



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

Estudio de la dinámica de los receptores de acetilcolina y la organización del aparato postsináptico de la unión neuromuscular: regulación por componentes de la vía Wnt

Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, área Biología Celular y Molecular

Diego Stefan Zelada Varas
Concepción-Chile
2022

Profesor guía: Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann

Departamento de Biología Celular,
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Pablo Henríquez

Profesor guía tesis
Universidad de Concepción

Dr. Luis Aguayo

Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dr. José Leonardo Guzmán

Profesor evaluador interno
Universidad de Concepción

Dra. Lorena Varela

Profesora evaluadora externa
Universidad Andrés Bello

Dr. Ariel Castro

Director Programa Doctorado
Ciencias Biológicas, área
Biología Celular y Molecular

Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT Regular 1170614 (2017-2020)

Beca de doctorado nacional CONICYT 21161461 (2016-2020)

Beca Gastos operacionales CONICYT 21161461 (2017-2018)

Beca UCO 1886 Fondo pasantía en el extranjero (2019-2020)

Beca UCO 1886 Fondo de apoyo a eventos de sociedades científicas (2020)

Apoyo Pasantía Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción (2017)

Beca apoyo décimo semestre proyecto EDPG (2020)

Para ti, mi Nati.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Juan Pablo Henríquez, por toda la libertad e independencia que me otorgó durante mi trabajo en su laboratorio, lo que sin duda lo hizo un pilar clave en la organización y retroalimentación de los experimentos desarrollados en esta tesis.

Al Dr. Francisco Barrantes, por darme la oportunidad de haber visitado su laboratorio y por su disposición y amabilidad para establecer una colaboración científica.

A la comisión evaluadora: Dra. Lorena Varela, Dr. Luis Aguayo y Dr. José Leonardo Guzmán, por aportar con su rigor científico en la retroalimentación y evaluación desde los inicios de esta tesis.

A los directores del programa del doctorado, Dr. Juan Pablo Henríquez y Dr. Ariel Castro, por toda su ayuda y apoyo en las distintas solicitudes y dificultades que surgieron como alumno del programa.

A mis compañeras de laboratorio, Dra. Viviana Pérez, Jéssica Mella, y Dra. Patricia Hanna por haberme dado su gran amabilidad, disposición y muestras cariño a lo largo de estos años.

De manera especial agradezco a Francisca Bermedo, a la Dra. Antonia Recabal, Dra. Francisca Espinoza y Dr. Víctor Baeza, quienes con su amistad decoraron los entretenidos momentos fuera del lab.

Agradezco también con mucho cariño a mi familia; a mis padres y hermanos, quienes a pesar de la distancia, siempre me mostraron su constante y fiel apoyo, lo que ha sido fundamental para poder cumplir mis metas durante mi formación.

Por último, en este espacio quiero agradecer con mi mayor emoción, a quien con su belleza e inteligencia me deslumbra cada día, mi Nati Saldivia. Por ser una referente de cómo conquistar el mundo, por tu paciencia —y lo más importante—, por haberme aceptado a estar junto a ti, para toda la vida.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. La sinapsis neuromuscular.....	1
2. Sinaptogénesis de la unión neuromuscular de vertebrados.....	4
3. Bases moleculares en el establecimiento de la unión neuromuscular.....	7
4. Estabilidad de los AChRs en el dominio postsináptico.....	10
5. Vías de señalización inducidas por Wnt.....	14
6. Rol de la vía Wnt en la sinapsis neuromuscular.....	16
7. El receptor de la vía Wnt, Frizzled-9, como receptor postsináptico.....	19
8. Participación de la vía Wnt luego del daño en la unión neuromuscular.....	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
III. HIPÓTESIS.....	27
IV. OBJETIVO GENERAL.....	27
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Animales de experimentación.....	28
2. Plásmidos.....	28
3. Electroporación del músculo <i>Levator auris longus</i>	29
4. Denervación del músculo LAL.....	29

5. Análisis de recambio de los AChRs <i>in vivo</i> : Ensayo de doble BTX.....	30
6. Inmunofluorescencia de músculo completo.....	31
7. Administración de Litio <i>in vivo</i>	32
8. Marcaje con Vicia Villosa <i>in vivo</i>	32
9. Detección de subpoblaciones de AChRs sometidas a recambio y reciclaje.....	33
10. Detección de subpoblaciones intracelulares de AChRs.	33
11. Inducción y detección de células satélites activas en el músculo LAL.....	34
12. Análisis de internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.....	34
13. Determinación de la densidad de AChRs <i>in vivo</i>	35
14. Western blot.	35
15. Inmunoprecipitación.....	37
16. Adquisición de imágenes.	37
17. Medición de intensidad de fluorescencia en la región postsináptica.....	38
18. Análisis morfométricos del dominio postsináptico.	39
19. Análisis compartimentalizados de la localización de AChRs en el dominio postsináptico. ...	39
20. Análisis estadístico.....	40
VII. RESULTADOS	41
Capítulo I: Dinámica de los AChRs en la unión neuromuscular luego del daño.	41
1. La denervación resulta en la desorganización de los AChRs en el dominio postsináptico.....	47
2. La pérdida en la estabilidad de los AChRs precede al dismantelamiento del dominio postsináptico inducido por la denervación.	49

3. La denervación genera compartimentos en las estructuras postsinápticas, donde las subpoblaciones de AChRs se localizan de manera diferencial.	55
4. Los AChRs que componen las estructuras postsinápticas denervadas exhiben recambio y reciclaje localizado de manera diferencial.	57
5. Los AChRs en los dominios extrasinápticos exhiben un alto grado de recambio y reciclaje. ..	60
6. La reinervación de los dominios postsinápticos no restituye la estabilidad de los AChRs reducida por la denervación.	64
7. La reinervación de la sinapsis neuromuscular impide el colapso estructural de los dominios postsinápticos inducido por la denervación.....	65
8. La restauración en la estabilidad de los AChRs es precedida por la fragmentación del aparato postsináptico.....	67
9. La estabilidad de los AChRs no depende del número de fragmentos que exhibe el dominio postsináptico tras el aplastamiento del nervio.....	71
10. La reinervación del dominio postsináptico es llevada a cabo por múltiples axones motores.	72
Capítulo II: Identificación de una subpoblación intracelular de AChRs que antecede a la fragmentación del dominio postsináptico.	77
1. La subpoblación de AChRs intracelulares exhibe un patrón de distribución similar a la subpoblación de AChRs ubicada en la superficie de los dominios postsinápticos.	77
2. Cambios en la distribución de AChRs intracelulares como resultado de la denervación.	78
3. Los mionúcleos no subyacen a las estructuras de AChRs intracelulares inducidas por la denervación.	80
4. Las estructuras de AChRs intracelulares no son proporcionadas por las células satélites residentes en la fibra muscular.	83

