento	96
9.3 Estabilidad, densidad y conformación de AChRs en ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento	99
9.4 Efectos de p75 en las fibras musculares durante el envejecimiento	101
10. CONCLUSIÓN	104
11. ANEXOS	107
12. GLOSARIO	109
13. BIBLIOGRAFÍA	110

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Formación, maduración y mantención de la UNM	10
Figura 2	Alteraciones morfológicas de la UNM envejecida	16
Figura 3	Señalización mediada por p75	25
Figura 4	Clasificación morfológica de los aparatos postsinápticos	50
Figura 5	Anormalidades del terminal presináptico durante el envejecimiento	52
Figura 6	Núcleos de células de Schwann terminales por UNM	56
Figura 7	La ausencia del receptor p75 no afecta fragmentación del aparato postsináptico, pero si su complejidad	61
Figura 8	La ausencia del receptor p75 produce alteraciones músculo dependientes en el área y perímetro del aparato postsináptico	64
Figura 9	La ausencia del receptor p75 no provoca cambios en las alteraciones que ocurren en el terminal presináptico durante el envejecimiento.	67
Figura 10	La ausencia del receptor p75 genera una disminución en la innervación de las UNMs	70
Figura 11	La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la morfología de las células de Schwann terminales	73
Figura 12	La ausencia del receptor p75 disminuye la estabilidad y densidad de los AChRs	77
Figura 13	La ausencia del receptor p75 no influye en la expresión de las subunidades gama y épsilon del AChR durante el envejecimiento	80
Figura 14	La ausencia del receptor p75 no altera la proporción de tipos de fibras musculares, pero disminuye el calibre de las fibras rápidas	83
Figura 15	La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en la regeneración, fibrosis y atrofia muscular	87
Figura 16	Resumen de los cambios observados durante el envejecimiento de la UNM y la fibra muscular frente al silenciamiento del receptor p75.	105

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Formación, maduración y mantención de la UNM	33
Tabla 2	Anticuerpos secundarios utilizados	34

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 UNM adulta posee una morfología denominada tipo pretzel, que es inervada por un terminal axonal de calibre constante y cubierta por 3 a 5 células de Schwann terminales. Aun cuando esta estructura de la UNM acompaña la vida madura de muchas especies, durante el envejecimiento los tres componentes celulares que conforman esta sinapsis presentan alteraciones en su arquitectura que se acompañan de anomalías funcionales y morfológicas de las fibras musculares. Creciente evidencia ha señalado que vías de señalización activadas por la unión de neurotrofinas a sus receptores Trks son reguladoras clave de la función, mantención y organización estructural de la UNM. Específicamente, el receptor de neurotrofinas p75, que señala junto a las neurotrofinas, pro-neurotrofinas y receptores Trks, se expresa en los tres componentes de la UNM adulta; sin embargo, su función en la UNM envejecida es desconocida. Para determinar el efecto del receptor de neurotrofinas p75 sobre las alteraciones de la UNM y de la fibra muscular durante el envejecimiento, se caracterizó morfológica y molecularmente la sinapsis neuromuscular de ratones nulos para la expresión de este receptor. Los resultados obtenidos a través de análisis mediante microscopía confocal 3D indican que la ausencia del

receptor p75 disminuye la inervación del terminal postsináptico y la superposición de las células de Schwann terminales con el terminal axonal. A nivel postsináptico, la ausencia de p75 resultó en un aumento del recambio de receptores de acetilcolina (AChRs) y en músculos de fenotipo envejecido tardío, como el Levator auris longus, la complejidad morfológica de la estructura postsináptica se vio disminuida. A nivel muscular, se observó un aumento en la proporción de fibras musculares rápidas con calibre pequeño sin afectarse las fibras musculares lentas. Tampoco se observaron variaciones en la fibrosis, atrofia o ciclos de daño y regeneración muscular.

Estos resultados sugieren que el receptor p75 es requerido para el mantenimiento de la UNM envejecida, permitiendo una mayor superposición de las células de Schwann terminales con el terminal axonal, regulando la inervación de los aparatos postsinápticos y la estabilidad de los AChRs.

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is a peripheral cholinergic synapse formed among a motor axon, a skeletal muscle fiber, and terminal Schwann cells. The adult NMJ has a so-called “pretzel-like” morphology which is innervated by an axon terminal with constant caliber and covered by 3 to 5 terminal Schwann cells. Even though the structure of the NMJ accompanies the mature life of many species, during aging the three cellular components that make up this synapse exhibit alterations in their architecture that are accompanied by functional and morphological abnormalities of the muscle fibers. Increasing evidence has indicated that signaling pathways activated by the binding of neurotrophins to their Trk receptors are key regulators of the function, maintenance, and structural organization of the NMJ. Specifically, the p75 neurotrophin receptor, which signals along with neurotrophins, pro-neurotrophins, and Trk receptors, is expressed in all three components of the adult NMJ; however, its function in the aged NMJ is unknown. To determine the effect of this neurotrophin receptor on the NMJ and muscle fiber alterations during aging, the neuromuscular synapse of p75 receptor knockout mice (KOp75) was characterized morphologically and molecularly. The obtained results indicate that the absence of the p75 neurotrophin receptor decreases the innervation of the postsynaptic terminal concomitant with smaller area of the presynaptic terminal. The overlap of terminal

Schwann cells with the axon terminal also decreases and is accompanied by a reduction in the area of this cell type. In the postsynaptic structure. The absence of p75 increases the turnover of acetylcholine receptors (AChRs) and in muscles with a late-aging phenotype, such as the Levator auris longus muscle, it decreases the morphological complexity of the postsynaptic structure. At the muscle level, we observed an increase in the proportion of fast muscle fibers with small caliber without affecting the slow muscle fibers or variations in fibrosis, atrophy, or cycles of muscle damage and regeneration.

These results suggest that p75 neurotrophin receptor is required for the maintenance of the aged NMJ, allowing a greater overlap of terminal Schwann cells with the axon terminal, regulating the innervation of the postsynaptic apparatus, the stability of AChRs, and likely the functionality of this synaps

INTRODUCCIÓN

La Unión Neuromuscular

La unión neuromuscular (UNM) es una sinapsis periférica colinérgica formada por el terminal axónico de una motoneurona, una fibra muscular esquelética y células de Schwann terminales. La UNM ha sido utilizada como modelo arquetípico para estudiar la formación, mantención y regeneración de sinapsis debido en gran parte a su fácil accesibilidad y mayor tamaño respecto a la sinapsis del sistema nervioso central [1]. La correcta transmisión de esta sinapsis requiere de la señalización coordinada entre sus tres componentes y es crucial para gatillar la contracción muscular y, por ende, generar el movimiento coordinado de diversos organismos. Sin embargo, diversas condiciones pueden generar alteraciones en la organización de la UNM que repercuten en la contracción y morfología muscular, por lo que es relevante el entendimiento de los mecanismos que controlan el correcto funcionamiento de esta sinapsis para el estudio y posterior tratamiento de patologías motoras [2, 3].

El movimiento anatómico de los seres vivos necesita de una rápida y precisa comunicación neuromuscular. Para ello, es necesaria una fina sincronización entre el componente pre y postsináptico de la UNM que permita la eficiente transmisión neuromuscular. Así, frente a potenciales de acción provenientes del Sistema Nervioso Central, los terminales axonales de la motoneurona liberan

acetilcolina (ACh), la que se une a receptores de acetilcolina (AChR) nicotínicos ubicados en la membrana de la fibra muscular para gatillar la contracción muscular. Moléculas secretadas por la motoneurona, la fibra muscular y las células de Schwann terminales regulan coordinadamente la formación, maduración, mantención y regeneración de la UNM [2, 3].

Formación de la UNM

En la sinaptogénesis de la UNM, previo al contacto de los axones motores, existen agregados del AChR distribuidos por la membrana de los miotubos (precursor de las fibras musculares) en una organización conocida como “prepatrón”. Con el contacto del terminal axonal motor, los agregados se redistribuyen y son concentrados a través de tres diferentes procesos: la agregación de los AChRs en la zona del contacto axonal, el incremento en la transcripción del AChR en los núcleos de las fibras musculares contiguos la sinapsis, también llamados núcleos subsinápticos, y la represión transcripcional del AChR y otros genes del dominio postsináptico en los núcleos extrasinápticos [3]. Diversas señales regulan la redistribución de agregados del AChR. La mejor estudiada es la señalización mediada por agrina, un proteoglicán liberado por la motoneurona que se une a los receptores Lrp4/MuSK en la membrana muscular. A través de la activación de la vía dependiente de agrina, se reclutan diversas proteínas intracelulares como Rapsina, Dok7 y Tid1, las que participan en la inducción y mantención de agregados del AChR en la membrana muscular [2, 4]. Es importante mencionar que igualmente existen señales que regulan de manera

negativa la agregación del AChR. Específicamente, se ha descrito que el neurotransmisor ACh dispersa a los agregados del AChR que no se encuentran innervados, a través de un mecanismo que resulta en la activación de la proteína quinasa Cdk5, que resulta en la fosforilación de la proteína de filamentos intermedios nestina, evento que desorganiza al andamiaje intracelular que mantiene la agregación de dichos receptores en regiones sinápticas de la fibra muscular [5, 6].

Por su parte, las células de Schwann migran junto al crecimiento del axón motor para formar distintas poblaciones. Por una parte, las células de Schwann que forman las vainas de mielina y, por otra, las células de Schwann terminales o Células de Schwann perisinápticas, que contactan a la placa motora. Estas últimas células no producen mielina y por su íntima interacción con los terminales nerviosos y las fibras musculares se han asociado a la formación, modulación de la actividad sináptica y regeneración de la UNM frente a injuria al nervio [2]. La evidencia señala que las células de Schwann expresan moléculas como N- y E-cadherinas, las que están implicadas en la estabilidad de las sinapsis [7]. Estudios en estadios embrionarios de ratones que no expresan el receptor de neuregulinas ErbB2 no presentan células de Schwann en los nervios periféricos ni en la sinapsis, lo que ha permitido demostrar la importancia de este tipo celular. En este modelo, los terminales nerviosos motores emiten proyecciones hasta las fibras musculares; sin embargo, debido al escaso desarrollo de estos procesos citoplasmáticos, se retraen provocando la muerte en estadios perinatales [8].

Completada la etapa embrionaria de la sinaptogénesis neuromuscular, las UNMs son inervadas por dos o más axones motores (poli-inervados) y los agregados de AChRs se distribuyen en forma homogénea en la zona de contacto con el axón motor, estructura morfológica conocida como placa (Figura 1) [1, 2, 6, 7].

Maduración de la UNM

Para adquirir su forma madura, los dominios pre y postsináptico de la UNM experimentan modificaciones en etapas postnatales tempranas [2, 9]. La maduración presináptica ocurre mediante la retracción de los terminales axonales que poli-inervan a los aparatos postsinápticos para dar lugar a una sinapsis mono-inervada. A nivel ultraestructural, aumentan el número de zonas activas, que son regiones del terminal axonal donde las vesículas con ACh son concentradas y liberadas (Figura 1) [4]. Respecto a la maduración postsináptica, las placas de agregados del AChR aumentan su tamaño y complejidad, dando origen a una morfología que alterna zonas de alta densidad con zonas de baja densidad del AChR denominada tipo “pretzel”, característica de UNMs maduras. A nivel ultraestructural, la membrana muscular sináptica se invagina y forma plegamientos funcionales, también llamados pliegues secundarios, donde los AChRs son concentrados en las crestas de las invaginaciones, en directa aposición a las zonas activas del terminal presináptico (Figura 1) [10, 11]. Además, a nivel molecular, ocurre un cambio en las subunidades que constituyen los AChRs desde la conformación $\alpha 2\beta\gamma\delta$ hacia una conformación $\alpha 2\beta\epsilon\delta$. El

cambio de la subunidad gama (fetal) por la subunidad épsilon (madura), resulta en modificaciones de las propiedades de transmisión y cinéticas del AChR [4, 12].

Múltiples señales liberadas por los tres componentes de la UNM regulan su maduración y llevan al establecimiento de una UNM estable, morfológica y funcionalmente, que acompaña la vida adulta de los organismos. Sin embargo, hacia la etapa de envejecimiento, se generan alteraciones funcionales, morfológicas y moleculares de la UNM que llevan potencialmente a fallas en la transmisión sináptica y, por ende, en la contracción muscular.

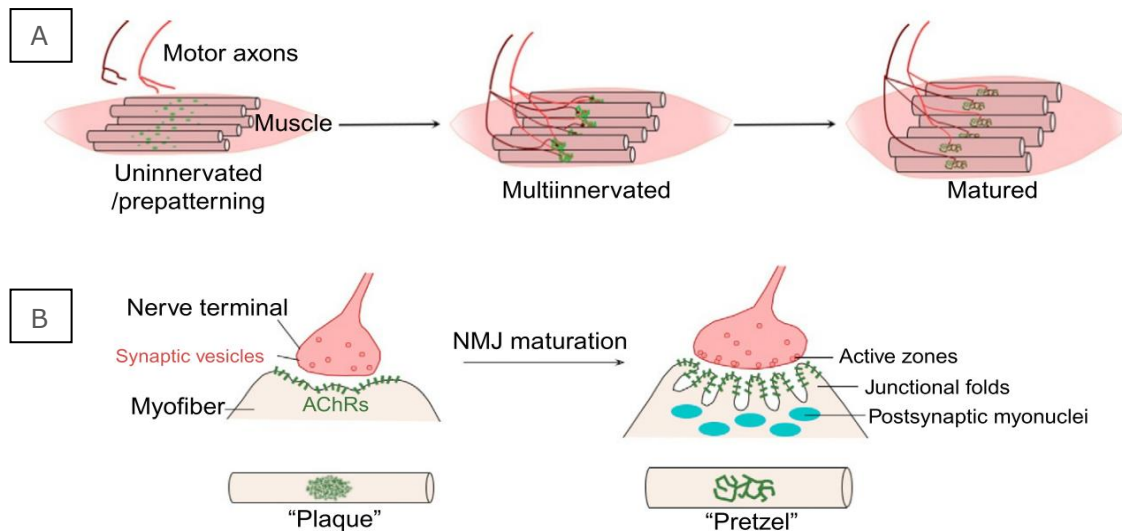


Figura 1: Formación, maduración y mantenimiento de la UNM.

(A) Formación de la UNM. Previo al arribo del terminal axonal, sobre la superficie de las fibras musculares recientemente diferenciadas se forman agregados pequeños del AChR, lo que se conoce como "prepatrón". Luego, las motoneuronas inervan algunos agregados y aquellos no inervados son reagrupados o dispersados. En esta etapa, los agregados de AChR son poli-inervados por dos o más axones. Durante estadíos perinatales ocurre la maduración de la UNM dando origen a su morfología madura. (B) La maduración de la UNM postnatal conlleva la invaginación de la membrana postsináptica formando los pliegues secundarios y la concentración de los AChRs en las crestas de estos pliegues, lo que correlaciona con un cambio en la forma de la UNM a la estructura tipo pretzel. A nivel presináptico, aumenta el número de zonas activas y se elimina la poli-inervación, adquiriéndose un alineamiento

perfecto entre el terminal axonal presináptico con los agregados del AChR
(Modificado de [4]).

La UNM y la fibra muscular en el envejecimiento

El envejecimiento es un proceso fisiológico e irreversible, cuyas manifestaciones fenotípicas dependen de diversos factores, tales como la composición genética del organismo, el estilo de vida y la exposición a factores ambientales [13]. Trabajos de décadas han establecido al ratón de laboratorio como excelente modelo de envejecimiento humano, pues posee una esperanza de vida relativamente corta con estadíos bien definidos (joven, 2-6 meses; mediana edad, 10-14 meses; envejecido, 18 meses o más) permitiendo estudiar detalladamente los cambios genéticos y fenotípicos del envejecimiento en un robusto modelo de mamífero [14]. Se han documentado los cambios fisiológicos a causa del envejecimiento en ratones, incluyendo la cognición, composición corporal, actividad eléctrica cardíaca y también el declive de la función motora [14]. Específicamente a nivel de la UNM y la fibra muscular, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la inflamación y la neurodegeneración son factores que han sido asociados con las alteraciones que ocurren durante el envejecimiento [15].

Envejecimiento muscular

Una manifestación fenotípica negativa del envejecimiento es la pérdida de la función y masa muscular, proceso denominado sarcopenia, que a nivel celular se manifiesta en una reducción en el número y calibre de las fibras musculares [16, 17]. Un factor que se asocia a la atrofia muscular por el envejecimiento es la

acumulación de fibras musculares que presentan distintos grados de denervación. En ratones envejecidos, se ha observado que las fibras musculares denervadas disminuyen entre un 30-50% su calibre, mientras que las innervadas son sólo 7% más pequeñas respecto a ratones jóvenes [18]. Además, se ha reportado que durante el envejecimiento ocurre una transición del tipo de fibras que componen los músculos, disminuyendo las fibras de tipo II o también llamadas fibras rápidas, de metabolismo principalmente glicolítico, a expensas de un aumento de las fibras de tipo I o fibras lentas, de metabolismo principalmente oxidativo, lo que provoca cambios en la fuerza y resistencia muscular [19]. Otra característica del envejecimiento muscular es el aumento de la fibrosis, caracterizada por un incremento de los componentes de la matriz extracelular que se depositan entre las fibras musculares, como colágeno o fibronectina [20]. Este aumento del tejido conectivo altera las propiedades estructurales y funcionales, como también la capacidad regenerativa del músculo esquelético [21]. Además, se observa una mayor proporción de fibras musculares con núcleos centrales, lo que indica la existencia de ciclos de daño y regeneración muscular [22].

Una de las principales causas que se asocia a la sarcopenia corresponde a la denervación de la UNM [18, 23, 24]. Por lo anterior, a continuación, se presentarán varios estudios que se han enfocado en entender los mecanismos que podrían contribuir a la desestabilización de la UNM y la subsecuente denervación de la placa motora, estrechamente asociadas a la sarcopenia.

Envejecimiento de la unión neuromuscular

En individuos envejecidos, la UNM presenta alteraciones morfológicas que se han propuesto como la principal causa asociada al declive de la función y la masa muscular características de la sarcopenia [15]. Estudios en ratones reportan alteraciones de los tres componentes celulares que conforman la UNM durante el envejecimiento [25-27]. A nivel presináptico, los axones motores se vuelven más delgados y contienen ensanchamientos o varicosidades. Algunos agregados del AChR pierden parcial o totalmente su innervación como otros son innervados por múltiples axones. También se ha descrito la aparición de “fibras de escape”, definidas como ramas del terminal axonal que se extienden desde el borde de una UNM (Figura 2) [25]. Adicionalmente, el análisis ultraestructural por tinción inmunohistoquímica contra la proteína Bassoon (proteína de andamiaje citosólica necesaria para la agregación de vesículas sinápticas en la membrana) revela que disminuye la concentración de vesículas sinápticas adosadas a la membrana del terminal axonal, lo que se traduce en una disminución del número de zonas activas [28].

Por otra parte, las células terminales de Schwann alteran su organización, de manera que sus cuerpos celulares son más pequeños y que ellos cubren parcialmente la UNM o bien abandonan la sinapsis. Estudios en modelos murinos señalan que, a medida que envejecen, las UNMs van perdiendo el contacto con las células terminales de Schwann, [29, 30]. A nivel morfológico, las células terminales de Schwann envejecidas presentan una estructura con procesos

delgados y desorganizados, e incluso emiten proyecciones que invaden la hendidura sináptica [31].

En el envejecimiento, el aparato postsináptico se fragmenta, generando agregados del AChR pequeños y no contiguos (lo que constituye un marcador morfológico del envejecimiento de la UNM), como también aparecen agregados del receptor en zonas extrasinápticas. También disminuye la profundidad de los pliegues secundarios, lo que genera un deterioro funcional de la respuesta postsináptica que se ve reflejado en alteraciones electrofisiológicas [15, 32, 33]. Adicionalmente, se genera un aumento de la expresión de las subunidades alfa, épsilon y gama del AChR [24, 27].