5. Las estructuras de AChRs intracelulares corresponden a focos de degradación del dominio postsináptico.....	87
Capítulo III. Fzd9 es requerido para la estabilidad de los AChRs <i>in vivo</i>	90
1. Fzd9 se localiza en el dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular madura.	90
2. La estabilidad de los AChRs es dependiente de los niveles de Fzd9 en la sinapsis neuromuscular madura.....	90
3. Fzd9 se encuentra basalmente acoplado a la subunidad $G\alpha_o$ en el músculo esquelético adulto.	94
4. Los niveles y localización sináptica de Fzd9 son regulados por la denervación de la unión neuromuscular.....	95
Capítulo IV: Litio, un inhibidor de la quinasa GSK3- β , regula diferencialmente la estabilidad de los AChRs <i>in vivo</i>	99
1. Litio inhibe el recambio de los AChRs en uniones neuromusculares inervadas.....	99
2. Litio no altera la organización morfológica del dominio postsináptico de la unión neuromuscular madura.....	100
3. Litio inhibe la internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.....	105
4. Litio incrementa el recambio de los AChRs en la unión neuromuscular luego del daño.....	106
5. Litio induce la aparición de micro-agregados del AChR y reduce la estabilidad de los agregados ectópicos del AChR en uniones neuromusculares denervadas.....	111
6. Litio altera la distribución de la subunidad- γ del AChR y de β -catenina en el dominio postsináptico de uniones neuromusculares denervadas.....	115
VIII. DISCUSIÓN.....	119

1. Una pérdida en la estabilidad de los AChRs precede a la desorganización morfológica del dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular.	119
2. Dinámica morfológica de la subpoblación de AChRs intracelulares.	123
3. Fzd9 en la regulación de la estabilidad de los AChRs.	127
4. Fzd9 como un GPCR en la sinapsis neuromuscular.	129
5. Fzd9 como regulador de la vía Wnt canónica en la sinapsis neuromuscular.	131
6. Rol dual de litio sobre la estabilidad de los AChRs.	134
IX. CONCLUSIONES	140
X. REFERENCIAS	141

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: La unión neuromuscular de vertebrados.....	2
Figura 2: Establecimiento de la unión neuromuscular madura.	6
Figura 3: Tráfico de los AChRs en la sinapsis neuromuscular madura.	11
Figura 4: Vías de señalización inducidas por Wnt.....	15
Figura 5: Ensayo de doble BTX para la determinación del recambio de los AChRs <i>in vivo</i>	42
Figura 6: Análisis del recambio de AChRs a través del tiempo.....	44
Figura 7: Análisis del recambio de AChRs por compartimentos en el dominio postsináptico.	46
Figura 8: Análisis del efecto de la denervación a largo plazo sobre la morfología y estabilidad del dominio postsináptico.	48
Figura 9: Análisis del efecto de la denervación sobre la estabilidad de los AChRs en el dominio postsináptico.....	50
Figura 10: Análisis del efecto de la denervación sobre la morfología del dominio postsináptico. ...	52
Figura 11: Análisis de los tipos de estructuras postsinápticas generadas por la denervación.	54
Figura 12: Análisis de los compartimentos donde se localizan las subpoblaciones de AChRs en los dominios postsinápticos denervados.	56
Figura 13: Análisis del reciclaje y recambio de los AChRs que componen los dominios postsinápticos denervados.....	59
Figura 14: Análisis del número y tipo de estructura postsináptica positiva solo para 555-BTX.	61
Figura 15: Análisis de la estabilidad y reciclaje de los AChRs en estructuras postsinápticas ectópicas.	63

Figura 16: Análisis de la estabilidad de los AChRs luego de la reinervación de los dominios postsinápticos.	66
Figura 17: Análisis de la morfología postsináptica ante distintos tipos de daño a la sinapsis neuromuscular.	68
Figura 18: Análisis del recambio y fragmentación del dominio postsináptico luego del aplastamiento del nervio.	70
Figura 19: Análisis de la relación entre estabilidad de AChRs y fragmentación del dominio postsináptico.	73
Figura 20: Análisis del perfil de reinervación luego del aplastamiento del nervio.	75
Figura 21: Análisis de la distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares en la unión neuromuscular madura.	79
Figura 22: Análisis de la distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares en la unión neuromuscular luego de la denervación.	81
Figura 23: Análisis entre la co-distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares y los núcleos de la fibra muscular.	82
Figura 24: Análisis de la distribución de células satélite y AChRs intracelulares en uniones neuromusculares denervadas.	84
Figura 25: Análisis de la distribución de mionúcleos y células satélite en uniones neuromusculares denervadas.	86
Figura 26: Análisis de la distribución de estructuras positivas para BTX-3 y estructuras LAMP1 ⁺ en uniones neuromusculares denervadas.	88
Figura 27: Análisis de la localización de Fzd9 y su silenciamiento en el músculo esquelético adulto.	91

Figura 28: Análisis de la estabilidad de los AChRs al modificar los niveles de Fzd9 en el músculo.	93
Figura 29: Análisis de interacción entre Fzd9 y la subunidad $G\alpha_o$	96
Figura 30: Análisis de los niveles y localización de Fzd9 luego de la denervación del músculo esquelético adulto.....	98
Figura 31: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares maduras.	101
Figura 32: Análisis del efecto de litio sobre la distribución de los AChRs en uniones neuromusculares maduras.	103
Figura 33: Litio no altera significativamente la organización de los dominios pre- y postsinápticos.	104
Figura 34: Análisis del efecto de litio sobre la internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.	107
Figura 35: Análisis del efecto de litio sobre la densidad de los AChRs en células CHO-K1/A5. ...	108
Figura 36: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares denervadas.....	110
Figura 37: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares luego de la denervación.....	112
Figura 38: Caracterización de los microagregados de AChR no-sinápticos inducidos por litio.	114
Figura 39: Litio altera la localización postsináptica de β -catenina y de la subunidad- γ de los AChRs en sinapsis neuromusculares denervadas.	116
Figura 40: Regulación del tráfico de AChRs en sinapsis inervadas y denervadas.....	126

Figura 41: Posible rol de Fzd9 en el mantenimiento del dominio postsináptico de la unión neuromuscular..... 133

RESUMEN

La sinapsis neuromuscular es la conexión sináptica entre la motoneurona y la fibra muscular. Disfunciones en esta sinapsis se manifiestan debido a patologías asociadas al aparato locomotor o por el daño traumático de la médula espinal y/o de nervios periféricos. De manera importante, los eventos de formación, maduración y estabilización de la unión neuromuscular son regulados por distintas moléculas y vías de señalización. En este contexto, diversas evidencias han relacionado la expresión de ligandos y efectores intracelulares de la vía Wnt con la sinapsis neuromuscular. Aun cuando se conoce poco respecto a la posible participación de los receptores Frizzled (Fzd), se ha descrito que Fzd9 regula la conectividad sináptica en el sistema nervioso central y, además, se localiza en la postsinapsis, característica que también ha sido observada en la unión neuromuscular. De hecho, datos previos en cultivos de miotubos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que Fzd9 altera la organización del aparato postsináptico. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este efecto se desconocen.

En esta tesis, mediante ensayos de electroporación *in vivo*, inmunohistoquímica, aproximaciones bioquímicas, microscopía confocal, microscopía de súper resolución, así como de pulso y caza de subpoblaciones de AChRs *in vivo* e *in vitro*, utilizando tanto ratones *wild-type* como transgénicos sometidos a denervación crónica o parcial, se evaluó la estabilidad y dinámica de los AChRs dentro de los dominios postsinápticos denervados. Nuestros resultados indican que previo al colapso morfológico inducido por la denervación, los AChRs disminuyen su estabilidad, donde su recambio en la placa motora ocurre de manera diferencial. Mas aún, la recuperación en la estabilidad de los AChRs pudo ser restituida por la reinervación del aparato postsináptico. Sin embargo, esta recuperación en la estabilidad de los AChRs fue precedida por un cambio morfológico de los agregados del AChR desde una estructura tipo pretzel a una fragmentada, los que fueron inervados por más de un axón motor.

Por otra parte, se analizó la dinámica de los AChRs localizados intracelularmente. Nuestros hallazgos elucidaron que la subpoblación de AChRs intracelulares exhiben un patrón de distribución en forma de anillos en etapas tempranas post-denervación, donde se observó que la distribución en forma de anillos no se relacionó a los mionúcleos o a las células satélite que residen en la vecindad de la unión neuromuscular, sino que se relacionaron directamente con estructuras lisosomales, sugiriendo que son AChRs en vías de degradación. Este cambio en la distribución de los AChRs intracelulares podría ser utilizado como un posible marcador temprano que facilite la identificación de uniones neuromusculares en vías de degeneración. como una potencial intervención farmacológica en el mantenimiento del dominio postsináptico.

Además, se determinó que Fzd9 se localiza en los dominios postsinápticos y es requerido para el mantenimiento de la estabilidad de los AChRs. De manera interesante, se observó que Fzd9 está acoplado basalmente a la subunidad $G\alpha_o$, lo que constituye la primera evidencia de un posible rol de Fzd9 como un receptor acoplado a proteína G (GPCR).

Finalmente, se evaluó el rol de litio sobre la estabilidad de los AChRs tanto en sinapsis inervadas como denervadas. Se observó que, por una parte, litio estabiliza a los AChRs en sinapsis inervadas mediante la inhibición en la internalización de los AChRs que pre-existen en la superficie, mientras que en sinapsis denervadas, litio indujo una reducción en la estabilidad los AChRs concomitante a un incremento en la disponibilidad de estos receptores en la superficie de la fibra muscular. En cuanto a los mecanismos celulares, se observó que la denervación generó la pérdida en la localización postsináptica de β -catenina, donde interesantemente, el tratamiento con litio retuvo esta localización sináptica de β -catenina sobre la placa motora denervada, sin alterar sus niveles.

En conjunto, la ejecución de este trabajo permite comprender la participación de componentes de la vía Wnt en la unión neuromuscular madura, y además, constituye un aporte en el marco de potenciales estrategias para la regeneración de esta sinapsis después de situaciones patológicas.

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is the synaptic connection between the motor neuron and the skeletal muscle fiber. Dysfunctions in the NMJ are manifested by pathologies associated with the locomotor system or by traumatic injury to the spinal cord and/or peripheral nerves. Importantly, the events of formation, maturation and stabilization of the NMJ are regulated by different molecules and signaling pathways. In this context, cumulative evidence has related the expression of intracellular ligands and effectors of the Wnt pathway to the neuromuscular synapse. Although little is known about the possible involvement of Frizzled (Fzd) receptors, it has been described that Fzd9 regulates synaptic connectivity in the central nervous system and localizes at the postsynapse, distribution that also has been observed at the NMJ. Indeed, previous data from our laboratory obtained in myotubes cultures suggest that Fzd9 alters the organization of the postsynaptic apparatuses. However, the mechanisms underlying this effect are unknown.

In this thesis, by approaches including *in vivo* electroporation, immunohistochemistry, biochemical assays, confocal microscopy, super-resolution microscopy, as well as *in vivo* and *in vitro* pulse and chase of AChRs subpopulations, using both wild-type and transgenic mice subjected to chronic or partial denervation, we evaluated the stability and dynamics of AChRs within the denervated postsynaptic domains. Our results indicate that decreased AChRs stability precedes denervation-induced morphological collapse, where AChRs turnover in the endplate showed differential distribution. In addition, the restoration of AChRs stability was restored upon reinnervation of the postsynaptic apparatus. However, re-establishment of AChR stability was preceded by the transition from pretzel-like to fragmented postsynaptic structures, which were contacted by more than one regenerating axons.

On the other hand, the dynamics of intracellular AChRs were also analyzed. Our findings revealed that the subpopulation of intracellular AChRs exhibit a ring-shaped distribution early upon

denervation. Interestingly, it was observed that these AChRs ring-like structures were not related to myonuclei or satellite cells residing in the vicinity of the neuromuscular junction, but were directly related to lysosomal structures, suggesting that the ring-like structures are AChRs trafficking through degradation compartments. The redistribution of intracellular AChRs could be employed as an early hallmark for early identification of degenerating NMJs.

Also, it was determined that Fzd9 localizes to the postsynaptic domains and is required for the maintenance of AChRs stability. Interestingly, Fzd9 was found to be coupled to the $G\alpha_o$ subunit under basal conditions, providing the first evidence for a possible role of Fzd9 as a G protein-coupled receptor (GPCR) at the NMJ.

Finally, as a potential pharmacological intervention for the maintenance of the postsynaptic domain, the role of lithium on the stability of AChRs at both innervated and denervated synapses was evaluated. It was observed that at innervated synapses, lithium stabilized AChRs by inhibiting the internalization of pre-existing surface AChRs, whereas at denervated synapses, lithium induced a decrease in AChR stability concomitant with an increase in receptors availability on the muscle fiber surface. Regarding cellular mechanisms for the effect of lithium, we observed that denervation resulted in the loss of the postsynaptic localization of β -catenin. Strikingly, lithium-treated muscle fibers retain β -catenin staining in specific foci of the denervated endplate, without altering β -catenin levels.