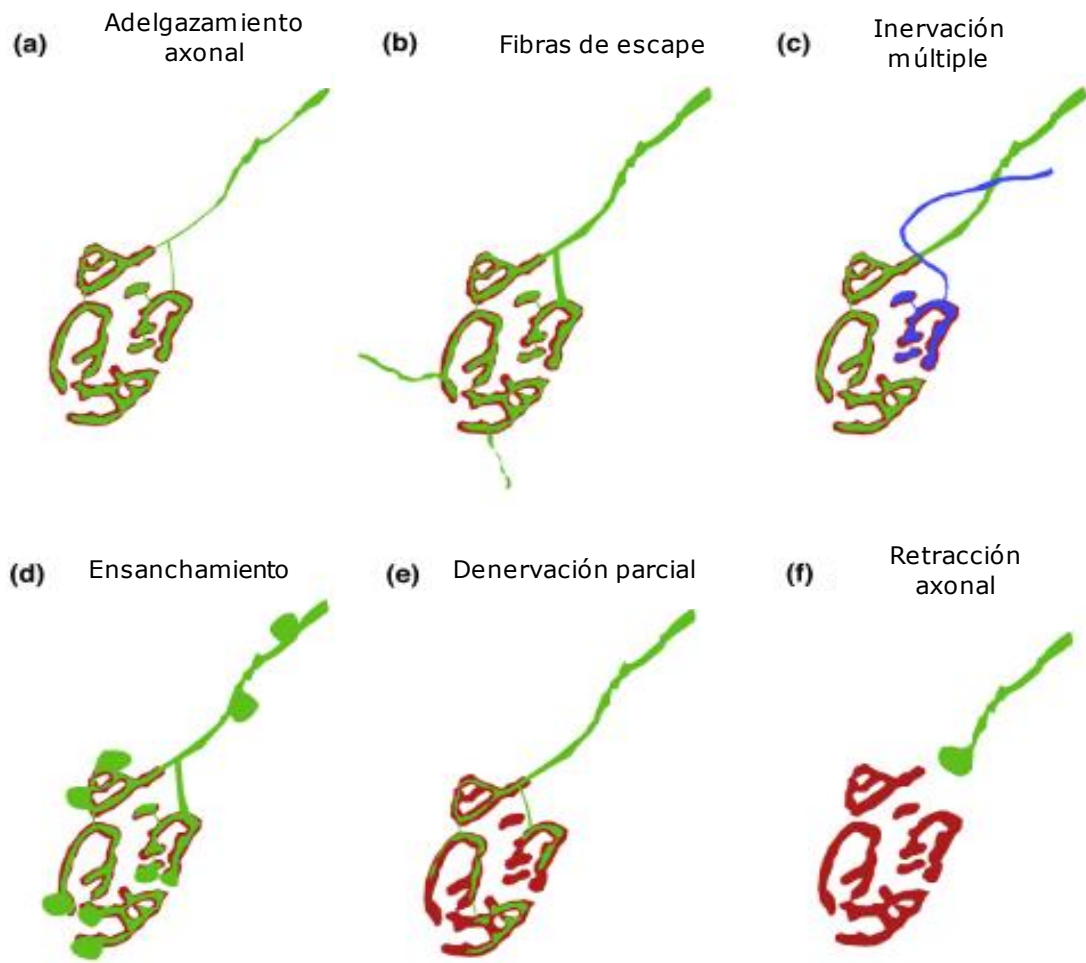


Figura 2: Alteraciones morfológicas de la UNM envejecida.

(a) Reducción del diámetro axonal **(b)** Emisión de proyecciones axonales que no se corresponden con el terminal postsináptico. **(c)** Poli-inervación de aparatos postsinápticos por dos o más terminales axonales. **(d)** Ensanchamientos axonales tanto en la UNM (intrasinápticos) como en el terminal axonal (extrasinápticos). **(e)** Reducción en la cobertura del aparato postsináptico dando origen a UNM parcialmente inervadas. **(f)** Pérdida de la conexión entre los terminales pre y postsinápticos (Extraído de [25]).

Rescate del envejecimiento en la UNM y la fibra muscular

Aun cuando durante el envejecimiento la UNM presenta alteraciones morfológicas y funcionales, variados estudios se han enfocado en el mantenimiento de esta sinapsis y, por ende, a la prevención de la sarcopenia. Por ejemplo, se ha reportado que tanto la restricción calórica como el ejercicio físico disminuyen la proporción de UNMs fragmentadas y denervadas como también la aparición de AChRs en zonas extrasinápticas de la membrana muscular en distintos músculos [26, 34]. En relación con la restricción calórica, el resveratrol y la metformina, dos moléculas que simulan esta condición, disminuyen el envejecimiento de la UNM y preservan la morfología de las fibras musculares [34].

Los mecanismos que subyacen a los efectos benéficos del ejercicio y la restricción calórica no han sido del todo dilucidados. En este contexto, se ha descrito que en músculos humanos el ejercicio aumenta la expresión de moléculas de la matriz extracelular, incluyendo la proteína Laminina $\beta 2$ que se asocia con canales de calcio dependientes de voltaje, los cuales interactúan con el complejo de proteínas de las zonas activas y regulan su organización en el envejecimiento de la UNM [35]. En el marco de este trabajo de tesis, es interesante destacar que el ejercicio también aumenta la transcripción de ciertos factores neurotróficos como la neurotrofina 4, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), los que aumentan la supervivencia de motoneuronas, modulan la eficiencia de la

transmisión sináptica e inducen la continua remodelación de las UNMs adultas [35-37].

Aun cuando se ha avanzado en el conocimiento de las vías de señalización involucradas en la mantención y maduración de la UNM, los mecanismos moleculares implicados en el envejecimiento de esta sinapsis no han sido totalmente descritos. Ciertos estudios se han enfocado en el retraso o la atenuación de las alteraciones del envejecimiento, donde el ejercicio físico aumenta la expresión de variadas proteínas, tales como factores neurotróficos. A este respecto, ha sido ampliamente estudiado que las neurotrofinas participan en la formación, maduración y mantención de la sinapsis neuromuscular, regulando tanto su morfología como su función. Sin embargo, se desconoce el potencial rol de las neurotrofinas sobre el envejecimiento de la UNM.

La vía de señalización de Neurotrofinas

Las neurotrofinas (NTs) son una familia de factores de crecimiento que regulan el desarrollo, la supervivencia y apoptosis neuronal [38, 39]. Los ligandos de esta familia son el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y las neurotrofinas 3 (NT3) y 4 (NT4). Las NTs se unen con alta afinidad a los receptores tirosina quinasa Trk [40], donde el receptor TrkA se une específicamente al ligando NGF, el receptor TrkB se une a los ligandos NT4 y BDNF, mientras que el receptor TrkC se une a NT3 [39].

El balance de la señalización activada por las distintas NTs regula diversos procesos, tales como el crecimiento de neuritas, la plasticidad sináptica y el ciclo celular [38, 41, 42]. Se ha descrito que animales nulos para los ligandos de NTs mueren a las pocas semanas después de nacer, mientras que animales heterocigotos, cuyo nivel de expresión de NTs es disminuido, son viables pero presentan una vida media reducida, manifestando múltiples defectos, como por ejemplo déficits en la adquisición y retención de la memoria en modelos heterocigotos de NGF, o agresividad, hiperactividad e hiperfagia en ratones heterocigotos para BDNF [39].

Las NTs son inicialmente sintetizadas como un precursor pro-neurotrofina, que es clivado para producir la forma madura del ligando. Intracelularmente, estos precursores son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, donde las pro-neurotrofinas son transportadas en vesículas secretoras y escindidas por la

proteasa furina, la que cliva y libera a la proteína madura [43, 44]. Extracelularmente, las pro-neurotrofinas son escindidas por las enzimas plasmina y metaloproteasas [41, 45].

Además de los receptores Trk, existe un segundo receptor de NTs, p75, que es activado por todos los ligandos de NTs en sus formas maduras o como pro-neurotrofinas [39, 46]. El receptor p75 puede incrementar la afinidad y especificidad de la interacción entre los ligandos y sus receptores Trk, actuando como correceptor, así como también puede señalizar conjuntamente a otros receptores como sortilina y Nogo [41, 42]. Las pro-neurotrofinas poseen mayor afinidad por el receptor p75 que sus formas maduras y su vía de señalización se asocia con la inducción de apoptosis. Por ejemplo, el tratamiento de células de músculo liso vascular que expresan p75 con la forma madura de NGF a concentración 2nM induce apoptosis en un 20% de las células, mientras que el tratamiento con pro-NGF es al menos 10 veces más potente, pues produce apoptosis en 18% de las células a concentraciones 0.1 nM [45].

Neurotrofinas en la UNM y la fibra muscular

Durante el desarrollo embrionario y la vida adulta, las NTs y sus receptores son expresados por los tres componentes celulares de la UNM. Diversos estudios demuestran que BDNF, pro-BDNF, TrkB y p75 ejercen roles cruciales en la maduración de la UNM [47-51]. BDNF en conjunto a sus receptores TrkB y p75 potencia la liberación de ACh desde el terminal presináptico, mejorando la

transmisión sináptica [51], mientras que pro-BDNF unido a p75 inhibe la liberación de ACh y genera la retracción axonal [50]. Estos resultados demuestran que la secreción de pro-BDNF, BDNF y la conversión proteolítica de esta molécula pueden estabilizar o eliminar terminales presinápticos en la maduración de esta sinapsis. Además, el bloqueo de la señalización de TrkB a nivel muscular por la sobre-expresión de formas dominantes negativas del receptor, tanto en etapas postnatales tempranas como en la adultez, causa la fragmentación de los agregados del AChR [52], mientras que el bloqueo del receptor p75 provoca alteraciones en la retracción axonal de pretzels poli-inervados y menor liberación de ACh desde el terminal presináptico [49]. A nivel muscular, se ha descrito que la NT4 es requerida para el cambio fenotípico de fibras rápidas a lentas en el músculo Soleus [53]. Así también, se ha mostrado que NT3 participa en la formación de los husos neuromusculares, necesarios para la sensibilidad propioceptiva de los músculos [54].

En la sinapsis neuromuscular adulta, las NTs son requeridas para el crecimiento y remodelación del terminal axonal [37] como también para la mantención de los agregados del AChR en la membrana postsináptica [55]. La inhibición de los receptores TrkB en ratones adultos produce denervación y fragmentación de la UNM, así como también una disminución en la transmisión sináptica [55, 56], mientras que la ausencia del receptor p75 en etapas adultas causa alteraciones en los terminales pre y postsináptico que repercuten en las fibras musculares, por lo que se le atribuye un rol crucial en la organización y

mantenimiento de la UNM madura [49, 57]. Por su parte, NT-4 es producida por las fibras musculares de una manera dependiente de actividad y promueve el crecimiento y remodelación del terminal axonal en UNMs adultas [37, 58]. El silenciamiento de esta NT en ratones se ha asociado con UNMs más grandes y fragmentadas, disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa y respuestas electromiográficas atenuadas, sugiriendo que NT-4 es requerida para la integridad del aparato postsináptico, la función muscular y la resistencia a la fatiga [58]. Respecto a NT-3, se ha demostrado que la expresión de este ligando es regulada por la fibra muscular y que modula el número de células terminales de Schwann en la UNM [59]. Por otro lado, BDNF se ha identificado como una mioquina que es expresada y liberada por el músculo de manera dependiente de actividad y que está involucrada en la regulación del metabolismo [60, 61] y en la regeneración de las fibras musculares [62].

En resumen, las NTs desempeñan roles cruciales en el desarrollo, función y mantenimiento de la sinapsis neuromuscular y la fibra muscular desde su desarrollo embrionario hasta la adultez. Sin embargo, escasos estudios han relacionado a esta vía de señalización con las alteraciones que sufren la sinapsis neuromuscular y la fibra muscular durante el envejecimiento.

Neurotrofinas en el envejecimiento

Durante el envejecimiento, se ha descrito que la ausencia del receptor TrkB en UNM de ratones de 18 meses genera una disminución en la superposición

entre las estructuras pre y postsinápticas y un incremento en las UNMs denervadas [56]. De forma similar, existe evidencia que sugiere que BDNF disminuye su expresión durante el envejecimiento, lo que precede a la reducción de la actividad de su receptor TrkB en el músculo diafragma y que se ve reflejado en una disminución de la fuerza y un aumento en la fatiga muscular [63].

Contrario a la UNM, en el sistema nervioso central se han descrito alteraciones en la expresión de TrkA, p75 y pro-BDNF con el envejecimiento. La mayor expresión de p75 relativa a la de TrkA y el aumento de pro-BDNF se han asociado con un aumento en la muerte celular neuronal y con alteraciones en la plasticidad sináptica y en la función cognitiva [64]. Según lo mencionado, es relevante entonces el estudio del receptor p75, debido a su rol integrador entre la señalización de NTs y pro-neurotrofinas, sobre las diversas alteraciones que ocurren durante el envejecimiento, no solo del sistema nervioso central, sino también del periférico, específicamente en la UNM.

El receptor de neurotrofinas p75

El receptor p75 es una proteína asociada a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF), que no posee dominio catalítico para autofosforilación, por lo que ejerce su función acoplado a cada NT y a su receptor Trk, a las proteínas mielínicas MAG o MOG unidas a su receptor Nogo y LINGO-1, o unido a las pro-NTs y Sortilina[41]. p75 puede gatillar diversas vías de señalización mediadas por la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), NF-KB, Erk, PLC γ y PI3K, desencadenando respuestas que van desde la muerte celular programada hasta la supervivencia celular según sea el ligando, contexto celular y receptor con el que se asocie [46, 65, 66] (Figura 3).

En el sistema nervioso central, vías de señalización mediadas por el receptor p75 producen respuestas que van desde la regulación de la plasticidad sináptica y supervivencia celular hasta la inducción de apoptosis, regulando procesos como la memoria y el aprendizaje [42, 65].

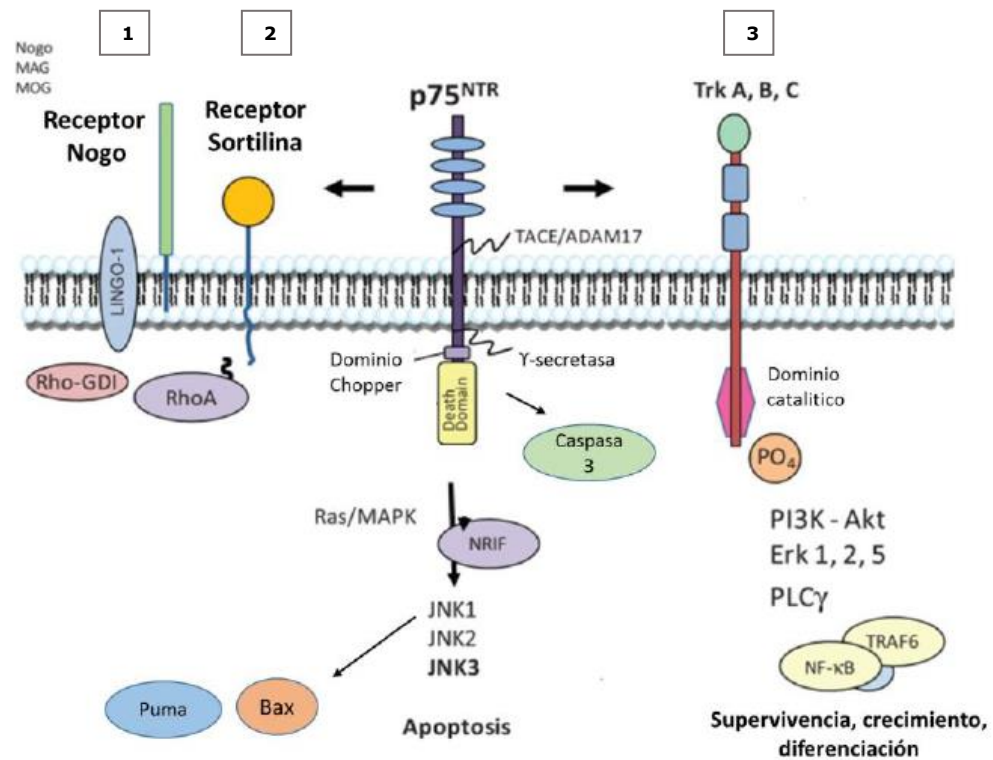


Figura 3: Señalización mediada por p75.

El receptor p75 puede unirse al menos a tres receptores. (1) La interacción de p75 con los receptores Nogo y Lingo-1 regulan el crecimiento. Esta 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. (2) La interacción de p75 con sortilina une a las proneurotrofinas al complejo de receptores. La interacción permite la subsecuente activación de la vías de señalización Ras/MAPK y JNK quinasas, desencadenando la apoptosis celular. (3) La heterodimerización con los receptores Trk incrementa la afinidad de las neurotrofinas maduras con

receptores Trk, interacción que promueve supervivencia y crecimiento celular mediante la activación de PI3K-Akt, ERK o PLC γ y corriente abajo mediante efectores como TRAF6 y NF κ B. (modificado de [42]).

El receptor p75 durante el envejecimiento

Aun cuando la expresión de p75 disminuye en etapas adultas, se ha reportado que la expresión de esta proteína incrementa en neuronas del Sistema Nervioso Central durante el envejecimiento, incluyendo a las motoneuronas de la médula espinal [67, 68]. Se ha descrito que el aumento de p75 durante el envejecimiento está involucrado en la disrupción de la plasticidad hipocampal, afectando a procesos como el aprendizaje y la memoria a través de la modulación de varias vías de señalización como BDNF, MAPK, Arc, entre otras. En este estudio, utilizando el modelo murino nulo para p75 se observó que la ausencia del receptor previene los cambios de estas vías de señalización que han sido asociadas a las alteraciones de la plasticidad neuronal [67]. En patologías asociadas al envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por la acumulación de péptidos β -amiloide y muerte neuronal, se ha descrito que el aumento de p75 y la disminución de TrkA durante el envejecimiento favorece la formación de dichos péptidos, a través de vías de señalización que resultan en un aumento en el estado estable de BACE1, enzima encargada de la síntesis de los péptidos β -amiloide [69, 70]. Concordantemente, animales nulos para p75 presentan un incremento en el tamaño y número de neuronas colinérgicas septo-hipocampales (involucradas en la memoria) que son vulnerables a la enfermedad de Alzheimer [71, 72]. De esta forma, p75 se ha

descrito como un regulador negativo de la plasticidad funcional y estructural del cerebro envejecido.

Adicionalmente, condiciones de injuria en nervios periféricos también gatillan la expresión del receptor p75 en motoneuronas de la médula espinal y las células de Schwann [68]. A este respecto, ratones modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica, una enfermedad que cursa con disrupción de la UNM, degeneración de las motoneuronas y la consecuente falla en la contracción muscular, también presentan un aumento en la expresión de p75 en dichos tipos celulares [73, 74]. Concordante con la noción existente en el cerebro, experimentos de inhibición de la expresión o actividad de p75 resultan en una prevención de la muerte de las motoneuronas y de la progresión de la enfermedad [75, 76]. Así, el incremento en la expresión de p75 se correlaciona con un mayor número de células apoptóticas [66], mientras que su silenciamiento o bloqueo ha sido propuesto por diversos autores como protector en diversos modelos patológicos y asociados al envejecimiento [42, 65, 68, 69, 75-78].

El receptor p75 en la UNM

El receptor p75 se expresa en los tres componentes celulares de la UNM, regulando la eliminación de la poli-inervación y la liberación de ACh [47, 49-51]. Estudios recientes realizados en el laboratorio patrocinante demuestran que p75 es requerido para la mantención de la estructura y función de la UNM adulta y de la fibra muscular. A este respecto, ratones adultos nulos para el receptor p75

presentan una disminución en el tamaño y complejidad en los dominios postsinápticos de la UNM. Los terminales presinápticos poseen una significativa reducción en el número de vesículas sinápticas y zonas activas, junto con alteraciones funcionales en la transmisión de la sinapsis. Adicionalmente, la ausencia de la señalización mediada por p75 causa alteraciones en la estructura de la fibra muscular, tales como disminución en el área de sección transversal (CSA) de las fibras, disminución en la fuerza de contracción muscular y alteraciones en la coordinación motora [57]. Estos resultados sugieren que el receptor p75 desempeña roles esenciales en la disponibilidad del neurotransmisor y en la organización de la UNM madura.

Considerando la versatilidad de funciones que puede cumplir el receptor p75 debido a su capacidad de activar diversas vías de señalización, regular la sinaptogénesis y mantención de la UNM adulta y considerando los estudios asociados a su desregulación en el envejecimiento del sistema nervioso central, este trabajo de tesis plantea analizar la potencial función del receptor p75 sobre las alteraciones que ocurren durante el envejecimiento de la UNM y la fibra muscular.

HIPOTESIS

Estudios previos demuestran que la señalización mediada por las neurotrofinas regula la formación y mantención de la unión neuromuscular. En este contexto, el receptor p75, que es activado por todos los ligandos de esta vía de señalización, participa en la sinaptogénesis de la UNM, específicamente durante la eliminación de la poli-inervación, mientras que en etapas adultas se le asocia un rol crucial en la mantención de la ultraestructura y en la transmisión sináptica, afectando la morfología de las fibras musculares.

Por otra parte, escasos estudios han evaluado el rol de las neurotrofinas en la UNM envejecida. Se ha atribuido a estas moléculas un rol en la mantención de la innervación sináptica, como también se han identificado aumentos en su expresión ante paradigmas experimentales que atenúan los cambios morfológicos del envejecimiento. Sin embargo, no existen estudios que relacionen al receptor común de todas las neurotrofinas, p75, con el envejecimiento de la UNM.

En base a esta evidencia, la hipótesis de este trabajo de tesis es:

El silenciamiento del receptor de neurotrofinas p75 resulta en un incremento de las alteraciones de la unión neuromuscular y de la fibra muscular observadas durante el envejecimiento.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la ausencia del receptor p75 sobre la unión neuromuscular y las fibras musculares durante el envejecimiento.

Objetivos Específicos

1. Determinar las consecuencias del silenciamiento del receptor p75 sobre las alteraciones morfológicas y moleculares de la UNM durante el envejecimiento.
2. Analizar parámetros morfológicos y moleculares de músculos envejecidos frente a la ausencia del receptor p75.

MATERIALES

Animales de experimentación

Se utilizaron muestras de ratones C57BL/6J nulos para el receptor de neurotrofinas p75 (KOp75) y sus pares control wildtype (WT). El ratón nulo para p75 utilizado carece del exón III que codifica para repeticiones ricas en cisteínas del dominio extracelular del receptor, requeridas para la unión del ligando a p75 [79]. Los animales fueron adquiridos en The Jackson Laboratory y correspondían a las cepas de ratón B6.129S4-Ngfrtm1Jae/J. Fueron alimentados con pellets (Prolab RMH-3000, LabDiet) y agua *ad libitum*.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios fueron utilizados en la dilución indicada respecto del propósito experimental como se muestra en la tabla 1 y tabla 2 respectivamente.

Tabla 1: Anticuerpos, reactivos y sondas utilizadas en los diferentes experimentos.

Se utilizó la dilución indicada para las distintas técnicas. IHQ: inmunohistoquímica; WB: Western blot.

Antígeno	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
2H3	Monoclonal	Ratón	DSHB	IHQ	1:300
SV2 (AB 2315387)	Monoclonal	Ratón	DSHB	IHQ	1:50
S-100 (Z0311)	Policlonal	Conejo	Dako	IHQ	1:100
Bungarotoxina (α -BTX)			Molecular Probes	IHQ	1:500
DAPI			ThermoFisher	IHQ	1:100
Fab	Monoclonal	Ratón	Jackson	IHQ	1:33
AChR ϵ	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	WB	1:1000
AChR γ	Policlonal	Conejo	Invitrogen	WB	1:1000
Atrogin-1	Policlonal	Conejo	ECM Biosciences	WB	1:1000
GAPDH	Monoclonal	Ratón	Santa Cruz	WB	1:1000

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados.

Los siguientes anticuerpos secundarios fueron utilizados en la dilución indicada respecto a las distintas técnicas: IHQ: inmunohistoquímica; WB: Western blot.

Fluoróforo	Tipo	Especie que reconoce	Origen	Propósito	Dilución
IgG HRP		Ratón	Jackson	WB	1:5000
IgG HRP		Conejo	Jackson	WB	1:5000
Cy2	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	IHQ	1:300
Cy3	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	IHQ	1:300
Cy5	Policlonal	Burro (H+L)	Jackson	IHQ	1:300

Reactivos y soluciones en general

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), 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); O.C.T Compound Tissue-Tek (Sakura); marcador de membrana aglutinina del germen de trigo (WGA) (Thermo Fisher); NADH-TR (Tampón Tris 1X pH 7,4; NADH reducido; Nitro-blue tetrazolium); Rojo Ponceau S (0,1% p/v rojo ponceau S, 5%v/v ácido acético Sigma); Solución de Stripping (glicina 0,2 M, SDS 0,1%p/v, Tween-20 1% v/v, pH 2.2); Buffer electroforesis para proteínas (15mM Tris-HCl, 960mM glicina, 0,5% p/v SDS, pH 8,3); Buffer gel separador o Lower Buffer (1,5M Tris-HCl, pH 8,8, SDS 0,4 %p/v); Buffer gel concentrador o Upper Buffer (500mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS 0,4 %p/v); Buffer de Transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3); Buffer de carga para proteínas 4X (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% v/v Glicerol, 8%p/v SDS, 0,04 % p/v Bromofenol, 2% v/v betamercaptoetanol); acrilamida 30% (29% p/v acrilamida, 1% p/v bisacrilamida, Biorad); Polisulfato de amonio o APS (10% p/v); TBS/Tween 20 (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl, 0,1% v/v Tween-20).

Kits comerciales

Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer): un reactivo que revela en un solo paso, a través de quimioluminiscencia, la actividad peroxidasa de rábano (HRP) conjugada a anticuerpos secundarios en ensayos de Western Blot

Materiales en general y equipos disponibles

Cubreobjetos discoidales de vidrio de 12 mm de diámetro (Deckglaser), cubreobjetos rectangulares 24X50 mm (Citoglas), portaobjetos (Citoplus), pipetas de plástico estériles de 5 y 10 ml, tubos cónicos de 15 y 50 mL, material de disección (FST), Estereomicroscopio AxioZoom.V16 completamente equipado, que 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).

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, dos estereomicroscopios con luz fría (Leyca) y cámara digital (Moticam 2000), un microscopio óptico (Zeiss) y un microscopio de epifluorescencia (Nikon 80i).

Por otra parte, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción cuenta con el Centro de Microscopía Avanzada CMA-Biobío, del que se utilizaron en esta tesis: 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.

MÉTODOS

Análisis Histológicos

Obtención de muestras

Los ratones a edad 22-26 meses fueron sacrificados por sobredosis de anestesia inhalatoria con isofluorano en concentraciones saturantes. Posteriormente, el músculo Tibial Anterior (TA) 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.

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

Con el fin de determinar los distintos tipos de fibra que componen el músculo TA de ratones KOp75 y control, criosecciones del músculo TA 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, los cortes 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 pálida [80].

Adquisición de imágenes

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.

Cuantificación del área de sección transversal

Se obtuvieron imágenes de la totalidad de una crio sección de músculo TA por animal teñida para detectar NADH-TR. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas y el músculo reconstruido en su totalidad utilizando el programa PowerPoint. El músculo TA 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 una región de interés (ROI) rectangular en el centro de la crio sección de manera de abarcar la zona de transición entre fibras lentas y 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 [80].

Cuantificación de los distintos tipos 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 5.1.2.1), 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 [80]. Se cuantificaron como mínimo 250 fibras por cada animal.

Tinción WGA-DAPI

Las criosecciones fueron fijadas con metanol 100% frío durante 10 min y lavadas con PBS 1X por 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 µg/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 teñidas en color verde las membranas de las fibras musculares y en color azul los núcleos celulares [80].

Cuantificación del número de núcleos centrales en fibras musculares

Con el fin de evaluar la cantidad de fibras musculares en ciclos de daño y regeneración, se realizó la cuantificación del número de fibras que contienen núcleos centrales [26]. Se adquirieron imágenes con microscopio de epifluorescencia de diferentes segmentos de la criosección teñida. Se contabilizó el número de células con núcleos no periféricos y los datos se expresaron como porcentaje respecto al total de fibras observadas.

Estudio de la dinámica del AChR

Para analizar la estabilidad de los AChR, se realizaron ensayos de doble α -BTX como se describe en trabajos anteriores del laboratorio [81]. Brevemente, ratones anestesiados con isoflurano (mezcla de 2.5% v/v isoflurano con a 0.8–1 L/min de oxígeno) fueron inyectados de forma subcutánea sobre el músculo LAL con α -bungarotoxina (α -BTX) conjugada al fluoróforo Alexa-488 (BTX-1) disuelta en PBS. Siete días después, los ratones fueron sacrificados y los músculos LAL fueron disecados, fijados en formaldehído 0,5%v/v a temperatura ambiente, lavados y teñidos con α -BTX conjugada al fluoróforo Alexa-647 (BTX-2) por 60 min. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal en las que se analizó la relación entre las intensidades de fluorescencia BTX-1 y BTX-2 utilizando el programa ImageJ

Cuantificación del recambio y densidad de AChRs en el músculo LAL

Para evaluar la tasa de recambio y densidad de AChRs, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ambas α -BTXs por UNM. Para ello, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de la doble tinción utilizando un lente objetivo de 40X e igual tiempo de exposición, las que posteriormente fueron procesadas. Usando la función “*z-project*” se generó la imagen de la proyección del stack de fotos en ambos canales; luego se recortó cada aparato postsináptico y se separaron sus canales. De cada una de estas imágenes, que representaban la cantidad de AChRs en ambos tiempos, se realizó la cuantificación ajustando como parámetro a medir en “set measurements” la opción “mean gray value”, valor que representa la intensidad de fluorescencia promedio del total de píxeles seleccionados. Finalmente, se expresó el recambio de AChRs como la razón entre las distintas intensidades de fluorescencia BTX-2/BTX-1 y la densidad total de receptores como la sumatoria de la intensidad de fluorescencia de ambas tinciones.

Western Blot

Extractos de proteínas totales

Se extrajeron proteínas totales desde músculos Gastrocnemius de ratones KOp75 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 μ M Aprotinina; 2 mM

Leupeptina; 4 mM Bestatina; 1,5 mM Pepstatina A; 1,4 mM E-64) (Sigma). El homogeneizado fue centrifugado a 14.000 RPM por 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido correspondió al extracto de proteínas totales y fue almacenado a -20°C.

Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración en cada extracto, las proteínas fueron cuantificadas por el método espectrofotométrico de Bradford [82]. Para realizar la curva de calibración, se prepararon seis diluciones de distintas concentraciones de BSA 100µg/mL: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL en volumen final de 1mL con igual volumen de reactivo de Bradford correspondiente a 200µL. De las muestras de proteínas se extrajeron de 1 a 4 µL y fueron diluidas en un volumen final de 1mL que contenía 200 µL de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595nm en espectrofotómetro Shimadzu UV-mini 1240. La concentración de las muestras se determinó interpolando en la curva de calibración.

Electroforesis de proteínas

Para la separación de proteínas de cada una de las muestras, se cargó entre 50-100 µg de proteínas totales que fueron diluidas en tampón de carga (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% v/v Glicerol, 8%p/v SDS, 0,04 % p/v Bromofenol, 2% v/v betamercaptoetanol) en proporción 3:1 y denaturadas a 95 °C por 5 min. Estas muestras se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida (Biorad) al 30% (29%

p/v acrilamida, 1% p/v bisacrilamida), compuesto por un gel separador de proteínas en la parte inferior (acrilamida/bisacrilamida al 10% p/v, 375mM Tris-Base, pH8.8, 0,1% p/v SDS; 0,1%p/v persulfato de amonio y 0,04%v/v TEMED) y en la parte superior un gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida al 5% p/v, 125mM Tris-Base, pH6.8, 0,1% p/v SDS; 0,125 % p/v persulfato de amonio y 0,125 %v/v TEMED). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con Buffer de corrida o Running Buffer (15mM Tris-HCl, 960mM glicina, 0,5% p/v SDS, pH 8,3) aplicando un voltaje constante de 120 V por 1,5-2 horas.

Transferencia a membrana de PVDF

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno. Para ello, se acondicionó la membrana en metanol 100% a temperatura ambiente por 2 min y luego en Buffer de transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3). Para la transferencia se superpuso el gel sobre la membrana, ambos entre 4 papeles filtro y dos esponjas, los que fueron fijados con una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara con buffer de transferencia (0.25M Tris-HCl, 1,02 M glicina, pH 8,3). Para generar el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350 mA por 1,5 h. Posteriormente, la eficiencia de transferencia se evaluó tiñendo la membrana con Rojo Ponceau S (0,1% p/v rojo ponceau S, 5%v/v ácido acético Sigma), colorante que se une rápida y reversiblemente a las proteínas.

Bloqueo, incubación con anticuerpos y revelado

La membrana de PVDF fue bloqueada con tampón Tris-base/TBS-tween20 (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl, 0,1% v/v Tween-20) y 5% p/v de leche descremada por 1 h en agitación y posteriormente fue incubada con anticuerpo primario (Tabla N°1) diluido en solución de bloqueo por toda la noche a 4°C. Después de lavar 5 veces por 8 min con tampón TBS/Tween20, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla N° 2) diluido en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo secundario fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial “Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer)” y sus imágenes adquiridas a través del equipo iBright 750 (Invitrogen). En algunos casos la membrana fue lavada e incubada en solución de stripping (glicina 0,2 M, SDS 0,1%p/v, Tween-20 1% v/v, pH 2.2) dos veces por 10 min a T° ambiente, luego lavado con PBS 1X dos veces por 10 min, 2 veces con TBS-tween20 por 5 min, para la inmunodetección con un anticuerpo diferente.

Cuantificación de la intensidad de bandas

Para cuantificar los niveles de expresión de las proteínas de interés, la intensidad de cada banda fue medida utilizando el software ImageJ. Se seleccionaron las zonas que contenían las bandas usando el comando “select first lane” y se cuantificó el área bajo las curvas de los máximos de intensidad

usando los comandos “plot lanes” y “wand tool”. Los valores fueron expresados como la relación entre la intensidad de banda de la proteína con su control de carga que en este caso correspondió a la proteína GAPDH.

Inmunohistoquímica

Obtención de las muestras

De los animales sacrificados por sobredosis inhalatoria de isoflurano, se disecó el músculo Lumbrical y/o el músculo Levator Auris Longus (LAL) en solución PBS al 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4).

Inmunohistoquímica del músculo Lumbrical y Levator Auris Longus

Con el fin de analizar las UNMs de ratones KOp75 y control, luego de la disección, los músculos Lumbrical y LAL fueron fijados en formaldehído 1.5 % v/v en PBS 1X a temperatura ambiente por 90 minutos. Luego, los músculos fueron limpiados minuciosamente del tejido conectivo y graso circundante. Luego se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 min en agitación (70-100 rpm) a temperatura ambiente. Los músculos Lumbricales 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 y SV2 que marcan el axón motor y el terminal axónico, respectivamente, además del anticuerpo S100B 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 y DAPI 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. Finalmente, los músculos fueron montados entre dos cubreobjetos en medio de montaje para fluorescencia, adhiriendo los cubreobjetos en sus bordes con cianoacrilato.

Inmunohistoquímica de fibronectina del músculo Tibial Anterior

Con el fin de analizar el grado de fibrosis del tejido conectivo circundante a las fibras musculares, crio secciones transversales de músculo TA, obtenidas para análisis histológicos como se detalla en la sección 5.1.1, fueron fijadas en paraformaldehído 4% p/v en PBS 1X por 20 min a 4° C. Luego, los cortes fueron lavados 3 veces en PBS1X-Tween-20 al 0,1 % v/v por 10 min e incubados en glicina 0,15M en PBS 1X a pH: 7.4 por 15 min, todo a temperatura ambiente. Se lavó en PBS 1X por 10 min y luego las crio secciones fueron bloqueadas utilizando

BSA/PBS 1X al 1% p/v por dos horas. A continuación, los músculos fueron incubados en cámara oscura con el anticuerpo primario anti-fibronectina en BSA/PBS1X al 1% p/v durante toda la noche a 4°C. Luego, las criosecciones fueron lavadas 6 veces por 5 min en PBS/Tween-20 0,1% v/v. Se agregó el anticuerpo secundario anti-Rabbit acoplado al fluoróforo Cy3 en BSA/PBS 1X por 2 horas a T° ambiente y cámara oscura. Finalmente, las criosecciones fueron lavadas con PBS/Tween-20 0,1% 6 veces por 5 min y montadas en portaobjetos usando medio de montaje DAKO para fluorescencia.

Análisis de Imágenes

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 tres componentes de la UNM y la deposición de fibronectina entre las fibras musculares.

Análisis de la morfología del aparato postsináptico

Para analizar los efectos de la ausencia del receptor p75 sobre los aparatos postsinápticos se analizaron los agregados de AChRs teñidos con α -BTX Alexa-488 y se clasificaron según lo descrito [57]. La clasificación utilizada fue la siguiente: Aparato postsináptico con múltiples aperturas: cuyos pretzels

presentaban más de una apertura o zonas interiores delimitadas por agregados continuos de estos; Aparato postsináptico con una apertura: cuya estructura postsináptica sólo poseía una apertura o un espacio interior; Aparato Postsináptico fragmentado: los que se forman debido a la discontinuidad de los AChRs en segmentos y donde se pueden observan al menos 5 fragmentos (Figura 4).

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 30 aparatos postsinápticos fueron cuantificados por animal en los músculos Levator auris longus y Lumbrical siendo entre 3-4 animales KOp75 y 3-4 animales control por condición experimental. Los resultados fueron expresados como porcentaje, calculado como la razón del número de pretzels observados para cada categoría, en relación con el número total de aparatos postsinápticos analizados.

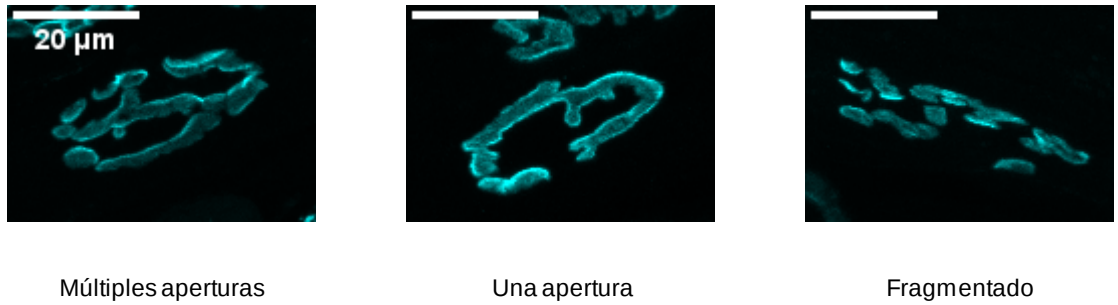


Figura 4: Clasificación morfológica de los aparatos postsinápticos.

Según su morfología, los aparatos postsinápticos fueron clasificados en pretzels no fragmentados de múltiples aperturas o una apertura, y en aparatos postsinápticos fragmentados. Barra = 20 µm

Análisis de la morfología del terminal presináptico

Para evaluar el efecto de la ausencia del receptor p75 sobre las alteraciones observadas en el terminal axonal, se analizó la tinción anti 2H3 + anti SV2, que detectan simultáneamente los neurofilamentos y vesículas sinápticas de la motoneurona. Se identificó como “ensanchamiento extrasináptico” cualquier distensión de la continuidad del terminal axonal hasta su bifurcación anterior y como “ensanchamiento intrasináptico” a distensiones en el aparato presináptico ubicado sobre la UNM que no se sobreponían con agregados de AChRs. Las fibras de escape se definieron como cualquier proyección del terminal axonal de más de 1µm que se emitiera desde el borde de la placa motora en cualquier dirección. Para el análisis de la poli-inervación se realizó la reconstrucción tridimensional de la UNM, al igual que en el punto 5.7.2. incluyendo las tinciones 2H3/SV2 y α -BTX. Se definió como UNM poli-inervada aquella que presentara más de un terminal axonal sobre un solo aparato postsináptico [83] (Figura 5).

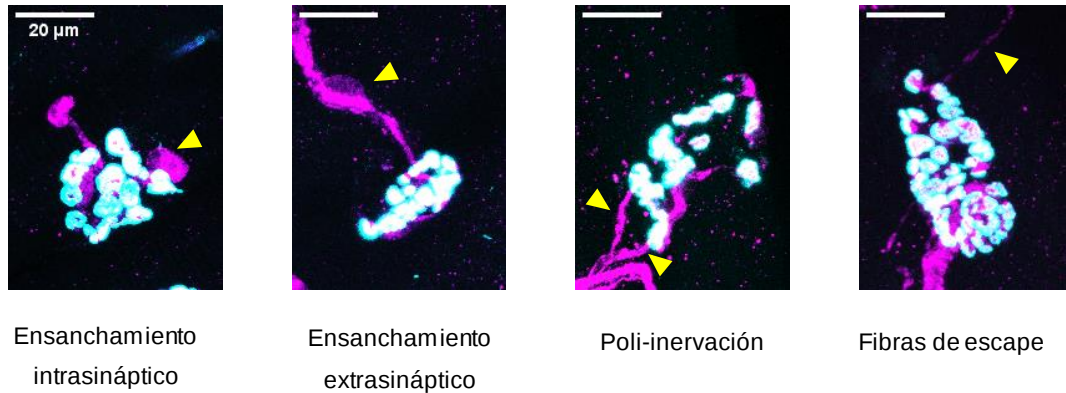


Figura 5: Anormalidades del terminal presináptico durante el envejecimiento.

La morfología del terminal axonal durante el envejecimiento puede presentar alteraciones como (indicadas con puntas de flecha): ensanchamientos intrasinápticos como extrasinápticos, poli-inervación de los aparatos postsinápticos y proyecciones del terminal axonal o fibras de escape. Barra = 20 µm.

Análisis de área, perímetro y diámetro de Feret de los componentes de la UNM

La cuantificación del tamaño de los componentes celulares de la UNM fue realizada utilizando el programa ImageJ. Para ello, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de la triple tinción utilizando un lente objetivo de 40X, las que posteriormente fueron procesadas y donde cada UNM en plano fue cortada junto a su stack de imágenes. Usando la función “*z-project*” se generó la imagen de la superposición del stack de fotos, se ajustó el umbral utilizando el método de “Huang”, que entrega la representación binaria más precisa de las UNMs [84]. Posterior a la selección del umbral se procesó la imagen usando las funciones “despeckle”, “process> make binary” y finalmente se seleccionó el color de la imagen binaria producida usando el comando “lookup tables > green, red, blue, cyan, yellow, magenta” dependiendo del componente celular a visualizar. Finalmente se realizó la cuantificación seleccionando los parámetros a medir en “set measurements”, para luego aplicar los comandos “invert”, “create selection” y “measure”. La selección de dichos comandos se utilizó para la cuantificación del área y perímetro del terminal presináptico, postsináptico y de las células terminales de Schwann [84].

Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico

Se realizaron reconstrucciones tridimensionales de imágenes de planos z utilizando el programa ImageJ a través del comando “3D Project”. Luego, de

manera manual se contabilizó el número de fragmentos que conforman cada pretzel, organizaciones discontinuas de agregados del AChR.

Cuantificación de la aposición entre los diferentes componentes de la UNM

Con el fin de determinar el grado de inervación y aposición del axón motor con los aparatos postsinápticos de la UNM, los músculos Lumbricales fueron teñidos para evidenciar los componentes pre y post sináptico de la UNM según lo descrito en la sección 5.6.2 y las imágenes fueron capturadas como se indica en la sección 5.7.1. Utilizando el programa ImageJ, cada canal adquirido fue digitalizado como una proyección en el plano z y usando la concatenación de las imágenes binarias obtenidas (sección 5.7.3) para luego realizar la medición del área postsináptica obtenida que no se superpone con el terminal presináptico. Las áreas pre y postsinápticas, así como la aposición (razón entre las áreas de ambos componentes), fueron clasificadas según lo descrito [84]. El mismo procedimiento fue realizado para la cuantificación de la aposición entre el terminal presináptico y las células terminales de Schwann.

Cuantificación del número de células de Schwann terminales por UNM

Para determinar la cantidad de cuerpos celulares de células de Schwann por UNM, los músculos Lumbricales fueron teñidos usando un anticuerpo dirigido contra la proteína S-100, según se detalla en la sección 5.6.2, que marca células de Schwann. Además, se utilizaron las tinciones con DAPI y α -BTX acoplado al fluoróforo Alexa555. Así, se adquirieron imágenes de microscopía confocal de la

triple tinción utilizando un lente objetivo de 40X, las que posteriormente fueron procesadas. Se identificó la ubicación de cada UNM por la presencia de agregados de AChR y se recortaron junto a su stack de imágenes en los tres canales. Luego, minuciosamente se identificó la cantidad de núcleos que se superponían sobre la tinción de la proteína S-100 revisando cada plano individual de cada set de imágenes por UNM, con el fin de evitar confundirlos con los núcleos subsinápticos de la fibra muscular (Figura 6). Los resultados fueron expresados como número de núcleos de células terminales de Schwann por UNM.

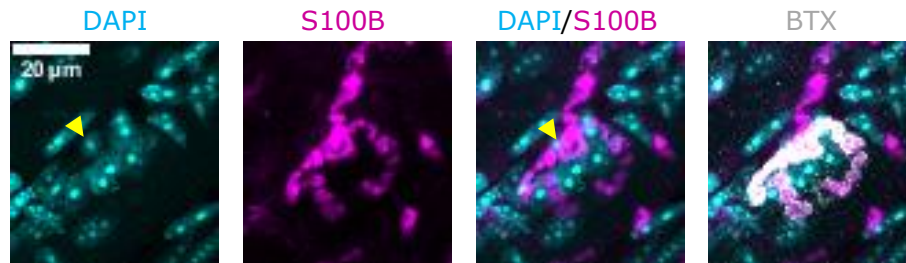


Figura 6: Núcleos de células de Schwann terminales por UNM.

La punta de flecha amarilla señala un núcleo de una célula de Schwann terminal. Al realizar la superposición de DAPI con la tinción S-100 existe co-localización entre ambas fluorescencias. Barra = 20 µm

Análisis Estadístico

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 8 y Microsoft Excel 365. Todos los datos son presentados como valor de la media $\pm$ SEM. Los análisis estadísticos entre los ratones KOp75 y control que consideran una variable fueron realizados usando el test-t de Student de datos no pareados comparando sus promedios. Para los análisis estadísticos en los que fueron consideradas diversas variables, se utilizó el test 2 way-ANOVA. 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.

RESULTADOS

Con el fin de evaluar el efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la morfología del aparato postsináptico, del terminal presináptico y de las células de Schwann terminales, diferentes músculos de ratones WT y KOp75 fueron sometidos a tinciones inmunohistoquímicas. A los músculos LAL se les realizó sólo la tinción con α -BTX, que se une a los AChRs, mientras que los músculos Lumbricales fueron también teñidos con anticuerpos dirigidos contra las proteínas 2H3 y SV2 para revelar el terminal presináptico, contra la proteína S100B, que permite detectar a las células de Schwann, utilizando la toxina α -BTX acoplada a fluoróforos Alexa-555 y Alexa-647, y con DAPI, que tiñe los núcleos celulares. Los análisis morfológicos de los distintos componentes celulares de la UNM se realizaron utilizando el software ImageJ y calculando parámetros previamente definidos [84].

Para este estudio se seleccionaron los músculos Lumbrical y Levator auris longus (LAL) dado el grado de susceptibilidad que presenta cada uno al envejecimiento, pues según estudios previos, tres factores definen esta característica: la posición en el eje rostro-caudal, el tipo de inervación que recibe (por nervios espinales o craneales) y la composición de tipos de fibra de cada músculo [83]. En este caso en particular, el músculo LAL se define de “fenotipo envejecido tardío”, pues se ubica sobre el cráneo del ratón y es innervado por el

par craneal VII, a diferencia del músculo Lumbrical que se ubica en los dígitos, es decir en la región más distal de las extremidades, y es innervado por nervios periféricos, por lo que la aparición de las anomalías del envejecimiento en este último ocurriría más tempranamente [85, 86].

Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre el terminal postsináptico durante el envejecimiento

En una primera instancia, se analizó la morfología de los aparatos postsinápticos clasificándolos en pretzels fragmentados y no fragmentados, distinguiendo a aquellos de una apertura y de múltiples aperturas como un parámetro de complejidad postsináptica. Para una mejor visualización, se realizó la reconstrucción tridimensional de cada UNM permitiendo su rotación en 360° grados. Los resultados muestran que tanto en el músculo LAL como en el Lumbrical la ausencia del receptor p75 no genera diferencias significativas en el porcentaje de UNMs fragmentadas, pero se observa una tendencia del músculo LAL a un menor grado de fragmentación en comparación al músculo Lumbrical (**Figura 7B**). También analizamos el grado de fragmentación, según el número de agregados de AChRs que poseía cada UNM. La cuantificación muestra que, entre diferentes músculos del mismo modelo (WT Lumbrical vs WT LAL y KOp75 Lumbrical vs KOp75 LAL), se generan diferencias significativas en el porcentaje de UNMs con menos de 5 fragmentos, lo que es concordante con la tendencia de la medición anterior, pero no en aquellos intervalos superiores (**Figura 7C**).

Respecto a la complejidad de los aparatos postsinápticos, en el músculo LAL se observó que la ausencia del receptor p75 genera un aumento de las estructuras postsinápticas con una apertura en desmedro de aquellas con múltiples aperturas en comparación con el control WT. Por su parte, en el músculo Lumbrical no se observaron diferencias en el porcentaje de aparatos postsinápticos con una o múltiples aperturas (**Figura 7D**).

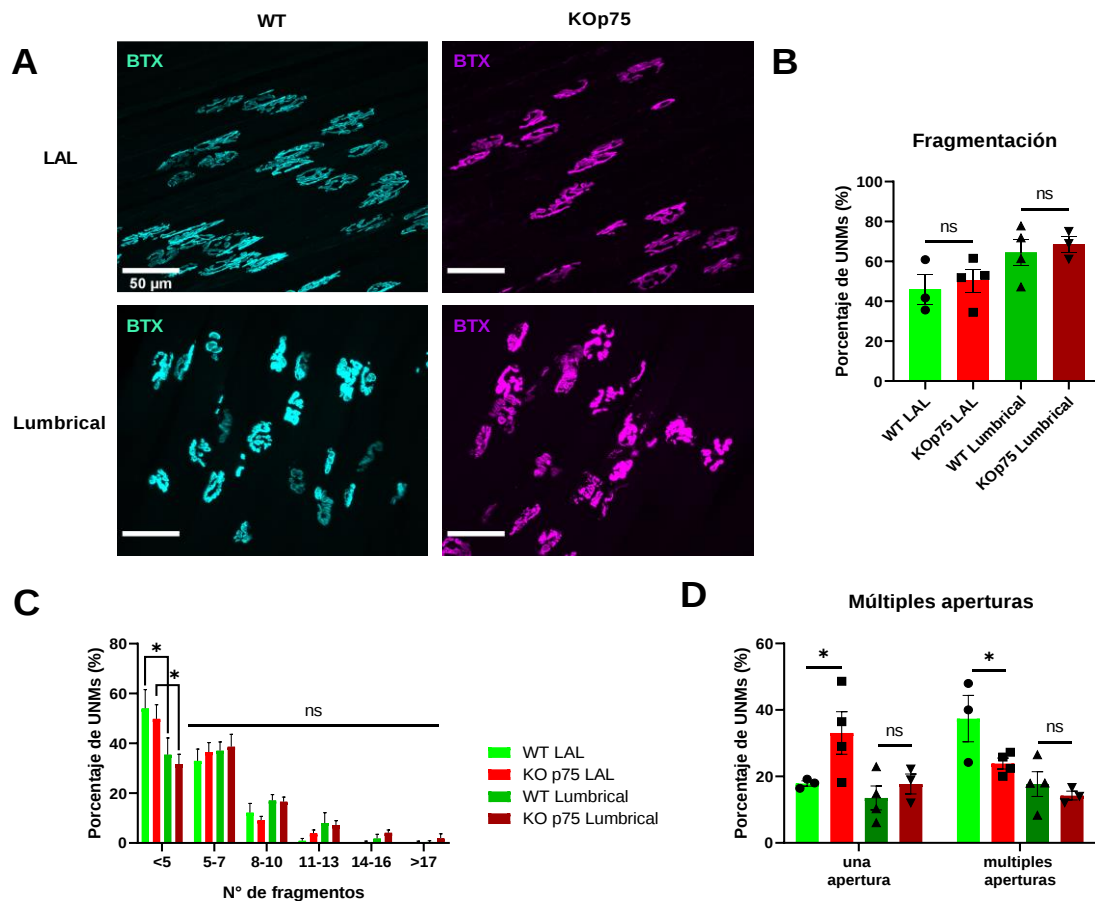


Figura 7: La ausencia del receptor p75 no afecta fragmentación del aparato postsináptico, pero si su complejidad.

Músculos LAL y Lumbrical de ratones WT y KOp75 de 22-26 meses fueron teñidos con α -BTX para la visualización de los AChRs. Se realizó la reconstrucción tridimensional y se cuantificó la cantidad de aparatos postsinápticos fragmentados y no fragmentados. Estos últimos se dividieron a su vez en aquellos con múltiples aperturas y con una sola apertura. **(A)** Tinción con α -BTX de ambos músculos en modelos WT y KOp75. Las imágenes de los

aparatos postsinápticos fueron obtenidas a través de microscopía confocal. **(B)** Cuantificación del porcentaje de UNMs fragmentadas (con más de 4 agregados del AChR) y no fragmentadas. **(C)** Cuantificación del grado de fragmentación observado a través del número de fragmentos por UNM. **(D)** Cuantificación del porcentaje de UNMs con una apertura y múltiples aperturas. La sumatoria de estos valores corresponde al porcentaje de UNMs no fragmentadas. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de n= 3-4 ratones por condición WT y KOp75. Se utilizó test ANOVA de 2 colas (ns= no significativo, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Luego, para determinar si la diferencia en la complejidad postsináptica influía en el tamaño de aparato postsináptico, cuantificamos el área y perímetro de los AChRs y el diámetro de Feret de la placa motora en los músculos LAL y Lumbrical. Para ello, se seleccionaron aquellas UNMs que según su proyección en el plano Z se observaban en un plano frontal (*en face*), evitando así cuantificar áreas ocultas en UNMs en planos transversales u oblicuos. Posteriormente, utilizando el software ImageJ se realizó la cuantificación de dichos parámetros. En los músculos LAL, que presentaban diferencias en la complejidad postsináptica, observamos que el modelo murino KOp75 muestra una disminución significativa respecto a su control WT del área y perímetro de los AChRs así como del diámetro de Feret de la placa motora (**Figura 8A-B-C**). En forma opuesta, en los músculos Lumbricales no se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros (**Figura 8 D-E-F**). Estos resultados demuestran que la ausencia de p75 influye negativamente en la morfología postsináptica en estadios adultos, como se había reportado previamente en Diafragmas de modelos KOp75 de 2 meses de edad [57], que se mantiene hasta etapas tempranas del envejecimiento, como se observa en el músculo LAL poco susceptible al envejecimiento.

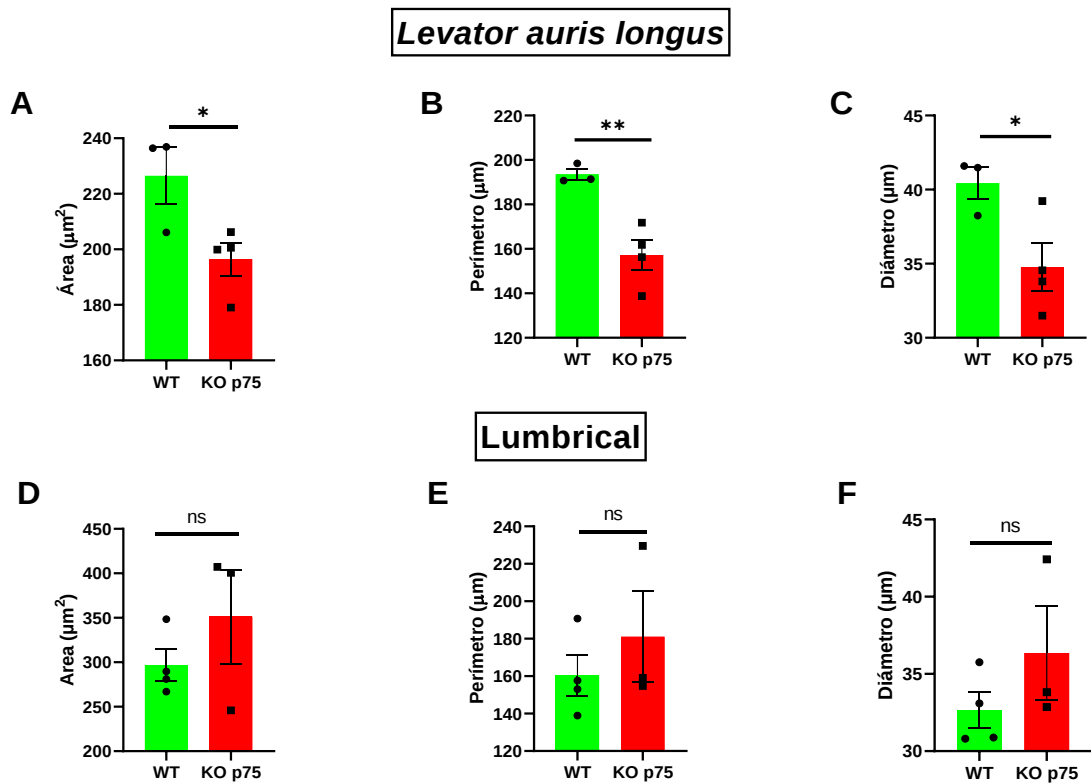


Figura 8: La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en el área y perímetro del aparato postsináptico.

Músculos Lumbrical y LAL de ratones WT y KO p75 de 22-25 meses fueron analizados mediante tinción de los AChRs con α -BTX. Cuantificaciones del **(A)** área y **(B)** perímetro de los AChRs y **(C)** diámetro de Feret de la placa motora del músculo LAL. Cuantificaciones del **(D)** área y **(E)** perímetro de los AChRs y **(F)** diámetro de Feret de la placa motora del músculo Lumbrical. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de $n=3-4$ ratones por condición WT y KO p75. Se utilizó test t-no pareado (ns= no significativo, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre las alteraciones del terminal presináptico durante el envejecimiento de la UNM.

Durante el envejecimiento, a nivel del terminal axonal motor de la UNM se han descrito ciertas anormalidades como ensanchamientos axonales, presencia de fibras de escape, poli-inervación de aparatos postsinápticos y adelgazamientos del axón [25].

Para evaluar el efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre dichas alteraciones, muestras del músculo Lumbrical de ratones WT y KOp75 fueron analizadas mediante tinción inmunohistoquímica para detectar simultáneamente proteínas de los neurofilamentos (2H3) y vesículas sinápticas (SV2), develando así la estructura presináptica motora. Se definió como ensanchamientos axonales a aquellas distenciones irregulares del axón (véase figura 5) y se clasificaron en intrasinápticas y extrasinápticas. La presencia de fibras de escape y poli-inervación se visualizó realizando la reconstrucción tridimensional de los axones motores próximos a las UNMs (identificadas por la tinción de α -BTX). Finalmente, se cuantificó el diámetro axonal realizando tres mediciones: en el punto de contacto con los AChRs, en la zona más ancha y en la zona más delgada ubicada no más allá de 50 μ m desde la UNM, como se ha descrito [84]. Los resultados indican que la distribución en diferentes rangos del diámetro axonal no se ve afectada ante el silenciamiento del receptor p75 (**Figura 9A**). En relación con la presencia de fibras de escape, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de UNMs con dicha alteración entre el modelo

murino WT y el KOp75 envejecidos (**Figura 9B**). Igualmente, la proporción de UNMs con ensanchamientos tanto intrasinápticos como extrasinápticos no se ve alterada ante el silenciamiento del receptor p75 (**Figura 9D**). Finalmente, en el análisis de la poli-inervación de UNMs tampoco se observan cambios significativos en el porcentaje de sinapsis neuromusculares con esta alteración entre el modelo control y el KOp75 (**Figura 9E**). Estos resultados muestran que la ausencia del receptor p75 no influye en las alteraciones observadas a nivel presináptico durante el envejecimiento.

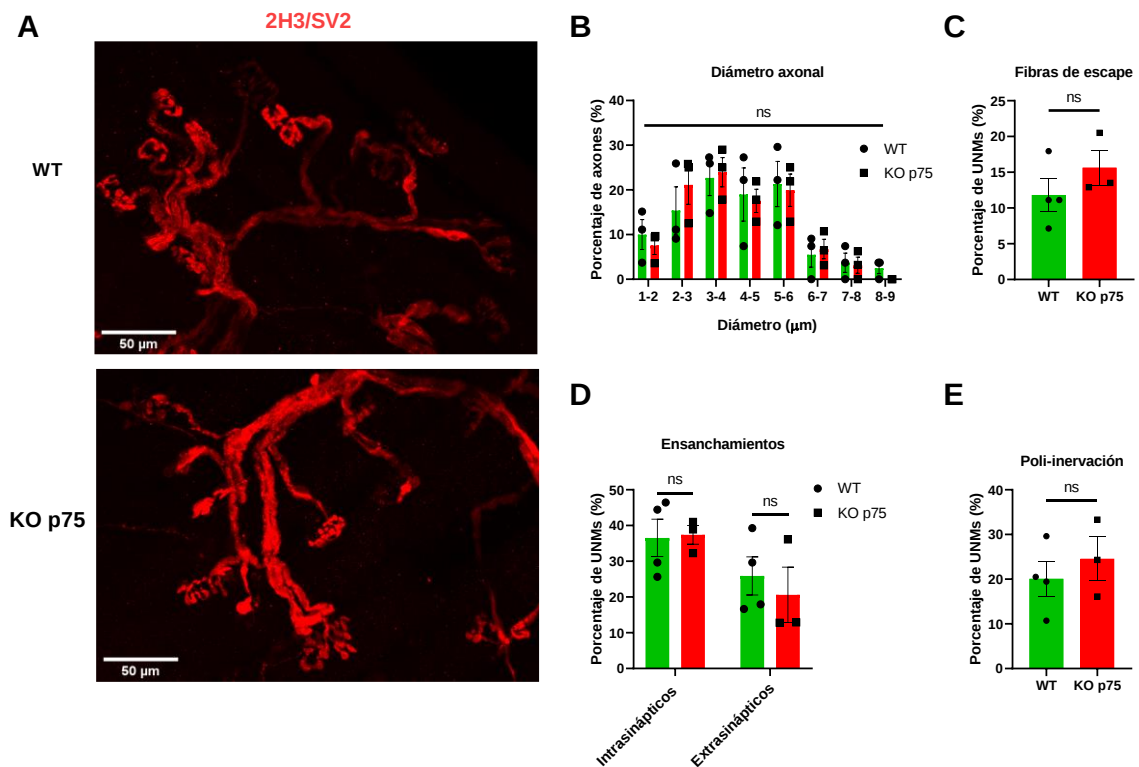


Figura 9: La ausencia del receptor p75 no provoca cambios en las alteraciones que ocurren en el terminal presináptico durante el envejecimiento.

Tinciones inmunohistoquímicas contra las proteínas del axón motor 2H3 y SV2 fueron realizadas en el músculo Lumbrical de ratones WT y KO p75. Se realizó la reconstrucción tridimensional y se analizó la presencia de anomalías presinápticas que ocurren en el envejecimiento. **(A)** Cuantificación del diámetro axonal. **(B)** Cuantificación del porcentaje de UNMs con fibras de escape o proyecciones del terminal presináptico. **(C)** Tinción inmunohistoquímica del

terminal presináptico utilizando anticuerpos contra neurofilamentos y contra vesículas sinápticas. **(D)** Cuantificación del porcentaje de UNMs con terminales presinápticos que presentan distenciones o ensanchamientos tanto intrasinápticos como extrasinápticos. **(E)** Cuantificación del porcentaje de UNMs con poli-inervación. Se analizaron 130 UNMs en el modelo WT y en 103 UNMs del modelo KOp75. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de $n=3-4$ WT y $n=3$ KOp75. Se utilizó test ANOVA de dos colas (B y D) y test t-no pareado (C y E) (ns= no significativo, $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$).

Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre la innervación de la UNM envejecida.

A lo largo de la vida, los axones motores y sus respectivas fibras musculares experimentan continuos ciclos de denervación y regeneración. Sin embargo, durante el envejecimiento, este mecanismo compensatorio falla y parte de las fibras denervadas no son satisfactoriamente re-inervadas, lo que en parte provocaría el declive progresivo de la fuerza y masa muscular [15]. Para evaluar el grado de denervación, se cuantificó la superposición de las áreas del terminal axonal presináptico con la del aparato postsináptico, obteniéndose el grado de innervación de la UNM [84]. En este trabajo, para evaluar este parámetro, se utilizaron las áreas obtenidas de músculos Lumbricales de modelos WT y KOp75 con el marcaje inmunohistoquímico del terminal presináptico y del aparato postsináptico. Los resultados indican que la ausencia del receptor p75 genera una disminución de la innervación que se observa en un aumento del porcentaje de UNMs parcialmente inervadas (superposición entre 60-20%) en desmedro de aquellas inervadas o con superposición mayor a 60% (**Figura 10B**). A partir de estas cuantificaciones, se puede concluir que la causa del aumento en la denervación en el modelo KOp75 se debe a una disminución en el área del terminal presináptico (**Figura 10C**), pues según los resultados previos, la ausencia del receptor p75 no genera cambios significativos en el área del terminal postsináptico del músculo Lumbrical (**Figura 8D**) ni en su distribución (**Anexo 1**).

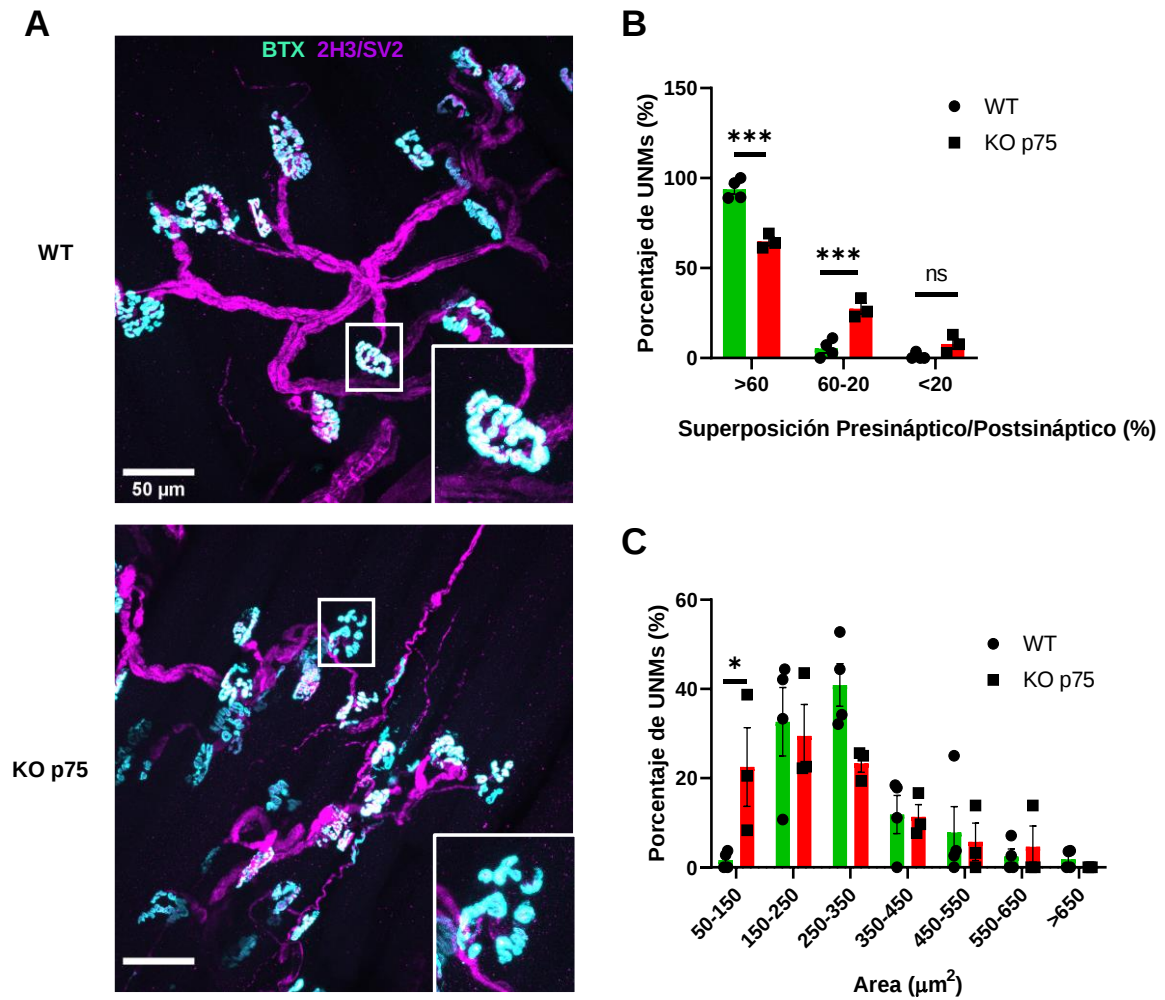


Figura 10: La ausencia del receptor p75 provoca una disminución en la innervación de las UNMs.

Para determinar el porcentaje de innervación se utilizaron muestras de músculos Lumbrical con tinciones para el terminal presináptico (anticuerpos anti SV2 y 2H3) y para el aparato postsináptico (α -BTX). Las áreas de ambos componentes fueron analizadas cuantificando su porcentaje de superposición. **(A)** Imágenes

de tinciones inmunohistoquímicas del músculo Lumbrical contra el terminal pre y postsináptico. **(B)** Cuantificación del porcentaje de UNMs con superposición mayor a 60%, entre 60-20% y menores a 20%. **(C)** Cuantificación del área presináptica en intervalos. Se analizaron 130 UNMs en el modelo WT y 103 UNMs en el modelo KOp75. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de n=4 animales WT y n=3 animales KOp75. Para el análisis estadístico se utilizó test ANOVA de 2 colas (ns= no significativo, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la morfología y número de células de Schwann terminales durante el envejecimiento

Con el fin de determinar una posible causa de la denervación observada en el resultado anterior analizamos el tercer componente celular de la UNM: las células de Schwann terminales [31]. Para evaluar el efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre este tipo celular durante el envejecimiento, se utilizaron tinciones inmunohistoquímicas contra la proteína S100B en el músculo Lumbrical de animales WT y KO para p75. Los resultados indican que la ausencia del receptor p75 provoca una disminución en el área de las células de Schwann terminales **(Figura 11B)**. Así mismo, se observó una disminución en la superposición de las células de Schwann terminales con el componente presináptico de la UNM **(Figura 11C)**. Finalmente, para comprobar si dichas alteraciones se relacionaban con el número de células de Schwann terminales por UNM, se cuantificó la cantidad de núcleos que co-localizan con la proteína S100B por sinapsis, donde no se observaron diferencias significativas entre el modelo murino WT y el KO para p75 **(Figura 11D)**. Estos resultados indican que p75 influiría de manera negativa sobre la morfología de las células terminales de Schwann y el grado de superposición de estas con el terminal presináptico, sin afectar su número.

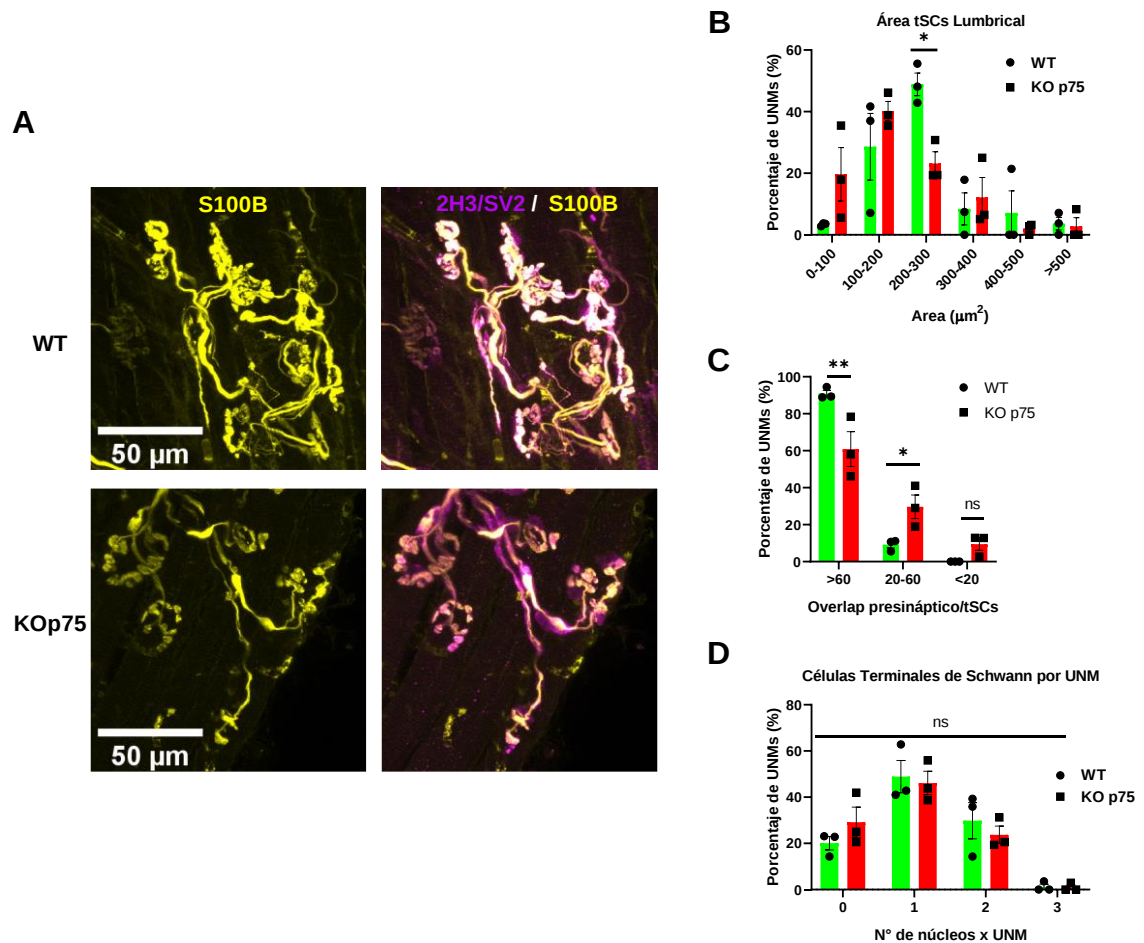


Figura 11: La ausencia del receptor p75 produce alteraciones en la morfología de las células terminales de Schwann.

El músculo Lumbrical de ratones WT y KO para p75 fue analizado mediante tinciones inmunohistoquímicas contra sus tres componentes celulares además del marcador nuclear DAPI. **(A)** Tinción inmunohistoquímica contra las proteínas del terminal presináptico 2H3 y SV2 y contra la proteína S100B de las células de Schwann. **(B)** Cuantificación del área de células terminales de Schwann sobre la

UNM. **(C)** Cuantificación de la superposición de las células terminales de Schwann sobre el terminal presináptico. **(D)** Cuantificación del número de núcleos de células terminales de Schwann por UNM. Se analizaron 130 UNMs en el modelo WT y en 103 UNMs del modelo KOp75. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de n=4 animales WT y n=3 animales KOp75. Para el análisis estadístico se utilizó test ANOVA de 2 colas (ns= no significativo, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Efecto de la ausencia del receptor p75 sobre la estabilidad de los AChRs

Se ha descrito que la estabilidad de los AChRs en la membrana postsináptica depende de la actividad muscular, pues en modelos de denervación quirúrgica o farmacológica se ha observado que la tasa de recambio de receptores aumenta significativamente en modelos denervados [87]. Igualmente, el uso de una doble tinción con α -BTX conjugada a diferentes fluoróforos en distintos tiempos sobre el músculo LAL ha demostrado ser particularmente ventajoso para discernir entre los AChRs preexistentes y aquellos recientemente incorporados al terminal postsináptico, además de permitir la estimación de la densidad de AChRs [81]. Así, debido al aumento en la denervación de la UNM observado en el modelo KOp75, evaluamos los posibles cambios en la estabilidad y densidad de los AChRs a través de la doble tinción con α -BTX. Para ello, los aparatos postsinápticos del músculo LAL de ratones WT y KOp75 fueron sometidos a una tinción *in vivo* con una dosis no saturante de α -BTX AlexaFluor-488 (BTX-1). Luego de 7 días, los ratones fueron sacrificados y los músculos LAL fueron rápidamente disecados, lavados y fijados. Posteriormente, se realizó una segunda tinción con α -BTX AlexaFluor-555 (BTX-2). La relación entre las intensidades de fluorescencia de ambas tinciones da cuenta del recambio del AChR en la membrana de la fibra muscular: “estable”, si las intensidades de fluorescencia son similares en ambas tinciones, y “dinámico”, si la intensidad de fluorescencia de la BTX-2 es mayor a la BTX-1. De igual manera, las intensidades de fluorescencia de ambas tinciones arrojan una medida indirecta de la densidad

de AChRs por UNM en cada momento de la aplicación de α -BTX [57]. Los resultados indican que la ausencia del receptor p75 disminuye la densidad de AChRs tanto de la población pre-existente (BTX-1) como la de aquellos incorporados en el intervalo de 7 días (BTX-2) (**Figura 12B**). Además, aumenta la dinámica de los AChRs, pues la relación entre la intensidad de fluorescencia de la doble tinción con α -BTX en el modelo murino KOp75 es mayor que en el modelo WT (**Figura 12C**). En relación con la densidad total de AChRs por UNM, se observa una menor intensidad de fluorescencia total (BTX-1 más BTX-2) significativa del modelo KOp75 en comparación al modelo WT (**Figura 12D**). Estos resultados indican que la ausencia del receptor p75 provoca una disminución en la expresión, estabilidad y densidad de AChRs de superficie en las UNMs.

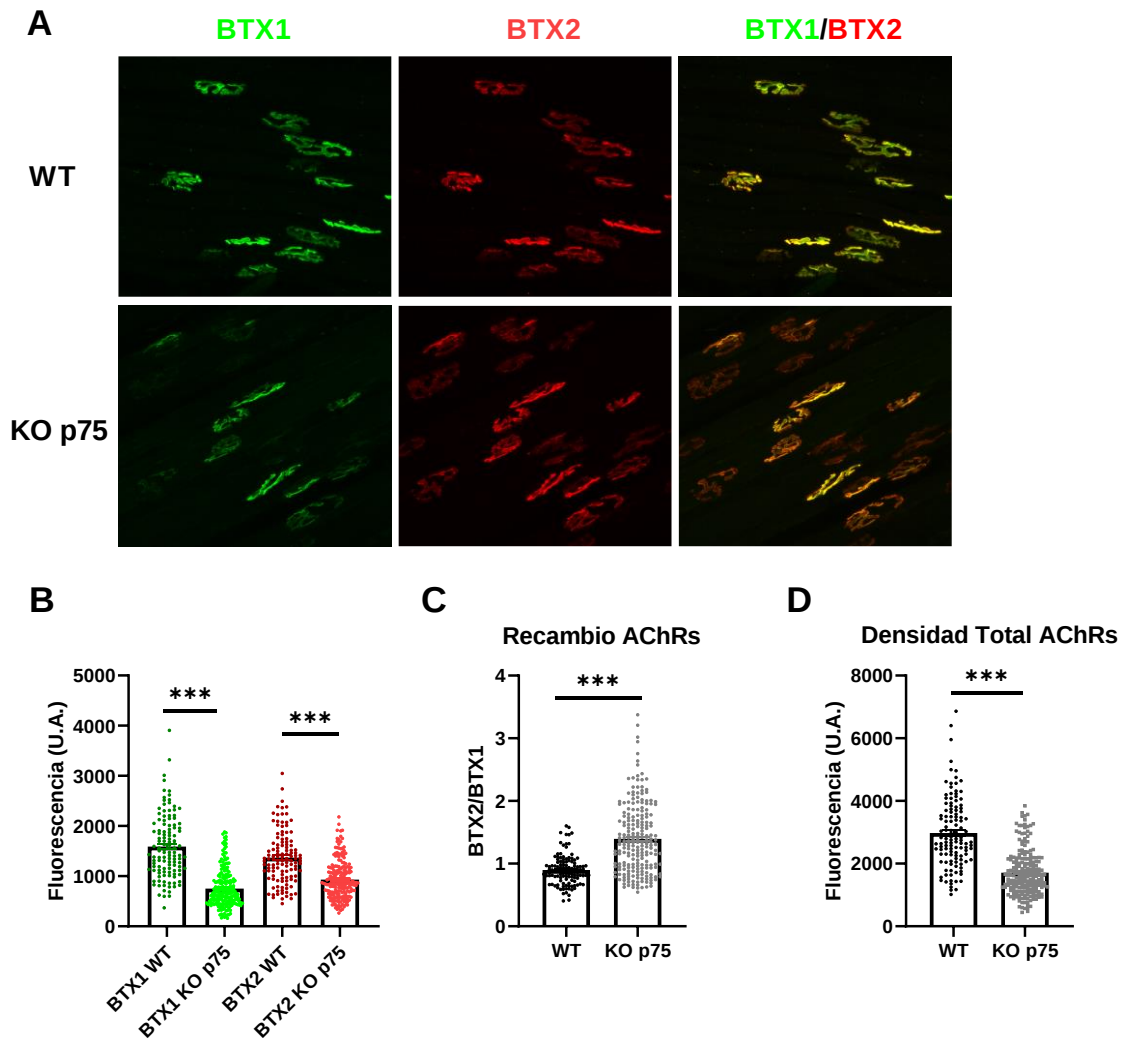


Figura 12: La ausencia del receptor p75 disminuye la estabilidad y densidad de los AChRs.

Para evaluar la estabilidad de los AChRs, el músculo LAL de ratones WT y KO para p75 fueron sometidos a una tinción con dos derivados fluorescentes de α -BTX *in vivo* con un intervalo de 7 días. **(A)** Imágenes obtenidas a través de microscopía confocal de los aparatos postsinápticos con ambas tinciones. **(B)**

Cuantificación de la densidad de AChRs de cada tinción de α -BTX a través de la intensidad de fluorescencia **(C)** Cuantificación de la relación entre la intensidad de fluorescencia de ambas tinciones. **(D)** Cuantificación de la densidad total de AChRs a través de intensidad fluorescencia de ambas α -BTX. Las cuantificaciones fueron realizadas en el software ImageJ siendo cuantificadas 122 UNMs en el modelo murino WT (N=2) y 216 en el KO p75 (N=3). Los resultados son promedio $\pm$ SEM; test t-no pareado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Análisis de la composición de los AChRs ante el silenciamiento del receptor p75 durante el envejecimiento

La configuración del AChR varía durante la vida de la UNM. En etapas embrionarias se expresa principalmente la conformación $\alpha_2\beta\delta\gamma$, la que posee tiempos de apertura mayores y baja permeabilidad al calcio en comparación a la conformación $\alpha_2\beta\delta\epsilon$, que se expresa en etapas adultas [88]. Durante el envejecimiento, la expresión de las subunidades épsilon y gama se ve aumentada en modelos murinos [24]. Para evaluar el efecto del silenciamiento de p75 sobre la expresión estas subunidades del AChR se realizaron extractos de proteínas totales del músculo Gastrocnemius de ratones envejecidos WT y KO para p75. Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE para la inmunodetección mediante Western Blot de las subunidades gama y épsilon. El análisis de los resultados, normalizados respecto al modelo WT, señala que la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento no influye en la expresión de ambas subunidades (**Figura 13**).