Altogether, this work provides novel insights into the role of members of the Wnt pathway in the mature NMJ and contributes to potential strategies for the regeneration of this synapse after detrimental and pathological conditions.

I. INTRODUCCIÓN

1. La sinapsis neuromuscular.

Las funciones fundamentales de un organismo tales como la postura corporal, la respiración o la amplia gama de posibles desplazamientos dependen de la correcta comunicación entre la neurona motora y el músculo, interfaz conocida como sinapsis neuromuscular. Esta sinapsis, llamada también unión neuromuscular, se ubica en el sistema nervioso periférico y al igual que las sinapsis centrales, es tripartita. En el dominio presináptico, el terminal axónico proveniente de la neurona motora está en exacta aposición con la especialización postsináptica del músculo esquelético, los cuales son cubiertos por células de Schwann perisinápticas, también conocidas como células de Schwann terminales (Figura 1A) (Li et al., 2018; Sanes and Lichtman, 2001).

La descripción general del funcionamiento de la unión neuromuscular de vertebrados establece que una vez propagado el potencial de acción a través del axón motor, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado por el terminal axónico, uniéndose y activando a los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChRs) localizados en regiones específicas del dominio postsináptico, cuya apertura modulará la actividad contráctil de la fibra muscular (Figura 1B). Algunas características peculiares de la unión neuromuscular han facilitado diversas ventajas experimentales con respecto a la sinapsis del sistema nervioso central. Dentro de ellas, destaca ser más simple en su estructura y manipulación, tener un mayor tamaño y por consiguiente, una mayor accesibilidad para su análisis. Lo anterior la ha posicionado históricamente como un modelo primordial de los estudios que revelaron y describieron los principios de transmisión, fisiología y estructura sináptica (Burden, 1977; Fatt and Katz, 1952; Jan and Jan, 1976; Katz, 1958; Redfern, 1970). Cabe destacar, que si bien en vertebrados esta sinapsis es colinérgica, otros tipos de neurotransmisores se han descrito en uniones neuromusculares de especies invertebradas tales como glutamato en *Drosophila melanogaster* o ácido γ -amino butírico (GABA) en *Caenorhabditis elegans* para inhibir sus músculos

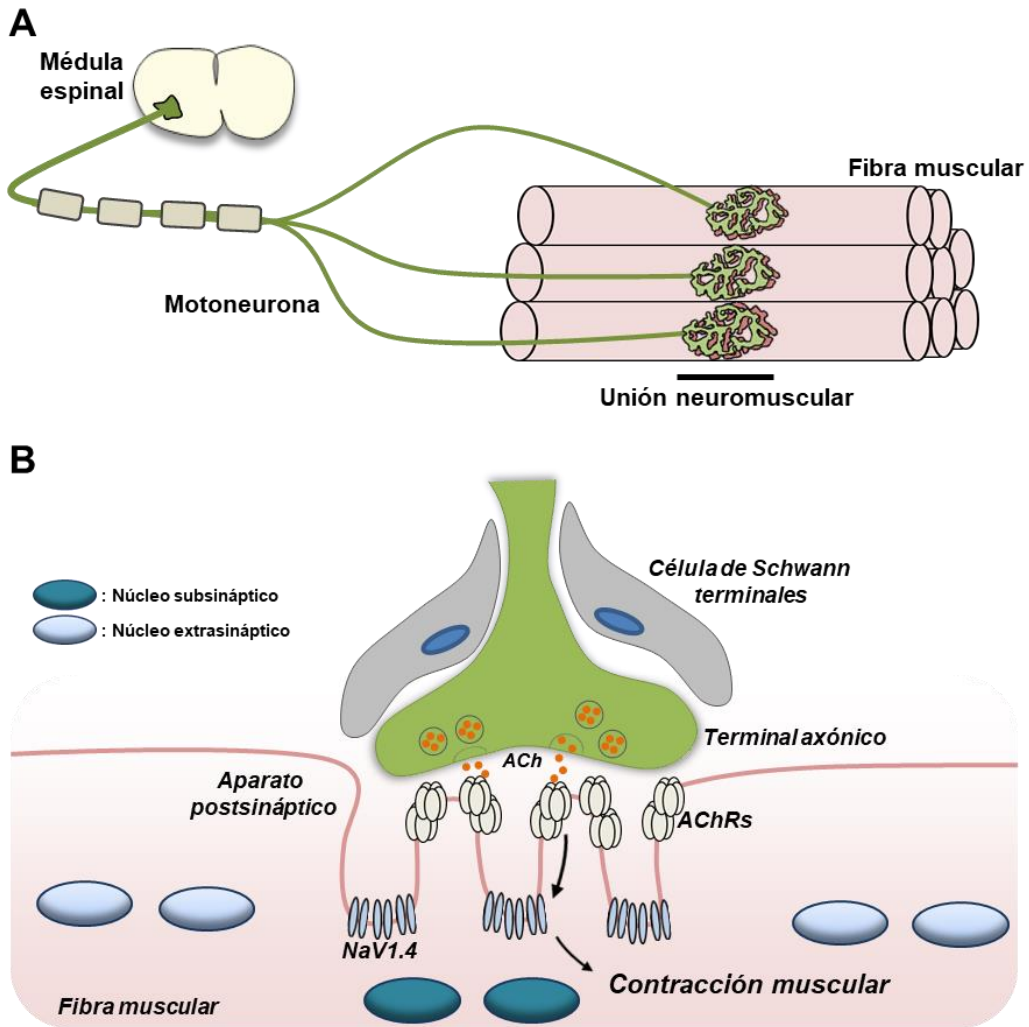


Figura 1: La unión neuromuscular de vertebrados.

(A) La unión neuromuscular es el sitio de interacción entre una neurona motora y la especialización postsináptica de la fibra muscular, la que regula la contracción muscular. El soma de la neurona motora proviene del asta ventral de la médula espinal, cuyo axón se encuentra mielinizado por las células de Schwann para mejorar el impulso nervioso, hasta ramificar e inervar a sus fibras musculares blanco (denominado unidad motora). En etapas adultas, los dominios postsinápticos en roedores están compuestos por agregados del receptor de acetilcolina (AChRs) con una morfología tipo pretzel. (B) Se representa el detalle de los componentes de la unión neuromuscular y su función. Brevemente, el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado desde las zonas activas del terminal axónico, difunde por la hendidura sináptica y se une a los AChRs, activándolos. Los AChRs promoverán la despolarización de la membrana de la fibra muscular (sarcolema), lo que activará a los canales de sodio NaV1.4, lo que resultará en la contracción de muscular.

contralaterales, respectivamente (Jan and Jan, 1976; McIntire et al., 1993). Así, la caracterización de esta sinapsis también ha servido como base para estudios de las sinapsis del sistema nervioso central, sustentando la versatilidad del uso de la unión neuromuscular como modelo para entender y caracterizar el funcionamiento de los distintos tipos de sinapsis.