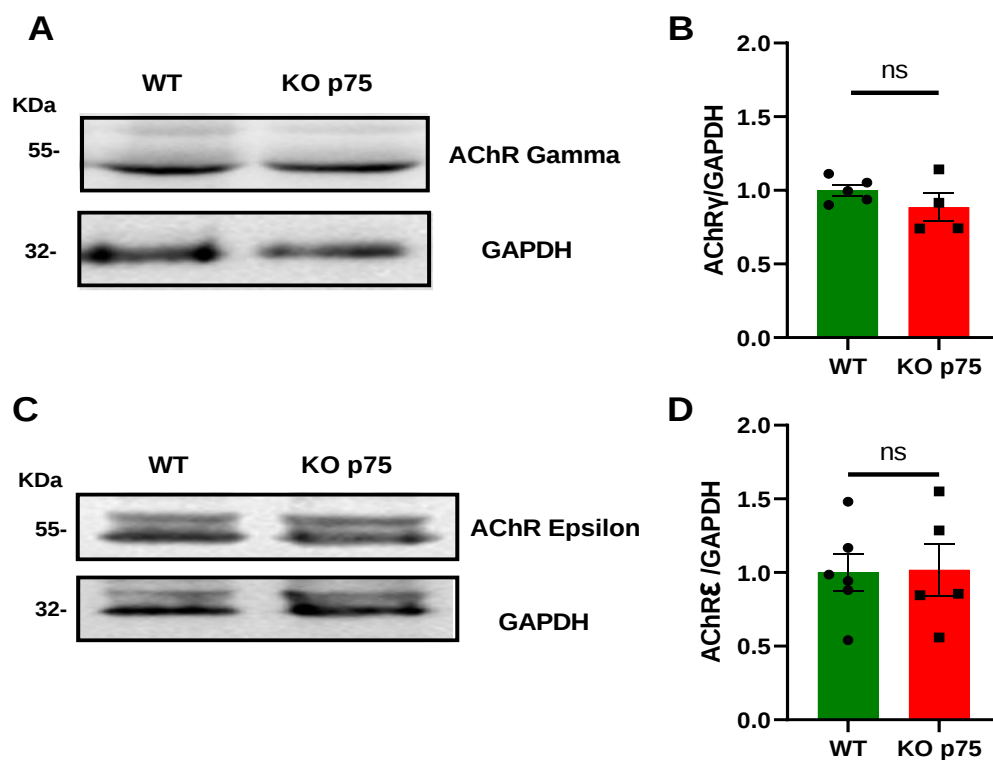


Figura 13: La ausencia del receptor p75 no influye en la expresión de las subunidades gamma y épsilon del AChR durante el envejecimiento.

Se obtuvieron extractos de proteínas totales desde músculo Gastrocnemius de ratones WT y KO p75 envejecidos para la inmunodetección de las subunidades gamma y épsilon del AChR mediante Western Blot. **(A)** Inmunodetección por Western Blot de la subunidad gamma y su control de carga GAPDH. **(B)** Cuantificación de la intensidad de banda de la subunidad gamma en relación con el control de carga GAPDH. **(C)** Inmunodetección por Western Blot de la subunidad épsilon y su control de carga GAPDH. **(D)** Cuantificación de la

intensidad de banda de la subunidad épsilon en relación con el control de carga GAPDH. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM de los extractos de 6 músculos del modelo WT y 5 músculos del modelo KOp75. Para el análisis estadístico se utilizó test t-no pareado ns= no significativo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la morfología de las fibras musculares durante el envejecimiento

El envejecimiento muscular se acompaña de cambios en la proporción de los tipos de fibras. Se ha descrito que en esta etapa aumentan las fibras tipo I, o fibras lentas, en desmedro de las fibras tipo II, o fibras rápidas [23]. Para estudiar una posible consecuencia del silenciamiento del receptor p75 sobre la proporción de los tipos de fibras musculares se realizó la tinción histológica NADH-Tiorreductasa en criosecciones del músculo TA de ratones WT y KO para p75, la que permite la identificación de los tipos de fibra en relación a su potencial oxidativo. Conjuntamente, se analizó el diámetro de Feret de los distintos tipos de fibras para evaluar si el receptor p75 afecta el calibre de las fibras musculares. Los resultados muestran que la ausencia del receptor p75 no genera cambios significativos en la distribución de los tipos fibras durante el envejecimiento muscular (**Figura 14A**). Respecto al calibre, la ausencia del receptor p75 produce un aumento del número de fibras con diámetros de Feret más pequeños en las fibras rápidas (**Figura 14C**). Por su parte, no se observan diferencias significativas en el calibre de las fibras lentas entre los modelos WT y KO para p75 (**Figura 14D**).

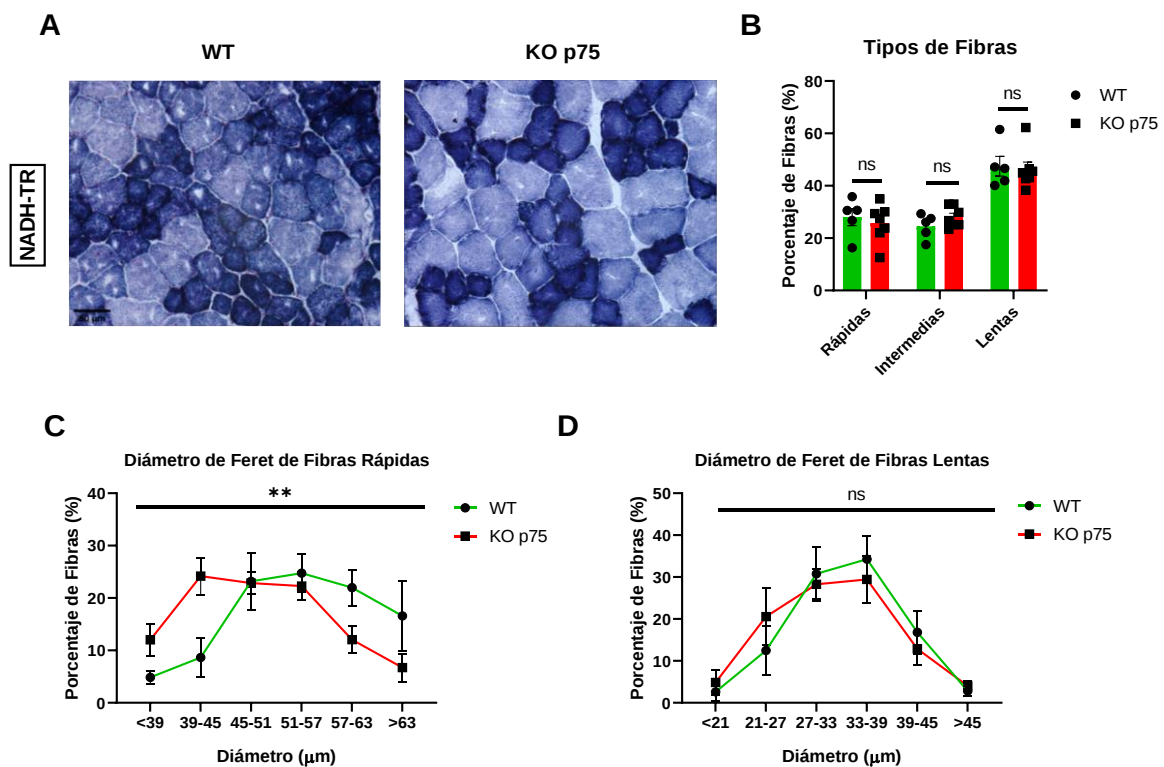


Figura 14: La ausencia del receptor p75 no altera la proporción de tipos de fibras musculares, pero disminuye el calibre de las fibras rápidas.

Criosecciones de músculo TA de ratones WT y KO para p75 envejecidos fueron analizados mediante la tinción histoquímica NADH-Tiorreductasa para la visualización de los tipos de fibras y medición de su calibre. **(A)** Tinción histoquímica NADH-Tiorreductasa para develar los tipos de fibras musculares. **(B)** Cuantificación del porcentaje de tipos de fibras musculares en músculos TA. Se cuantificaron más de 5.000 fibras en el modelo KO y más de 3.000 en el modelo WT. **(C)** Cuantificación del diámetro de Feret de las fibras musculares

rápidas. **(D)** Cuantificación del diámetro de Feret de las fibras musculares lentas. Para el análisis del diámetro de Feret en ambos tipos de fibras se cuantificaron cerca de 700 en el modelo WT y 500 en el modelo KOp75. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM de n= 7 modelos WT y n=5 modelos KOp75. Para el análisis estadístico se utilizó el test ANOVA de dos colas (ns= no significativo, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Fibrosis, regeneración y atrofia muscular ante la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento

Además de producirse cambios en la proporción de tipos de fibras durante el envejecimiento muscular, también se han reportado otras alteraciones. Estas incluyen un aumento en el porcentaje de fibras con núcleos centrales (indicador de ciclos de daño y regeneración) [22], un aumento en la deposición de matriz extracelular (fibrosis) [21] y atrofia de las fibras musculares [18]. Para analizar un posible efecto de la ausencia del receptor p75 sobre dichos parámetros, criosecciones del músculo TA fueron sometidas a diferentes protocolos experimentales. Para el análisis de la regeneración de fibras musculares se utilizó la tinción de aglutinina de germen de trigo (WGA) junto a DAPI, que permiten identificar las membranas y núcleos celulares, respectivamente. Los resultados muestran que, durante el envejecimiento, la ausencia del receptor p75 no provoca variaciones en el porcentaje de fibras musculares con núcleos centrales **(Figura 15A-B)**. La presencia de fibrosis se evaluó realizando una tinción inmunohistoquímica contra la proteína de matriz extracelular fibronectina y mediante la técnica de generación de segundos armónicos (SHG), que detecta la deposición de la proteína colágeno en los tejidos conectivos que rodean a las fibras musculares. No se observaron cambios significativos en la tinción de fibronectina ni en la detección de colágeno entre los músculos de los modelos WT y KO para p75 envejecidos **(Figura 15C-D)**. El análisis de la atrofia muscular se realizó mediante inmunodetección por Western Blot del marcador de atrofia

Atrogina-1 en extractos de proteína del músculo Gastrocnemius, donde no se observaron diferencias significativas en el nivel de expresión de esta proteína entre los modelos control y KOp75 envejecidos (**Figura 15 E-F**).

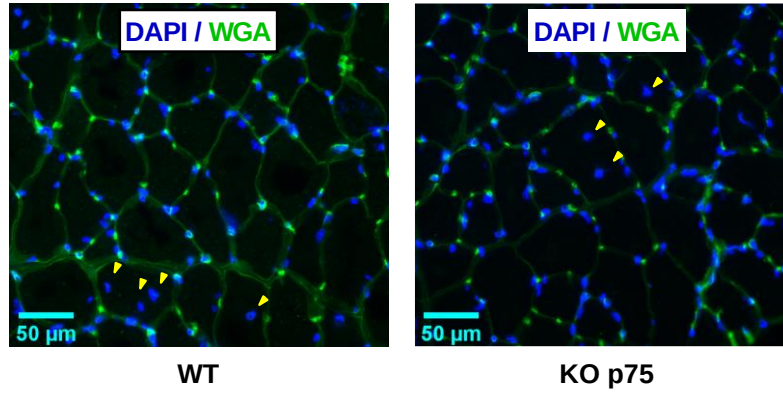
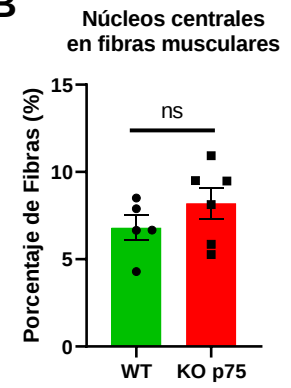
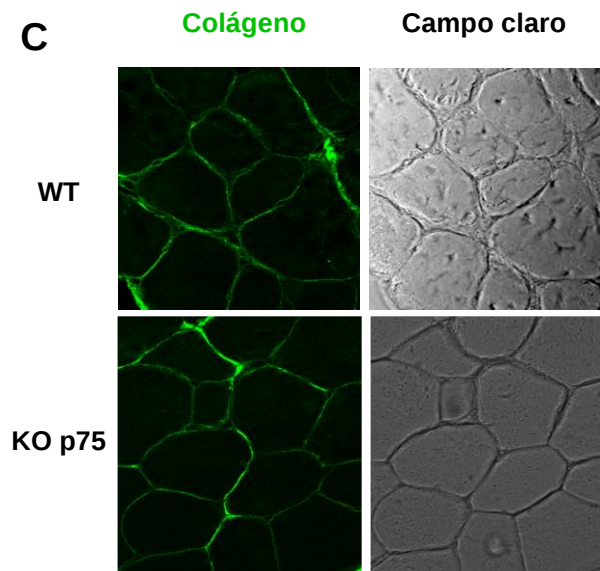
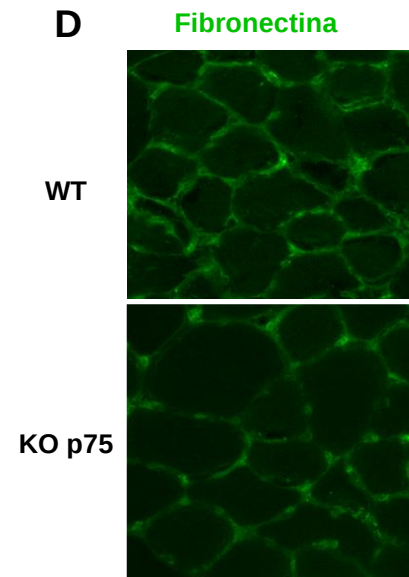
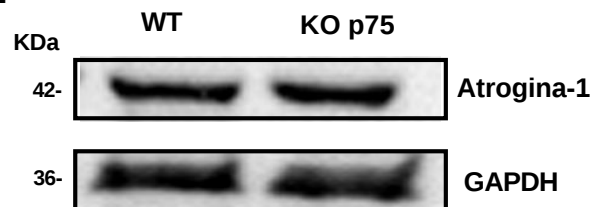
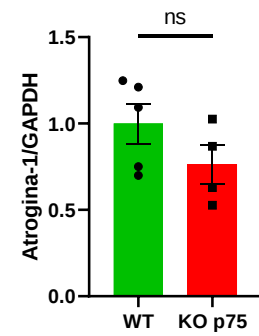
A**B****C****D****E****F**

Figura 15: La ausencia del receptor p75 no produce alteraciones en la regeneración, fibrosis y atrofia muscular.

Criosecciones de músculo TA de ratones WT y KO para p75 fueron evaluados mediante análisis histológicos. Extractos de proteínas de músculos Gastrocnemius de ratones WT y KO para p75 fueron sometidos a Western Blot contra la proteína atrogina-1. **(A)** Tinción de aglutinina de germen de trigo (WGA) y DAPI, para determinar la presencia de núcleos centrales en fibras musculares que se observan en las puntas de flecha amarillas. **(B)** Cuantificación del número de fibras musculares del músculo TA con presencia de núcleos centrales. Se analizaron 3204 fibras en el modelo WT (N= 5) y 4169 (N=6) fibras en el modelo KOp75 **(C)** Imagen de la técnica de generación de segundos armónicos para la detección de colágeno en el endomisio. **(D)** Tinción inmunohistoquímica contra la proteína de matriz extracelular fibronectina. **(E)** Inmunodetección por Western Blot del marcador de atrofia muscular atrogina-1 junto a su control de carga GAPDH. **(F)** Cuantificación de la intensidad de banda de atrogina-1 con relación al control de carga GAPDH. Se analizaron extractos de músculo Gastrocnemius de 5 músculos del modelo WT y 4 músculos del modelo KOp75. Los resultados se expresan en promedio $\pm$ SEM de n= 5 modelos WT y n= 4-6 modelos KOp75. Para el análisis estadístico se utilizó test t-no pareado (ns=no significativo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

DISCUSIÓN

La UNM es la conexión especializada entre el terminal axónico de una motoneurona y el dominio postsináptico de una fibra muscular esquelética, siendo la integridad de esta sinapsis esencial para transducir la señal del axón motor e iniciar la contracción muscular. Se ha demostrado que vías de señalización activadas por neurotrofinas están asociadas a la sinaptogénesis, regulación de la transmisión sináptica, así como a la mantención de la UNM [47, 50-52, 55, 58, 89]. El receptor p75 juega un rol fundamental en estas vías de señalización, pues aumenta la afinidad de las neurotrofinas por sus receptores Trk y desempeña roles cruciales en el mantenimiento de la UNM madura [57, 66, 77]. Sin embargo, la posible función de la señalización dependiente de neurotrofinas y del receptor p75 sobre la organización estructural de las UNMs y fibras musculares durante el envejecimiento no han sido abordadas en profundidad.

El envejecimiento es un proceso complejo e irreversible que se caracteriza por la manifestación de distintos grados de sarcopenia, que es el declive progresivo de la función y la masa muscular [33]. Diversos estudios han documentado la asociación entre la sarcopenia y el deterioro de la UNM, sugiriendo que la degeneración de la sinapsis neuromuscular precede a la aparición de sarcopenia durante el envejecimiento [27, 90, 91]. Los cambios

morfológicos que ocurren durante el envejecimiento de la UNM y las fibras musculares han sido bien documentados [15, 25, 28, 32, 92]. Igualmente, se ha descubierto que ciertos paradigmas experimentales, como el ejercicio físico y la restricción calórica, son capaces de revertir o atenuar la aparición de estas alteraciones características del envejecimiento, mejorando la innervación de la UNM y disminuyendo la fragmentación del aparato postsináptico [26]. En este contexto, estudios realizados en modelos de recuperación funcional posterior a daño en nervios periféricos han sugerido que posterior a la injuria, el ejercicio físico induce un incremento de la producción de factores de crecimiento locales y sistémicos, incluidos los factores neurotróficos pro-BDNF, BDNF y NT4, así como de los receptores p75 y TrkB [36, 93-95]. En su conjunto, estos antecedentes sugieren que la familia de las NTs, incluido el receptor p75, podrían ejercer roles positivos en la atenuación de las alteraciones del envejecimiento en el tejido muscular.

Los resultados encontrados en la presente investigación demuestran que el receptor p75 es requerido para mantener la arquitectura de la sinapsis neuromuscular envejecida, debido a que su ausencia disminuye la innervación por parte de la motoneurona, así también la cobertura de las células terminales de Schwann sobre el terminal presináptico y finalmente la estabilidad de los AChRs en la sinapsis neuromuscular. A nivel muscular, los resultados obtenidos muestran una disminución del área de las fibras musculares rápidas. Dado que el receptor de NTs p75 es capaz de activar a una gran diversidad de vías de

señalización, gatillando una variedad de efectos biológicos, los resultados obtenidos utilizando como modelo ratones con expresión nula de p75 constituyen un aporte novedoso para comprender la fisiología de la UNM y la fibra muscular durante el envejecimiento. De esta manera, nuestros resultados proponen al receptor de neurotrofinas p75 como modulador de la arquitectura de la UNM envejecida, permitiendo la estabilidad morfológica de la sinapsis envejecida y la consiguiente estabilidad de la morfología muscular.

Rol de p75 sobre la arquitectura de la UNM durante el envejecimiento

Este trabajo de investigación es pionero en evaluar el efecto del silenciamiento del receptor p75 sobre la sinapsis neuromuscular envejecida. Nuestros resultados indican que la ausencia del receptor p75 exacerba alteraciones propias del envejecimiento como la denervación, observando un incremento en el porcentaje de UNMs denervadas en los ratones KOp75. Variados estudios han demostrado la importancia de las NTs en la remodelación del terminal axonal y la reinervación post denervación quirúrgica [96-98]. En estudios previos realizados en modelos murinos adultos, la transección del nervio ciático del músculo TA provoca tanto un aumento en la expresión de pro-BDNF y p75, una disminución en la expresión de TrkB, así como aumentos en la transcripción de BDNF y disminución de los transcritos de NT3 [98, 99], sugiriendo que ante injuria la expresión de p75 muscular incrementa. De modo contrario, la activación de la vía TrkB/BDNF en motoneuronas potencia la recuperación

funcional en músculos diafragma sometidos a denervación quirúrgica; como también la expresión de BDNF y NGF en auto injertos tras transección de nervio provocan un aumento en el número de axones en regeneración a corto plazo (2 semanas) [97, 100]. En conjunto, esta evidencia sugiere que las NTs están involucradas en los procesos que subyacen a la denervación quirúrgica del músculo esquelético y que, por tanto, podrían desempeñar funciones durante la denervación a causa del envejecimiento. De hecho, en estudios realizados en ratones de envejecimiento temprano (18 meses) se ha observado que la inhibición del receptor TrkB disminuye la superposición de los componentes pre y postsinápticos e incrementa la proporción de UNMs denervadas en el músculo diafragma, siendo esta investigación la única que ha abordado el rol de las neurotrofinas en la sinapsis neuromuscular envejecida [56].

En este contexto, cabe preguntarse ¿cómo varían los niveles de expresión de las NTs durante la vida y en el envejecimiento? Durante el desarrollo embrionario, las NTs y sus receptores han sido ampliamente asociados a la formación y mantenimiento de la UNM [37, 47-49, 59, 101]. En el músculo LAL de ratas de 6 días postnatales, NT4 y TrkB se localizan con los agregados de AChRs y el terminal de la motoneurona [101], mientras que BDNF es expresado en el terminal axonal y en toda la fibra muscular [51]. Por su parte, NT3 se expresa en el terminal axonal como también en la región del axón previa a la sinapsis, mientras su receptor TrkC se localiza en el axón motor y en el aparato postsináptico, conjuntamente con los AChRs [102]. Por su parte, el receptor p75

se expresa en los tres componentes celulares de la UNM en sinapsis inmaduras, co-localizando con el axón motor, con los agregados del AChR y con las células de Schwann [49, 103]. Sin embargo, los niveles de NTs cambian en la adultez [104, 105]. Se ha reportado que durante estadíos adultos existe expresión de TrkB en motoneuronas, mientras que los niveles de p75 son indetectables [68]. Sin embargo, aun cuando la expresión de NTs varía en estadíos adultos, TrkB y p75, junto a NT4 y BDNF, se han localizado mediante tinciones inmunohistoquímicas en la UNM adulta del músculo LAL [103]. Durante el envejecimiento, ocurre una inversión en la expresión de p75 y TrkB, dando origen a motoneuronas con altos niveles de ARNm de p75 y bajos de TrkB [68, 106]. También se ha visualizado por tinciones inmunohistoquímicas una disminución de TrkB en las UNMs de músculos Soleus envejecidos, en comparación con modelos WT jóvenes [106]. Por su parte, durante el envejecimiento se ha descrito que los niveles de transcritos de las NTs no varían en músculos Vastus lateralis, a excepción del receptor TrkC, que muestra una expresión aumentada [24]. En resumen, aun cuando existe relativamente poca evidencia que relacione las alteraciones del envejecimiento de la UNM y de la fibra muscular con las NTs, estas han sido localizadas en la sinapsis a lo largo de la vida, ejerciendo una función esencial en la organización estructural y funcionalidad de la UNM.