Existen distintos factores que afectan negativamente la comunicación entre la neurona motora y el músculo, tales como patologías del sistema locomotor (esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, etc) como también miastenias, distrofias musculares y lesiones traumáticas generadas en la médula espinal o en los nervios periféricos. Dichos eventos resultan en la disrupción de esta sinapsis, generando la denervación de los aparatos postsinápticos del músculo esquelético (Arbour et al., 2017; Drachman et al., 1980; Hoke, 2006; Ma et al., 2011; Pratt et al., 2015; Rudolf et al., 2014; van der Pijl et al., 2016; Xu and Salpeter, 1997). De manera interesante, a diferencia de las sinapsis centrales, la unión neuromuscular presenta una alta capacidad regenerativa (Huebner and Strittmatter, 2009), donde distintos efectores celulares y moleculares han sido candidatos a exhibir un rol regenerativo (Barik et al., 2014a; Cantor et al., 2018; Eguchi et al., 2016; Martinez-Martinez et al., 2009). Sin embargo, la mayoría de los modelos de regeneración neuromuscular solo acontecen exitosamente en algunos animales de experimentación como roedores, peces o anfibios, no así en humanos (Faroni et al., 2015; Hoke, 2006). La carencia de regeneración en humanos se debe principalmente al mayor tamaño del organismo humano, lo que determina que la distancia y el tiempo empleados para reestablecer el contacto entre la neurona motora y el músculo son mayores (Buchthal and Kuhl, 1979; Sakuma et al., 2016), escenario que ha impedido ejecutar intervenciones clínicas exitosas en situaciones donde esta sinapsis está negativamente comprometida (Badawi and Nishimune, 2020). De esta forma, entender los componentes celulares y moleculares que participan en las etapas de formación, estabilidad y homeostasis de la unión neuromuscular madura resulta clave para promover eventuales intervenciones a nivel clínico, farmacológico o biomédico ante las distintas condiciones de daño en esta sinapsis.

2. Sinaptogénesis de la unión neuromuscular de vertebrados.

El establecimiento y la correcta función de la sinapsis neuromuscular requieren de la orquestación de distintos eventos y señales moleculares que residen en sus componentes pre, post y peri-sinápticos, cuya caracterización ha sido detallada en especies de roedores. Inicialmente, los axones motores se proyectan desde la región ventral del tubo neural a través de los nervios periféricos hasta inervar a sus fibras musculares “blanco” en una región central (Figura 2A) (Kim and Burden, 2008; Li et al., 2018; Sanes and Lichtman, 1999). La ramificación intramuscular del axón motor genera el contacto con decenas hasta cientos de fibras musculares, conjunto definido como unidad motora (Kim and Burden, 2008; Li et al., 2018; Sanes and Lichtman, 1999). Una vez que ocurre el contacto entre el axón motor y la fibra muscular, se gatillan distintos cambios morfológicos y moleculares asociados a las especializaciones pre- y postsináptica. En el componente presináptico, se observa la diferenciación del cono de crecimiento hacia un terminal motor, el cual acumula vesículas conteniendo ACh y otros componentes que son liberados desde sus zonas activas, definidos como los dominios del axón que contienen una alta cantidad tanto de vesículas sinápticas como de proteínas de membrana que permiten una liberación eficiente del neurotransmisor (Misgeld et al., 2005; Sanes and Lichtman, 2001; Tintignac et al., 2015) (Figura 2B). Por otra parte, la diferenciación postsináptica se caracteriza por un incremento en la expresión de genes de proteínas sinápticas exclusivamente en los micronúcleos ubicados de forma adyacente al terminal motor, llamados núcleos subsinápticos (Belotti and Schaeffer, 2020; Grady et al., 2005; Mejat et al., 2003) (Figura 2B). De esta forma, los núcleos subsinápticos generarán un incremento localizado en los transcritos y proteínas que participan del desarrollo postsináptico de la unión neuromuscular.

Además del incremento transcripcional restringido al dominio sináptico, la diferenciación de la postsinapsis se caracteriza por la agregación de los AChRs y de otras proteínas en la región sináptica de la fibra muscular (Burden et al., 2013), la cual se caracteriza por ocupar no más del 0,1% de toda la superficie de la fibra (Burden et al., 2018). Así, los AChRs que se encuentran distribuidos

de manera difusa en la membrana incrementan su densidad desde $\sim 1.000/\mu\text{m}^2$ hasta valores superiores a $10.000/\mu\text{m}^2$, mientras que en regiones extrasinápticas esta magnitud desciende a $\sim 10/\mu\text{m}^2$ (Hartzell and Fambrough, 1973; Heuser and Salpeter, 1979; Marques et al., 2000). En este contexto, los agregados del AChR sufren una reestructuración morfológica durante la etapa de maduración postsináptica, donde transitan desde una distribución homogénea con morfolología ovalada tipo *placa*, hacia estructuras que revelan regiones carentes de AChRs. Lo anterior genera la formación de ramificaciones en el aparato postsináptico, resultando en estructuras postsinápticas maduras muy ramificadas con una morfolología tipo *pretzel* (Marques et al., 2000; Slater, 1982; Steinbach, 1981) (Figura 2C). Junto a estos cambios morfológicos, los pentámeros del AChR exhiben una transición en su composición molecular a medida que transcurre el desarrollo, observándose en etapas embrionarias una composición $\alpha_2\beta\gamma\delta$, cuya subunidad γ es reemplazada por una subunidad ϵ durante las dos primeras semanas postnatales en roedores, generándose el pentámero $\alpha_2\beta\epsilon\delta$ (Gu and Hall, 1988). Este cambio en el pentámero del AChR modifica tanto la estabilidad (detallado más abajo) como las propiedades cinéticas y de conductividad del AChR (Gu and Hall, 1988; Mishina et al., 1986). Finalmente, conforme transcurre el desarrollo, la fibra muscular incrementa su tamaño y con ello el aparato postsináptico se expande, formando así una estructura sináptica altamente definida, que permite una neurotransmisión eficaz y controlada (Balice-Gordon et al., 1990; Balice-Gordon and Lichtman, 1990).

Junto a la redistribución de los agregados de AChR, a nivel ultraestructural también se generan cambios topológicos drásticos en la región sináptica de la membrana muscular, donde invaginaciones y pliegues orientados ortogonalmente al eje longitudinal de la fibra muscular darán forma a los pliegues de unión primarios y secundarios. Mientras los pliegues primarios corresponden al espacio sináptico entre la motoneurona y la fibra muscular, los pliegues secundarios corresponden a invaginaciones de la membrana de la fibra muscular en la región de contacto con el axón motor que se extienden hacia el sarcoplasma, incrementando el área postsináptica de 2 a 8 veces (Slater, 2017).