Es importante señalar que la señalización dependiente de NTs, incluyendo aquella mediada por p75, siempre depende del contexto celular, tanto fisiológico como patológico. Por ejemplo, en modelos de Esclerosis Lateral Amiotrófica, una

enfermedad neurodegenerativa que cursa con denervación de la UNM, degeneración de las motoneuronas y fallas en la contracción muscular, se han demostrado altos niveles de p75 en motoneuronas de la médula espinal en su etapa sintomática [107, 108]. En dicho modelo, el silenciamiento de p75 ha demostrado retardar la aparición de síntomas y muerte de motoneuronas, sugiriendo que este receptor desempeña un rol crucial en las vías de señalización asociadas a la muerte neuronal, lo que ha permitido proponer el silenciamiento de p75 como un posible blanco terapéutico [74-76]. De manera comparable, se ha descrito que durante el envejecimiento ocurre un aumento de p75 en el sistema nervioso central, lo que influye de manera negativa en la plasticidad sináptica del hipocampo, afectando procesos como la memoria y el aprendizaje [67], lo que junto a la disminución de TrkA, provoca aumentos en la producción de péptidos β -amiloides característicos de la patología de la Enfermedad de Alzheimer [69, 70]. Además, se ha descrito que el silenciamiento de p75 provoca aumentos en el tamaño y número de neuronas colinérgicas [71, 72] lo que, en forma similar, indica que p75 puede actuar como un regulador negativo de la plasticidad neuronal y, por ende, como posible blanco terapéutico para ser inhibido en la Enfermedad de Alzheimer.

De esta manera, el presente trabajo de tesis es pionero en sugerir una función diferente para p75 sobre la sinapsis neuromuscular, demostrando que su señalización durante el envejecimiento es requerida para la mantención del terminal presináptico y la estabilidad de los AChRs, lo que pone una nota de

cuidado respecto a la potencial utilidad de la inhibición crónica de p75 en contextos patológicos. Estos resultados se corresponden con evidencia previa obtenida en animales adultos, donde el silenciamiento de p75 genera una disminución en el número de vesículas presinápticas y en la funcionalidad neuromuscular [57].

Concomitante con la denervación de la UNM, en este trabajo se observó que la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento genera una disminución en la superposición de las células de Schwann terminales con el terminal presináptico; componente celular crucial en el mantenimiento de la UNM [31]. Según estudios previos, durante el envejecimiento existe una pérdida en el contacto de las células de Schwann terminales y su superposición con las UNMs [29, 31]. Sin embargo, escasos estudios han relacionado a este tipo celular con las NTs o el receptor p75. Se ha reportado que la sobre-expresión de NT3 en fibras musculares en estadios perinatales provoca un aumento en el número de células de Schwann terminales por sinapsis neuromuscular [59], lo que se debe a una inducción de la migración de este tipo celular exclusivamente a través de la señalización de TrkC en ausencia de p75 [109]. Se ha descrito que p75 es expresado en células de Schwann durante el desarrollo y que participa en la mielinización de los axones motores [66, 110]. En UNMs adultas de músculo LAL se han co-localizado BDNF, NT4, TrkB y p75 con la tinción S100B, pero su función en el mantenimiento de la UNM es desconocida [103]. Adicionalmente, se han descrito funciones de las NTs ante injuria al nervio que involucran a las

células de Schwann. Por ejemplo, durante la retracción axonal aumentan los niveles de NGF y p75 en las células de Schwann terminales [31] y la inyección de NGF *in situ* en el nervio ciático, posterior a la transección, promueve la autofagia de las células de Schwann mielinizadas durante la degeneración walleriana a través de la señalización mediada por p75 [111]. Resultados similares se han encontrado en modelos de regeneración periférica tras el trasplante de un segmento de nervio ciático desde ratones KOp75, donde se observó una disminución de la re-mielinización y crecimiento axonal en aquellos ratones WT que fueron trasplantados con un segmento de nervio del modelo KOp75 [112]. Esta evidencia, junto a los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, permiten concluir que el receptor p75 desempeña un rol crucial en las células de Schwann durante la regeneración axonal. Así mismo, es posible sugerir que las células terminales de Schwann, que participan de la retracción axonal [113], disminuirían su capacidad regenerativa ante el silenciamiento de p75 durante el envejecimiento.

Rol de p75 sobre el aparato postsináptico durante el envejecimiento

Al evaluar si el silenciamiento de p75 afecta la fragmentación característica del dominio postsináptico durante el envejecimiento, los resultados indican que la expresión de p75 no afecta el porcentaje de UNMs fragmentadas ni su grado de fragmentación. Al respecto, se ha reportado que la ausencia de la NT4 genera

un aumento significativo del porcentaje de UNM fragmentadas en el músculo Soleus de animales adultos, que se acompañan de un aumento en la fatiga y respuestas electrofisiológicas alteradas [58]. Igualmente, la disrupción de TrkB en etapas adultas mediante la sobreexpresión de la forma trunca del receptor TrkB.t1 provoca aumentos en la fragmentación de las UNMs en el músculo Esternomastoideo [52, 55], mientras que un aumento en la actividad de esta vía de señalización a través del silenciamiento de esta forma trunca produce agregados del AChR de mayor tamaño que los controles y favorece su agregación [114]. Estos estudios demuestran que la vía de señalización mediada por TrkB regula la estructura del aparato postsináptico, afectando también la función de la sinapsis neuromuscular. De hecho, se ha documentado una co-localización de TrkB con los AChRs y que durante el envejecimiento disminuye la expresión de este receptor TrkB de manera simultánea con la aparición de la fragmentación de la UNM envejecida [106]. Sin embargo, de acuerdo con la caracterización en estadios adultos del modelo murino KOp75, la ausencia de este receptor no influye en la activación de la vía TrkB en el músculo TA, observada a través de la cuantificación de TrkB fosforilado [57]. Así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la señalización mediada por p75 no influye en la fragmentación postsináptica característica del envejecimiento, al menos en las ventanas de tiempo evaluadas. Sin perjuicio de lo anterior, observamos que la ausencia del receptor p75 provoca un aumento significativo en el porcentaje de aparatos postsinápticos menos complejos sólo

en el músculo LAL, no así en el músculo Lumbrical. Según la caracterización del modelo KOp75 en estadíos adultos realizada previamente en nuestro laboratorio, esta alteración se observa igualmente en el aparato postsináptico del músculo diafragma, atribuyendo un rol de este receptor en la progresión de la maduración del aparato postsináptico representado por una disminución de la complejidad de los dominios postsinápticos [57]. Este resultado sería concordante con la noción de la susceptibilidad diferencial de ambos músculos (Lumbrical y LAL) al envejecimiento [83]. Así, ya que el músculo LAL posee un fenotipo de envejecimiento tardío, las observaciones en este serían similares al modelo adulto, lo que justificaría el aumento significativo de las estructuras poco complejas, a diferencia del músculo Lumbrical, de envejecimiento temprano, donde la fragmentación es mucho mayor en comparación con los aparatos postsináptico que poseen morfología tipo pretzel.

A la luz de nuestros resultados y los de la literatura, una pregunta interesante es si la fragmentación es la principal causante del declive funcional en el envejecimiento. Se ha descrito que no existe una correlación entre ambos factores. Como ejemplo, en el modelo murino adulto de Distrofia Muscular de Duchenne, las UNMs están dentro de las más fragmentadas que han sido estudiadas y dichos animales viven vidas largas y activas [115]. Sólo en un estudio se ha comparado directamente el número de fragmentos de AChRs y detalles de la neurotransmisión en la sinapsis neuromuscular. En ese trabajo, no se observó una correlación entre la fragmentación (que aumentaba durante el

envejecimiento) con parámetros electrofisiológicos asociados a la transmisión sináptica como los potenciales miniatura de placa motora espontáneos (mEPPs) o el contenido cuantal de acetilcolina en vesículas de músculos Diafragma y Extensor digitorum longus [116]. Ante esto, es importante enfatizar que la fragmentación de la UNM no es el único cambio morfológico que ocurre en la UNM envejecida y que la innervación y el correcto alineamiento a nivel ultraestructural tiene mucha más significancia en la función de esta sinapsis [57, 83, 117].

Estabilidad, densidad y conformación de AChRs en ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento

Los AChRs nicotínicos son heteropentámeros conformados por dos subunidades alfa, una beta, una delta y una quinta subunidad que puede ser gama o épsilon. Dependiendo de su configuración, los AChRs pueden dividirse en AChRs adultos, si poseen la subunidad épsilon, o fetales, si contienen la subunidad gama [88]. La re-expresión de la subunidad gama se ha considerado un marcador de denervación de UNMs adultas y variados estudios han asociado a los AChRs inmaduros o fetales con una menor estabilidad sobre la membrana de la fibra muscular en comparación a los AChRs maduros o adultos [118]. En este trabajo, al analizar la conformación de los AChRs mediante Western Blot observamos que la ausencia del receptor p75 no alteraba la expresión de las subunidades épsilon y gama, pero sí su estabilidad y densidad en la superficie

muscular, visualizada mediante la doble tinción con α -BTX. Estudios previos muestran que durante el envejecimiento ocurre un aumento tanto en la expresión como en los niveles de transcritos de las subunidades alfa, épsilon y gama [24, 27]. Además, se ha reportado que diversas condiciones pueden alterar la composición y estabilidad de los AChRs. Por ejemplo, la denervación por daño axonal o enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica se acompañan de un aumento en la expresión de la subunidad gama y un aumento en el recambio del AChR [88]. Se ha demostrado que en ausencia de actividad sináptica, producto de denervación quirúrgica o farmacológica, la tasa de recambio de AChRs aumenta considerablemente en comparación con músculos activos, desde 9-14 días en condiciones normales a 1-3 días ante denervación [87], mientras que la restauración de la actividad sináptica o estimulación directa al músculo previene esta alteración del recambio de AChRs [119]. Sin embargo, escasos estudios han evaluado la relación entre las NTs y la composición, densidad o estabilidad de los AChRs. Se ha reportado que el silenciamiento de BDNF causa una disminución en músculos Gastrocnemius de la subunidad épsilon junto con Dok7, MuSK y rapsina, proteínas de andamiaje que participan en la incorporación y mantenimiento de los AChRs en el aparato postsináptico en la membrana muscular [120]. Mientras que el silenciamiento de NT4 en estadios adultos provoca una disminución en la densidad de AChRs alterando las respuestas electromiográficas y afectando la resistencia a la fatiga en músculos Soleus [58]. Igualmente, se ha reportado que la ausencia del

receptor p75 en ratones adultos no genera diferencias en la proporción de aparatos postsinápticos estables o dinámicos en condiciones normales o frente a la denervación del músculo LAL [57]. Así, en este trabajo descubrimos que la ausencia de p75 durante el envejecimiento tiene un efecto específico en la desestabilización de los AChRs de superficie, produciendo un recambio acelerado y disminuyendo su densidad en las UNMs, sin alterar la expresión de las subunidades gama o épsilon del receptor.

Efectos de p75 en las fibras musculares durante el envejecimiento

Junto al análisis de la UNM, en este trabajo observamos que la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento no generaba cambios en la fibrosis, regeneración o atrofia muscular. Resultados similares se observaron en la caracterización previa realizada en modelos KOp75 en estadíos adultos, lo que permite sugerir que el receptor p75 no influye en la deposición de matriz extracelular, en la regeneración y en la atrofia de fibras musculares [57]. Sin embargo, estudios previos han reportado que BDNF controla la diferenciación de células satélite, células madre residentes del músculo esquelético adulto que poseen roles en la reparación del tejido muscular [60-62]. En estas células, se ha descrito que el receptor p75 regula su diferenciación y es expresado ante denervación, siendo un marcador para fibras en regeneración [121]. Estudios transcriptómicos de fibras que presentan alta expresión de p75 confirman que este receptor se asocia con una población de fibras musculares que poseen una

alta expresión de proteínas asociadas con el desarrollo y maduración muscular [122]. Sin embargo, nuestros resultados indican que la ausencia del receptor p75 durante el envejecimiento *per se* no promueve ciclos de daño y regeneración muscular, evaluada por la aparición de núcleos centrales en las fibras musculares.

Al estudiar el calibre de las fibras musculares, observamos que el silenciamiento de p75 resulta en inducción de atrofia exclusivamente en las fibras rápidas durante el envejecimiento [19]. En este contexto, es importante mencionar que estudios previos han demostrado que las NTs participan en el metabolismo de las fibras musculares. De manera particular, se ha descrito que BDNF es producido ante la contracción muscular inducida y que genera un aumento en el metabolismo de lípidos a través de TrkB [61]. En otros estudios, se ha observado que el silenciamiento de BDNF en ratones adultos aumenta la expresión de marcadores de metabolismo oxidativo en músculos Extensor digitorum longus y TA (músculos de metabolismo principalmente glicolítico), y que, en estadios más envejecidos, este fenotipo más oxidativo de los músculos carentes de BDNF atenúa la pérdida de masa y función muscular durante el envejecimiento [120]. En relación con p75, escasos estudios han evaluado su potencial rol en el cambio fenotípico de las fibras musculares. En ratones adultos, el silenciamiento de p75 provoca una disminución en el calibre de las fibras musculares rápidas y lentas y también deficiencias en la fuerza y fatiga muscular, sin aumentar los niveles del marcador de atrofia Murf-1 [57]. También se ha

descrito que, en cultivos de mioblastos derivados de células satélites, la administración de pro-NGF provoca un aumento en la expresión de la cadena pesada de miosina de fibras rápidas que se acompaña de una disminución en la expresión de marcadores de metabolismo oxidativo característicos de fibras lentas [123]. En dicho estudio, se confirmó que esta transición dependía de p75, pues la administración de LM11A-31 (un ligando sintético que bloquea la señalización del receptor) impide los cambios inducidos por la administración de pro-NGF [123]. Estos resultados permiten sugerir que la señalización mediada por p75 influye en las fibras musculares de tipo rápida y que, durante el envejecimiento, la ausencia de este receptor provocaría una disminución en la síntesis de proteínas de este tipo de fibras, disminuyendo su calibre.

CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente trabajo de tesis sugieren que la señalización de p75 es crucial para la maduración y estabilidad de la UNM durante el envejecimiento. De manera particular, su silenciamiento crónico resulta en una disminución de la innervación postsináptica, así como en la cobertura de las células terminales de Schwann sobre el terminal presináptico, sugiriendo un rol activo en el mantenimiento del terminal presináptico y de la morfología de las células terminales de Schwann. Nuestros resultados también sugieren que p75 influye sobre la arquitectura del dominio postsináptico durante el envejecimiento, afectando la complejidad, estabilidad y densidad de los AChRs en la membrana muscular. Por otra parte, observamos que la ausencia de p75 provoca una disminución del calibre de fibras rápidas, las que además disminuyen su proporción durante el envejecimiento, fenotipos que están asociados al rol crucial que juega p75 sobre el metabolismo y diferenciación muscular. En su conjunto, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el receptor de NTs p75 es requerido para la estabilidad del dominio postsináptico y la mantención de la estructura de los componentes celulares de la sinapsis neuromuscular envejecida.

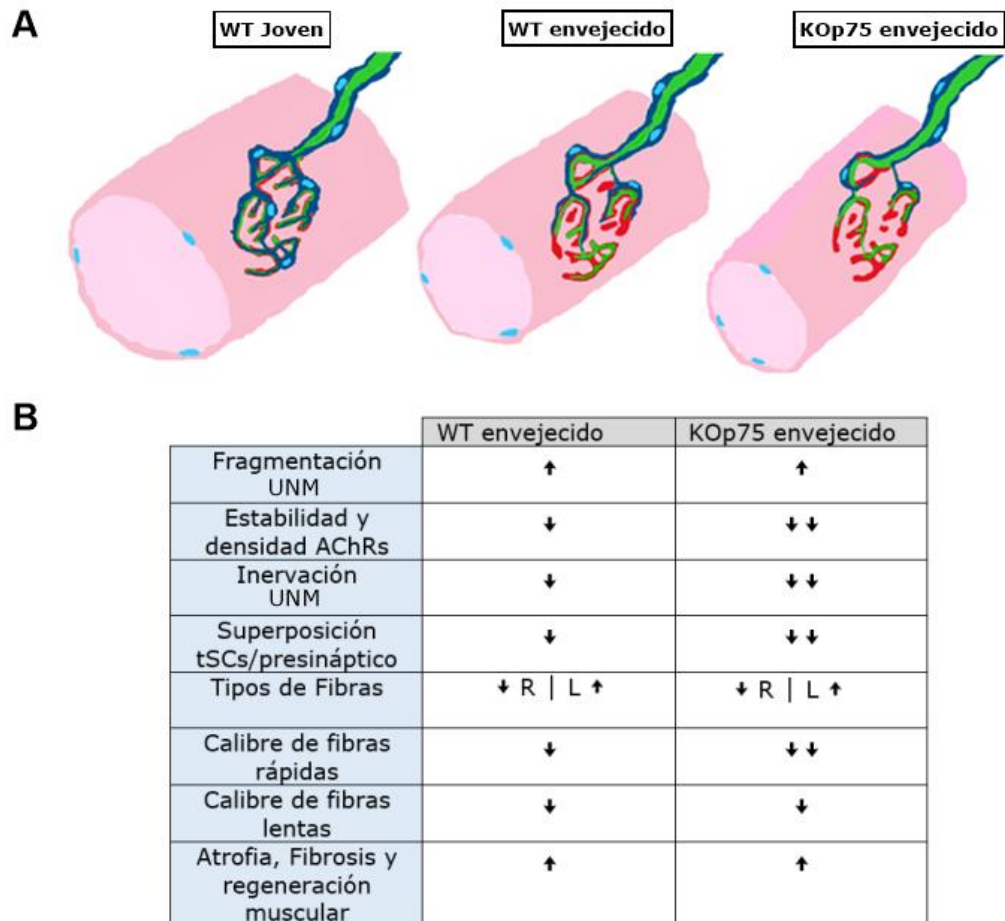
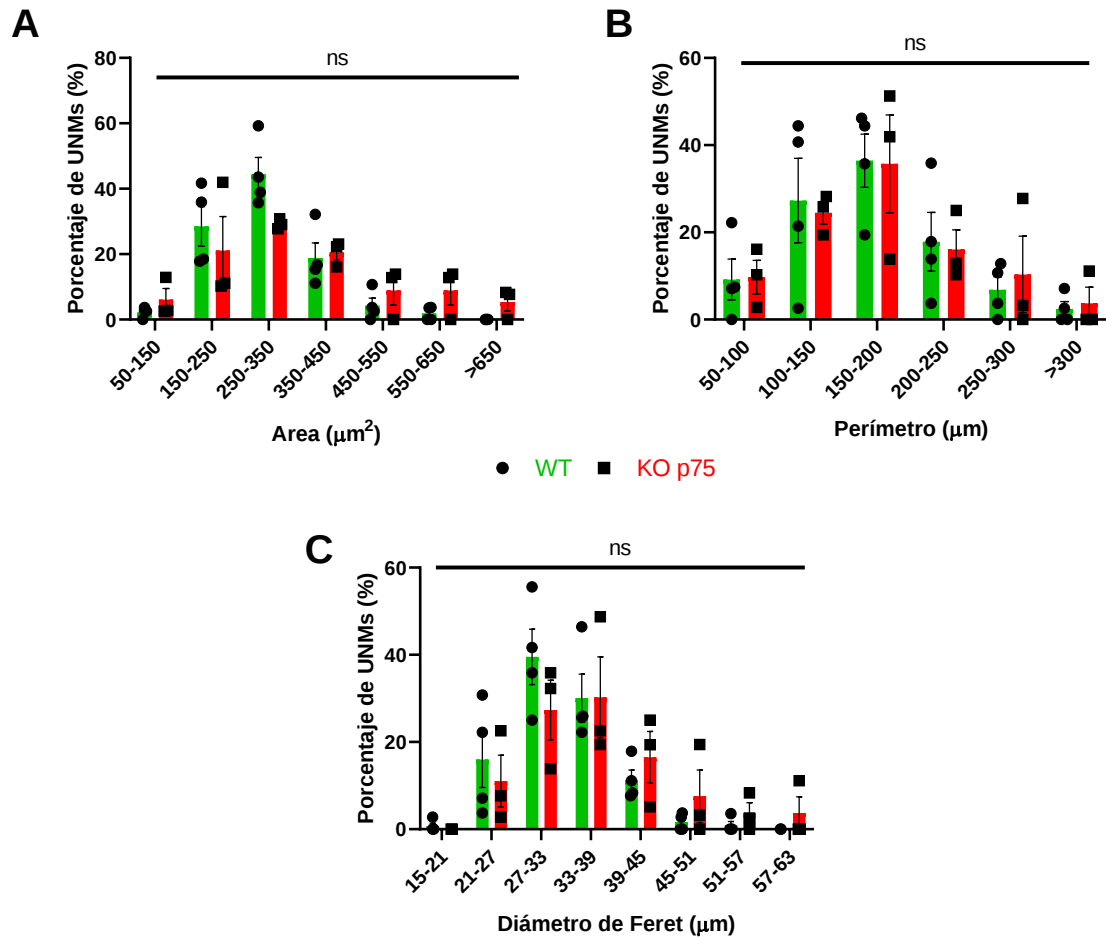


Figura 16: Resumen de los cambios observados durante el envejecimiento de la UNM y la fibra muscular frente al silenciamiento del receptor p75.

(A) Esquema gráfico de los principales cambios observados en los modelos envejecidos WT y KOp75 junto al modelo WT joven. **(B)** Tabla resumen de los parámetros observados y su diferencia entre los dos modelos envejecidos (WT y KOp75) en comparación con el modelo WT joven según lo reportado previamente [CITAS]. La fragmentación entre ambos modelos está aumentada de manera

similar, mientras que la estabilidad y densidad de los AChRs, la innervación y la superposición de las células terminales de Schwann (tSCs) sobre el terminal presináptico presentan una disminución mayor en el modelo envejecido KOp75. En relación con los parámetros musculares se observa una disminución mayor sólo del calibre de las fibras musculares rápidas y no de las fibras lentas en el modelo envejecido KOp75, mientras que la proporción de tipos de fibras, la presencia de fibrosis, atrofia y regeneración muscular están alteradas de manera similar entre ambos modelos.

ANEXOS



Anexo 1: Distribución en intervalos de las cuantificaciones del terminal postsináptico del músculo Lumbrical.

Músculos Lumbrical de ratones WT y KO p75 fueron sometidos a tinción inmunohistoquímica contra los AChRs utilizando α -BTX. Luego, de los aparatos postsinápticos que se observaban en un plano frontal se realizó la cuantificación

del área y perímetro de los AChRs y del diámetro de Feret. **(A)** Distribución del área postsináptica en intervalos. **(B)** Distribución del perímetro postsináptico en intervalos. **(C)** Distribución del diámetro de Feret en intervalos. Los resultados representan el promedio $\pm$ SEM de n= 3-4 ratones por condición WT y KOp75. Se utilizó test ANOVA de 2 colas (ns= no significativo, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

GLOSARIO

UNM: Unión neuromuscular

Trk: Receptor tirosina-kinasa

ACh: Acetilcolina

AChR: Receptor de Acetilcolina

WT: Wildtype

KOp75: Knock-out para el receptor p75

NTs: Neurotrofinas

NGF: Factor de crecimiento neural

BDNF: Factor neurotrófico derivado de cerebro

NT3: Neurotrofina 3

NT4: Neurotrofina 4

TNF: Factor de necrosis tumoral

CSA: Área de sección transversal

IHQ: Inmunohistoquímica

WB: Western Blot

TA: Tibial Anterior

LAL: Levator Auris Longus

BTX: Bungarotoxina

BIBLIOGRAFÍA

1. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 791-805.
2. Li, L., W.C. Xiong, and L. Mei, *Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders*. Annu Rev Physiol, 2018. **80**: p. 159-188.
3. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Development of the vertebrate neuromuscular junction*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 389-442.
4. Liu, W. and J.V. Chakkalakal, *The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions*. Curr Top Dev Biol, 2018. **126**: p. 99-124.
5. Lin, W., et al., *Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism*. Neuron, 2005. **46**(4): p. 569-79.
6. Yang, J., et al., *Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse*. Nat Neurosci, 2011. **14**(3): p. 324-30.
7. Colman, D.R., *Neurites, synapses, and cadherins reconciled*. Mol Cell Neurosci, 1997. **10**(1-2): p. 1-6.
8. Lin, W., et al., *Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1299-304.
9. Ko, C.P. and R. Robitaille, *Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(10): p. a020503.
10. Bloch-Gallego, E., *Mechanisms controlling neuromuscular junction stability*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(6): p. 1029-43.
11. Lanuza, M.A., et al., *Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C*. J Neurosci Res, 2002. **67**(5): p. 607-17.
12. Wu, H., W.C. Xiong, and L. Mei, *To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly*. Development, 2010. **137**(7): p. 1017-33.
13. Khosa, S., et al., *An Overview of Neuromuscular Junction Aging Findings in Human and Animal Studies*. Curr Aging Sci, 2019. **12**(1): p. 28-34.

14. Ackert-Bicknell, C.L., et al., *Aging Research Using Mouse Models*. Curr Protoc Mouse Biol, 2015. **5**(2): p. 95-133.
15. Gonzalez-Freire, M., et al., *The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 208.
16. Deschenes, M.R., *Effects of aging on muscle fibre type and size*. Sports Med, 2004. **34**(12): p. 809-24.
17. Kalinkovich, A. and G. Livshits, *Sarcopenia--The search for emerging biomarkers*. Ageing Res Rev, 2015. **22**: p. 58-71.
18. Rowan, S.L., et al., *Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29082.
19. Frontera, W.R., *Physiologic Changes of the Musculoskeletal System with Aging: A Brief Review*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2017. **28**(4): p. 705-711.
20. Lyu, A.K., et al., *Inhibition of TLR9 attenuates skeletal muscle fibrosis in aged sarcopenic mice via the p53/SIRT1 pathway*. Exp Gerontol, 2019. **122**: p. 25-33.
21. Mahdy, M.A.A., *Skeletal muscle fibrosis: an overview*. Cell Tissue Res, 2019. **375**(3): p. 575-588.
22. Blasco, A., et al., *Motoneuron deafferentation and gliosis occur in association with neuromuscular regressive changes during ageing in mice*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2020. **11**(6): p. 1628-1660.
23. Deschenes, M.R., et al., *Muscle fibers and their synapses differentially adapt to aging and endurance training*. Exp Gerontol, 2018. **106**: p. 183-191.
24. Aare, S., et al., *Failed reinnervation in aging skeletal muscle*. Skelet Muscle, 2016. **6**(1): p. 29.
25. Taetzsch, T. and G. Valdez, *NMJ maintenance and repair in aging*. Curr Opin Physiol, 2018. **4**: p. 57-64.
26. Valdez, G., et al., *Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14863-8.
27. McMullen, C.A. and F.H. Andrade, *Functional and morphological evidence of age-related denervation in rat laryngeal muscles*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(4): p. 435-42.

28. Chen, J., T. Mizushige, and H. Nishimune, *Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice*. J Comp Neurol, 2012. **520**(2): p. 434-52.
29. Snyder-Warwick, A.K., et al., *Hypothalamic Sirt1 protects terminal Schwann cells and neuromuscular junctions from age-related morphological changes*. Aging Cell, 2018. **17**(4): p. e12776.
30. Chai, R.J., et al., *Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28090.
31. Fuertes-Alvarez, S. and A. Izeta, *Terminal Schwann Cell Aging: Implications for Age-Associated Neuromuscular Dysfunction*. Aging Dis, 2021. **12**(2): p. 494-514.
32. Courtney, J. and J.H. Steinbach, *Age changes in neuromuscular junction morphology and acetylcholine receptor distribution on rat skeletal muscle fibres*. J Physiol, 1981. **320**: p. 435-47.
33. Bao, Z., et al., *AChRs Degeneration at NMJ in Aging-Associated Sarcopenia-A Systematic Review*. Front Aging Neurosci, 2020. **12**: p. 597811.
34. Stockinger, J., et al., *Caloric Restriction Mimetics Slow Aging of Neuromuscular Synapses and Muscle Fibers*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2017. **73**(1): p. 21-28.
35. Nishimune, H., J.A. Stanford, and Y. Mori, *Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction*. Muscle Nerve, 2014. **49**(3): p. 315-24.
36. Just-Borràs, L., et al., *Running and Swimming Differently Adapt the BDNF/TrkB Pathway to a Slow Molecular Pattern at the NMJ*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(9): p. 4577.
37. Funakoshi, H., et al., *Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons*. Science, 1995. **268**(5216): p. 1495-9.
38. Ceni, C., et al., *Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **220**: p. 193-221.
39. Chao, M.V., *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(4): p. 299-309.
40. Chowdary, P.D., D.L. Che, and B. Cui, *Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport*. Annu Rev Phys Chem, 2012. **63**: p. 571-94.
41. Friedman, W.J., *Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis*. Neuroscientist, 2010. **16**(3): p. 244-52.

42. Meeker, R. and K. Williams, *Dynamic nature of the p75 neurotrophin receptor in response to injury and disease*. J Neuroimmune Pharmacol, 2014. **9**(5): p. 615-28.
43. Seidah, N.G., et al., *Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases*. FEBS Lett, 1996. **379**(3): p. 247-50.
44. Mowla, S.J., et al., *Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 12660-6.
45. Lee, R., et al., *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1945-8.
46. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006. **361**(1473): p. 1545-1564.
47. Je, H.S., et al., *ProBDNF and mature BDNF as punishment and reward signals for synapse elimination at mouse neuromuscular junctions*. J Neurosci, 2013. **33**(24): p. 9957-62.
48. Nadal, L., et al., *Presynaptic Muscarinic Acetylcholine Receptors and TrkB Receptor Cooperate in the Elimination of Redundant Motor Nerve Terminals during Development*. Front Aging Neurosci, 2017. **9**: p. 24.
49. Garcia, N., et al., *Blocking p75 (NTR) receptors alters polyinnervation of neuromuscular synapses during development*. J Neurosci Res, 2011. **89**(9): p. 1331-41.
50. Yang, F., et al., *Pro-BDNF-induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses*. J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 727-41.
51. Garcia, N., et al., *Involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the functional elimination of synaptic contacts at polyinnervated neuromuscular synapses during development*. J Neurosci Res, 2010. **88**(7): p. 1406-19.
52. Gonzalez, M., et al., *Disruption of Trkb-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 567-83.
53. Carrasco, D.I. and A.W. English, *Neurotrophin 4/5 is required for the normal development of the slow muscle fiber phenotype in the rat soleus*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 13): p. 2191-200.
54. Ernfors, P., et al., *Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents*. Cell, 1994. **77**(4): p. 503-12.

55. Kulakowski, S.A., S.D. Parker, and K.E. Personius, *Reduced TrkB expression results in precocious age-like changes in neuromuscular structure, neurotransmission, and muscle function*. J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(3): p. 844-52.
56. Greising, S.M., et al., *Role of TrkB kinase activity in aging diaphragm neuromuscular junctions*. Exp Gerontol, 2015. **72**: p. 184-91.
57. Perez, V., et al., *The p75(NTR) neurotrophin receptor is required to organize the mature neuromuscular synapse by regulating synaptic vesicle availability*. Acta Neuropathol Commun, 2019. **7**(1): p. 147.
58. Belluardo, N., et al., *Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking neurotrophin-4*. Mol Cell Neurosci, 2001. **18**(1): p. 56-67.
59. Hess, D.M., et al., *Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses*. J Comp Neurol, 2007. **501**(4): p. 465-82.
60. Pedersen, B.K., et al., *Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals*. Exp Physiol, 2009. **94**(12): p. 1153-60.
61. Matthews, V.B., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase*. Diabetologia, 2009. **52**(7): p. 1409-18.
62. Clow, C. and B.J. Jasmin, *Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(13): p. 2182-90.
63. Greising, S.M., et al., *Ageing and neurotrophic signalling effects on diaphragm neuromuscular function*. J Physiol, 2015. **593**(2): p. 431-40.
64. Wong, L.W., et al., *Fading memories in aging and neurodegeneration: Is p75 neurotrophin receptor a culprit?* Ageing Res Rev, 2022. **75**: p. 101567.
65. Meeker, R.B. and K.S. Williams, *The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death*. Neural Regen Res, 2015. **10**(5): p. 721-5.
66. Kraemer, B.R., S.O. Yoon, and B.D. Carter, *The biological functions and signaling mechanisms of the p75 neurotrophin receptor*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **220**: p. 121-64.

67. Wong, L.W., et al., *Age-related changes in hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory mediated by p75 neurotrophin receptor*. Aging Cell, 2021. **20**(2): p. e13305.
68. Johnson, H., T. Hokfelt, and B. Ulfhake, *Expression of p75(NTR), trkB and trkC in nonmanipulated and axotomized motoneurons of aged rats*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **69**(1): p. 21-34.
69. Costantini, C., et al., *A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging*. Biochem J, 2005. **391**(Pt 1): p. 59-67.
70. Costantini, C., H. Scrable, and L. Puglielli, *An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation*. EMBO J, 2006. **25**(9): p. 1997-2006.
71. Naumann, T., et al., *Complete deletion of the neurotrophin receptor p75NTR leads to long-lasting increases in the number of basal forebrain cholinergic neurons*. J Neurosci, 2002. **22**(7): p. 2409-18.
72. Yeo, T.T., et al., *Absence of p75NTR causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, choline acetyltransferase activity, and target innervation*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7594-605.
73. Kerkhoff, H., et al., *Nerve growth factor receptor immunostaining in the spinal cord and peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis*. Acta Neuropathol, 1991. **81**(6): p. 649-56.
74. Lowry, K.S., et al., *A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2001. **2**(3): p. 127-34.
75. Turner, B.J., et al., *Antisense peptide nucleic acid-mediated knockdown of the p75 neurotrophin receptor delays motor neuron disease in mutant SOD1 transgenic mice*. J Neurochem, 2003. **87**(3): p. 752-63.
76. Matusica, D., et al., *Inhibition of motor neuron death in vitro and in vivo by a p75 neurotrophin receptor intracellular domain fragment*. J Cell Sci, 2016. **129**(3): p. 517-30.
77. Underwood, C.K. and E.J. Coulson, *The p75 neurotrophin receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1664-8.
78. Wang, L., M. Tian, and Y. Hao, *Role of p75 neurotrophin receptor in neuronal autophagy in intracerebral hemorrhage in rats through the mTOR signaling pathway*. Cell Cycle, 2020. **19**(3): p. 376-389.

79. Lee, K.F., et al., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. Cell, 1992. **69**(5): p. 737-49.
80. Woehlbier, U., et al., *ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction*. EMBO J, 2016. **35**(8): p. 845-65.
81. Zelada, D., F.J. Barrantes, and J.P. Henriquez, *Lithium causes differential effects on postsynaptic stability in normal and denervated neuromuscular synapses*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 17285.
82. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
83. Valdez, G., et al., *Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34640.
84. Jones, R.A., et al., *NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction*. Open Biol, 2016. **6**(12).
85. Sleigh, J.N., et al., *Morphological analysis of neuromuscular junction development and degeneration in rodent lumbrical muscles*. J Neurosci Methods, 2014. **227**: p. 159-65.
86. Ojeda, J., et al., *The Mouse Levator Auris Longus Muscle: An Amenable Model System to Study the Role of Postsynaptic Proteins to the Maintenance and Regeneration of the Neuromuscular Synapse*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 225.
87. Martinez-Pena, Y.V.I. and M. Akaaboune, *The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction*. Cells, 2021. **10**(2).
88. Cetin, H., et al., *The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle*. Front Mol Neurosci, 2020. **13**: p. 581097.
89. Zhan, W.Z., C.B. Mantilla, and G.C. Sieck, *Regulation of neuromuscular transmission by neurotrophins*. Sheng Li Xue Bao, 2003. **55**(6): p. 617-24.
90. Deschenes, M.R., et al., *Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers*. Exp Gerontol, 2010. **45**(5): p. 389-93.
91. Tamaki, T., M. Hirata, and Y. Uchiyama, *Qualitative alteration of peripheral motor system begins prior to appearance of typical sarcopenia syndrome in middle-aged rats*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 296.

92. Willadt, S., M. Nash, and C. Slater, *Age-related changes in the structure and function of mammalian neuromuscular junctions*. Ann N Y Acad Sci, 2018. **1412**(1): p. 41-53.
93. Park, J.S. and A. Hoke, *Treadmill exercise induced functional recovery after peripheral nerve repair is associated with increased levels of neurotrophic factors*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90245.
94. Hurtado, E., et al., *Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKCalpha and cPKCbeta*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 147.
95. Dupont-Versteegden, E.E., et al., *Exercise-induced gene expression in soleus muscle is dependent on time after spinal cord injury in rats*. Muscle Nerve, 2004. **29**(1): p. 73-81.
96. Zhao, C., et al., *NGF, BDNF, NT-3, and GDNF mRNA expression in rat skeletal muscle following denervation and sensory protection*. J Neurotrauma, 2004. **21**(10): p. 1468-78.
97. Hoyng, S.A., et al., *A comparative morphological, electrophysiological and functional analysis of axon regeneration through peripheral nerve autografts genetically modified to overexpress BDNF, CNTF, GDNF, NGF, NT3 or VEGF*. Exp Neurol, 2014. **261**: p. 578-93.
98. Michalski, B., J.R. Bain, and M. Fahnstock, *Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve*. J Neurochem, 2008. **105**(4): p. 1244-52.
99. Aby, K., et al., *Enhanced pro-BDNF-p75NTR pathway activity in denervated skeletal muscle*. Life Sci, 2021. **286**: p. 120067.
100. Mantilla, C.B., et al., *Motoneuron BDNF/TrkB signaling enhances functional recovery after cervical spinal cord injury*. Exp Neurol, 2013. **247**: p. 101-9.
101. Garcia, N., et al., *Neurotrophin-4 couples to locally modulated ACh release at the end of neuromuscular synapse maturation*. Neurosci Lett, 2010. **468**(1): p. 72-4.
102. Garcia, N., et al., *Involvement of neurotrophin-3 (NT-3) in the functional elimination of synaptic contacts during neuromuscular development*. Neurosci Lett, 2010. **473**(2): p. 141-5.
103. Garcia, N., et al., *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, 2010. **15**(1): p. 40-9.

104. Chevrel, G., R. Hohlfield, and M. Sendtner, *The role of neurotrophins in muscle under physiological and pathological conditions*. Muscle Nerve, 2006. **33**(4): p. 462-76.
105. Sakuma, K. and A. Yamaguchi, *The recent understanding of the neurotrophin's role in skeletal muscle adaptation*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 201696.
106. Personius, K.E. and S.D. Parker, *TrkB expression at the neuromuscular junction is reduced during aging*. Muscle Nerve, 2013. **47**(4): p. 532-8.
107. Shephard, S.R., et al., *The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e87398.
108. Seeburger, J.L., et al., *Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis*. Brain Res, 1993. **621**(1): p. 111-5.
109. Yamauchi, J., J.R. Chan, and E.M. Shooter, *Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14421-6.
110. Song, X.Y., et al., *Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice*. J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 833-42.
111. Li, R., et al., *Nerve growth factor activates autophagy in Schwann cells to enhance myelin debris clearance and to expedite nerve regeneration*. Theranostics, 2020. **10**(4): p. 1649-1677.
112. Tomita, K., et al., *The neurotrophin receptor p75NTR in Schwann cells is implicated in remyelination and motor recovery after peripheral nerve injury*. Glia, 2007. **55**(11): p. 1199-208.
113. Alvarez-Suarez, P., M. Gawor, and T.J. Proszynski, *Perisynaptic schwann cells - The multitasking cells at the developing neuromuscular junctions*. Semin Cell Dev Biol, 2020. **104**: p. 31-38.
114. Dorsey, S.G., et al., *Genetic deletion of trkB.T1 increases neuromuscular function*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C141-53.
115. Slater, C.R., *'Fragmentation' of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions*. Neuroscience, 2020. **439**: p. 28-40.
116. Willadt, S., M. Nash, and C.R. Slater, *Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24849.

117. Deschenes, M.R., et al., *Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type*. Dev Neurobiol, 2013. **73**(10): p. 744-53.
118. Zelada, D., et al., *Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2021. **96**(2): p. 752-766.
119. Akaaboune, M., et al., *Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo*. Science, 1999. **286**(5439): p. 503-7.
120. Delezie, J., et al., *BDNF is a mediator of glycolytic fiber-type specification in mouse skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(32): p. 16111-16120.
121. Deponti, D., et al., *The low-affinity receptor for neurotrophins p75NTR plays a key role for satellite cell function in muscle repair acting via RhoA*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(16): p. 3620-7.
122. Colombo, E., et al., *Human neurotrophin receptor p75NTR defines differentiation-oriented skeletal muscle precursor cells: implications for muscle regeneration*. J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(2): p. 133-42.
123. Pallottini, V., et al., *ProNGF/p75NTR Axis Drives Fiber Type Specification by Inducing the Fast-Glycolytic Phenotype in Mouse Skeletal Muscle Cells*. Cells, 2020. **9**(10).