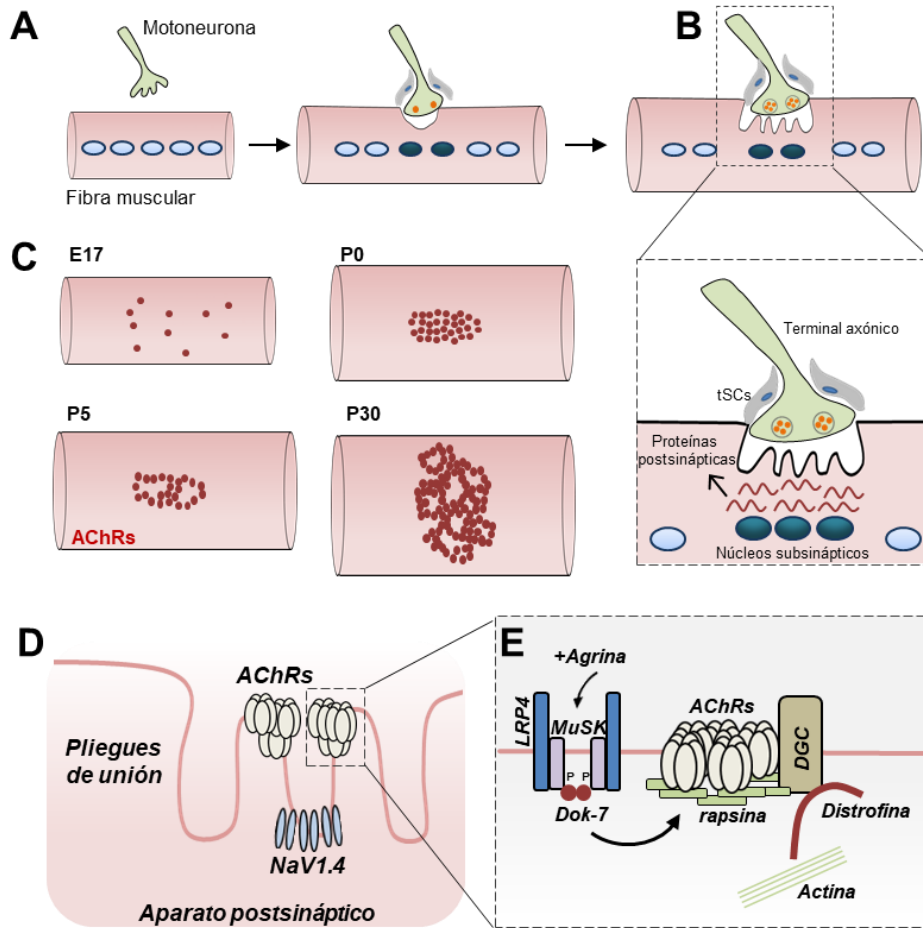


Figura 2: Establecimiento de la unión neuromuscular madura.

(A) Una vez inervada la fibra muscular, el cono de crecimiento de la motoneurona se especializa a un terminal axónico, el cual acumula ACh y factores como agrina. (B) La diferenciación postsináptica se caracteriza por la actividad transcripcional de los núcleos subsinápticos, incrementando proteínas esenciales en la postsinapsis. (C) Los AChRs que inicialmente se encuentran difusos en el sarcolema (E17) se concentran y forman una estructura tipo placa (P0), la que durante las etapas de maduración (P5), transitará a una estructura madura tipo pretzel (P30). (D) El sarcolema cambia su topología formándose los pliegues de unión, donde los AChRs se localizarán en los extremos de las crestas y los canales NaV1.4 se ubicarán en los bolsillos de los pliegues. (E) La vía Agrina/LRP4/MuSK está implicada en la formación y mantenimiento de los agregados del AChRs en el dominio postsináptico. Agrina liberado por el terminal axónico se une a LRP4 y MuSK, el cual a través de Dok-7 se fosforila y activa, promoviendo la agregación de los AChRs mediante la proteína de andamiaje rapsina. Rapsina además se une al complejo de Distrofina-Glicoproteína (DGC), el que a su vez media la unión a los filamentos de actina.

En estos pliegues secundarios, los AChRs y otros componentes postsinápticos se agregarán en directa aposición a las zonas activas del terminal presináptico. Al contrario, los canales de sodio Nav1.4 se localizarán en el fondo de los pliegues de unión, lo que favorecerá la generación del potencial de acción para la subsecuente contracción muscular (Caldwell, 2000; Shi et al., 2012; Steinbach, 1981) (Figura 2C)

3. Bases moleculares en el establecimiento de la unión neuromuscular.

Durante la formación de la unión neuromuscular, distintas moléculas provenientes tanto del terminal axónico como de la fibra muscular son requeridas para la inducción y ensamblaje funcional de esta sinapsis. Así, se han descrito principalmente dos factores que son secretados por el terminal presináptico. Por un lado, neuregulina-1 (NRG-1), proteína que regula la actividad transcripcional de la subunidad ϵ y δ de los AChRs, específicamente en los núcleos subsinápticos (Fischbach and Rosen, 1997). Por otra parte, agrina, un proteoglicán de heparán sulfato, presenta una alta capacidad de inducir la agregación de los AChRs como también de otros componentes postsinápticos a través de la vía Agrina/LRP-4/MuSK (Bowen et al., 1998; Misgeld et al., 2005). Dentro de los componentes de esta vía destacan proteínas de señalización y andamiaje, tales como la quinasa específica del músculo (**MuSK**), la proteína relacionada al receptor de lipoproteína-4 (**LRP-4**) y **rapsina**, entre otras (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1995; Kim et al., 2008; Lin et al., 2001; Noakes et al., 1993; Zhang et al., 2008). Agrina liberada desde el terminal motor hacia la lámina basal sináptica interactúa con LRP-4 y forma un complejo ternario con el receptor MuSK (Figura 2E), activándolo vía fosforilación (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). MuSK activo desencadena río abajo el reclutamiento y agregación de los AChRs hacia los dominios postsinápticos. Se ha descrito que la proteína intracelular rapsina actúa como andamiaje de los agregados del AChR, asociándolos a la maquinaria estructural de la postsinapsis, la que incluye al complejo de distrofina-glucoproteína (DGC), filamentos intermedios y filamentos de actina (Chen et al., 2016; Lee et al., 2009;

Mihailovska et al., 2014) (Figura 2E). Además, nueva evidencia ha determinado que rapsina también presenta una propiedad enzimática de E3-ligasa, cuya actividad es requerida para la nedilación y ubiquitinación de los AChRs, promoviendo así su agregación y participando de la formación de la unión neuromuscular (Li et al., 2016). A su vez, distintas proteínas adaptadoras son requeridas intracelularmente para la fosforilación y activación eficiente de MuSK, tales como Dok-7 (Okada et al., 2006) y Tid-1 (Linnoila et al., 2008), las que se unen directamente al dominio intracelular de MuSK, o bien las proteínas Crk/CrkL (Hallock et al., 2010), que se unen y activan directamente a Dok-7.

Es relevante destacar que si bien durante el último tiempo se han descrito participantes moleculares con un rol modulador en los efectores nombrados anteriormente (implicando proteínas quinasas, fosfatasas, ubiquitin-ligasas, entre otras) (Li et al., 2018; Tintignac et al., 2015), existe un conjunto de proteínas que ha sido definido como imprescindibles en el establecimiento y posterior mantenimiento de la unión neuromuscular. Este conjunto de proteínas involucra algunas presinápticas, como agrina, y otras postsinápticas, como LRP-4, MuSK, rapsina y Dok-7 (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1995; Lin et al., 2001; Okada et al., 2006; Sanes and Lichtman, 2001). La necesidad de estas proteínas queda de manifiesto a partir de dos fenómenos observados en animales deficientes de estas moléculas durante las etapas iniciales de la sinaptogénesis neuromuscular: *i*) respecto a las proteínas presinápticas, aun cuando distintos factores liberados por la motoneurona inducen la diferenciación postsináptica, los análisis realizados en etapas previas a la llegada del axón motor, o incluso en animales que carecen de neuronas motoras (Lin et al., 2008), o que son deficientes del factor presináptico agrina (Lin et al., 2001), revelan que las fibras musculares *per se* son capaces de ensamblar un aparato postsináptico estereotipado, detectándose la agregación de los AChRs (evento definido como el *pre-patrón* de los agregados de AChR) (Lin et al., 2001). No obstante, en etapas posteriores del desarrollo, estos mutantes pierden la capacidad de estabilizar su aparato postsináptico, lo que resulta en el desensamble de las sinapsis neuromusculares. Esto indica que

previo a la llegada del axón, es decir en una situación aneural, si bien existen en el territorio muscular señales para la agregación, organización y estructuración de los AChRs hacia la postsinapsis, el terminal axónico y sus factores son requeridos para la estabilización de la unión neuromuscular. *ii*) Por la parte postsináptica, al analizar en estos mismos periodos de tiempo a animales deficientes de las proteínas musculares LRP-4, MuSK, rapsina o Dok-7, se observa que no existe diferenciación postsináptica, así como ningún signo de sinaptogénesis neuromuscular (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1995; Lin et al., 2001; Okada et al., 2006; Sanes and Lichtman, 2001; Weatherbee et al., 2006). Por lo tanto, el correcto establecimiento de la sinapsis neuromuscular dependerá de la coordinación entre las señales que provienen tanto del componente presináptico como de la maquinaria muscular que regula la organización del aparato postsináptico.

Respecto a los mecanismos moleculares involucrados en origen y estabilidad de la sinapsis neuromuscular, es interesante mencionar que, junto con secretar señales que promueven la agregación de los AChRs, el axón motor libera el neurotransmisor ACh, el que se ha descrito como un factor negativo en la agregación y estabilidad de los AChRs en sitios donde no actúa agrina. ACh induce la endocitosis y dispersión de los AChRs a través del remodelamiento del citoesqueleto mediado por la quinasa dependiente de ciclina-5 (CDK-5) y por calpaínas (Chen et al., 2007; Lin et al., 2005; Misgeld et al., 2005; St John and Gordon, 2001). A su vez, la despolarización del músculo gatillada por ACh disminuye la expresión de las distintas subunidades del AChR (Huang et al., 1994), resultando en una disminución en los niveles de AChRs en las regiones no sinápticas (Lin et al., 2005). Así, culminado el ensamblaje de la sinapsis neuromuscular, los AChRs se posicionan de manera específica y restringida debido a que existe una dinámica entre señales que, por una parte, promueven y consolidan a la maquinaria postsináptica en el dominio sináptico y, por otra, desestabilizan y regulan negativamente la abundancia de estos receptores en las regiones extrasinápticas.

4. Estabilidad de los AChRs en el dominio postsináptico.

La estabilidad de los AChRs es definida como la permanencia de un AChR en la superficie postsináptica previo a ser internalizado (Fumagalli et al., 1990; Martínez-Pena and Akaaboune, 2021). Esta variable se puede estudiar de dos formas: *i*) determinando el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los AChRs a través de la visualización de una misma sinapsis en el tiempo (Akaaboune et al., 1999), donde una pérdida en la estabilidad resultará en la disminución del $t_{1/2}$ o *ii*) evaluando el **recambio** entre la subpoblación de AChRs pre-existentes y los AChRs que se incorporan (nuevos) a la superficie postsináptica (Roder et al., 2010), donde una disminución en la estabilidad resultará en el incremento del recambio entre estas subpoblaciones (ver sección Resultados, Capítulo I). Los AChRs de la fibra muscular están compuestos por 5 subunidades, las que se ensamblan inicialmente en el retículo endoplásmico, experimentan modificaciones postraduccionales en el aparato de Golgi (Wanamaker et al., 2003) y son escoltadas por rapsina en su transporte al sarcolema (Marchand et al., 2002). Cabe destacar que este proceso es ineficiente para los AChRs, donde el ~30% de las subunidades alcanzan un ensamblaje correcto y el resto es degradado (Merlie and Lindstrom, 1983; Millar and Harkness, 2008), evidenciando que existe una alta regulación en la subpoblación de AChRs que alcanza la superficie muscular. Utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* se ha mostrado mediante aproximaciones de microscopía, bioquímicas y radioactivas, que los AChRs son altamente estables en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular, exhibiendo tiempos de vida media cercanos a 14 días (Akaaboune et al., 1999; Bruneau et al., 2005; Strack et al., 2015) previo a su internalización y subsecuente: *i*) degradación mediante el tráfico endo/lisosomal, o autofagolisosomal (Bruneau et al., 2005; Khan et al., 2014; Kumari et al., 2008; Wild et al., 2016) o *ii*) reciclaje de vuelta a la membrana. El tráfico de internalización y degradación de los AChRs inicia con la endocitosis dependiente de Rac, pero independiente de clatrina, caveolina o dinamina, donde los receptores son transportados a través de endosomas tempranos y tardíos, siendo finalmente degradados en lisosomas (Kumari et al., 2008). Un efector intracelular descrito en esta etapa inicial es CDK-5, cuya actividad

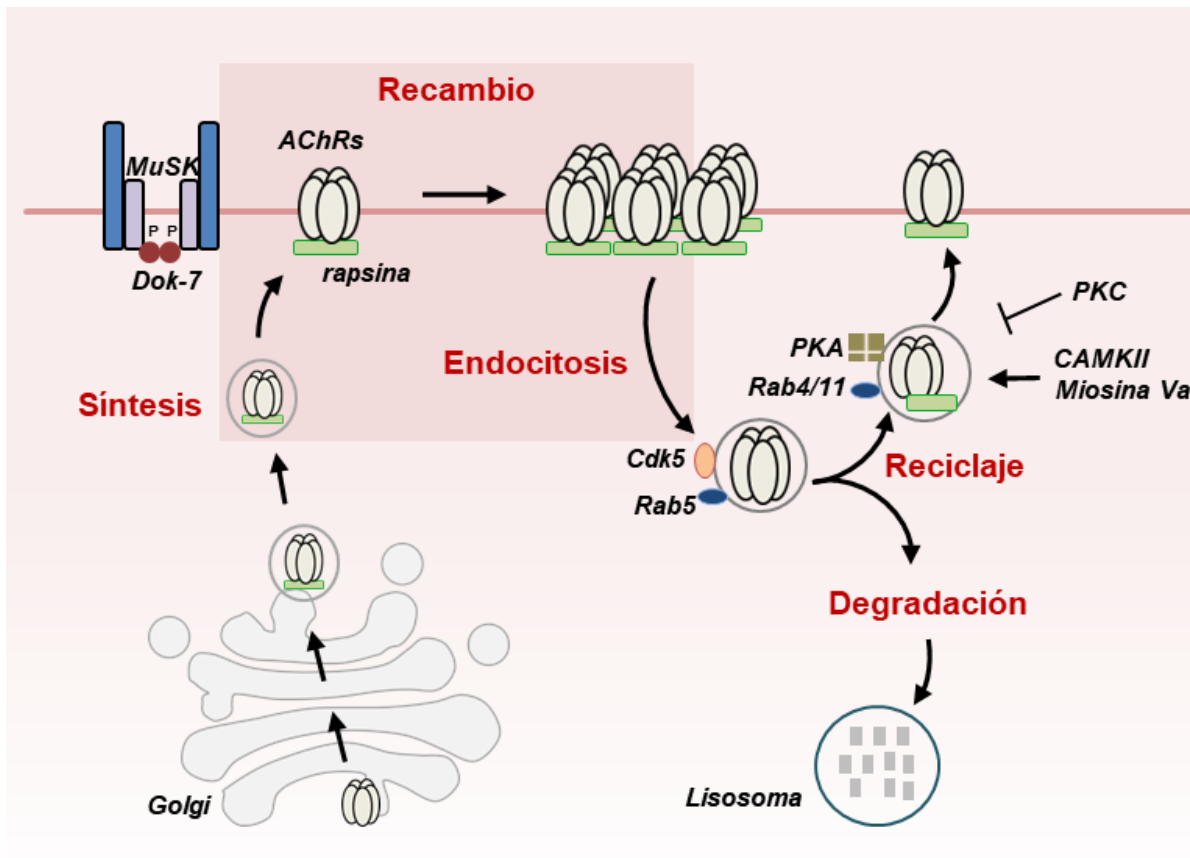


Figura 3: Tráfico de los AChRs en la sinapsis neuromuscular madura.

Los AChRs sintetizados son escoltados por rapsina en su exocitosis hacia el sarcolema, donde se agregarán por la señalización dependiente de MuSK. Una vez en la membrana, los AChRs presentan básicamente un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 14 días antes de ser internalizados por endocitosis mediada por Rac y pueden ser subsecuentemente: *i*) degradados por la ruta lisosomal, o *ii*) reciclados de vuelta a la membrana postsináptica. Cabe destacar que eventos que alteran la estabilidad de la unión neuromuscular reducen el $t_{1/2}$ de los AChRs a 1~2 días, favoreciéndose la vía de degradación lisosomal. Distintas moléculas favorecen el reciclaje de los AChRs, como PKA, CAMKII o Miosina Va, mientras que PKC ejerce un efecto inhibitorio. Además, la subpoblación de AChRs pre-existentes en la membrana postsináptica se encuentra constantemente en recambio con las subpoblaciones de AChRs que se sintetizan, denominados AChRs nuevos (recuadro oscurecido). La combinación de estos eventos es requerida para el mantenimiento de una alta densidad de AChRs en la postsinapsis.

es dependiente del neurotransmisor ACh durante la dispersión y reducción en los niveles de AChRs de las regiones extrasinápticas (Lin et al., 2005; Misgeld et al., 2005; Wu et al., 2010). A su vez, el seguimiento *in vivo* de AChRs internalizados muestra un patrón tipo *puncta*, los que poseen una co-localización preferencial con el marcador de endocitosis Rab-5, pero no con el marcador de autofagia MAP1LC3B (Wild et al., 2016). Se ha descrito que la sobreexpresión de Rab5-GFP induce un incremento en la cantidad de *puncta* que contienen AChRs internalizados, sugiriendo que los niveles de AChRs están regulados por rutas de tráfico endosomal. Por su parte, en el reciclaje de los AChRs hacia la membrana (Bruneau et al., 2005; Bruneau and Akaaboune, 2006), las proteínas involucradas se localizan en la microvecindad de la postsinapsis donde, por ejemplo, la proteína quinasa A (PKA), su dominio regulador RI-alfa (PKA-RI- α), miosina Va y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CaMKII) modulan positivamente el reciclaje de AChRs (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2010; Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013; Roder et al., 2010; Roder et al., 2009), mientras que la proteína quinasa C (PKC) actúa como antagonista de este proceso (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013) (Figura 3).

En complemento a estos eventos, un número de AChRs constante y funcional se logra mediante la incorporación de nuevos receptores que reemplazan a los receptores removidos desde la superficie, a través de un proceso conocido como recambio de AChRs (Fumagalli et al., 1990; Strack et al., 2015). En este contexto, distintos escenarios incluyendo el daño a los nervios periféricos, o a la médula espinal, como también eventos fisiopatológicos tales como miastenias, distrofias, atrofia muscular conllevan a la **denervación** y consecuente **pérdida en la estabilidad de los AChRs** de superficie (Rudolf et al., 2014; Tintignac et al., 2015). Ensayos de denervación mediada por daño a los nervios periféricos muestran la aparición de subpoblaciones de AChRs con vida media de incluso 1 día o menos, donde la alta tasa de degradación y la escasa inserción de AChRs (mediada por disminución del reciclaje o de la síntesis *de novo*) genera la pérdida de AChRs en el largo plazo (Akaaboune et al., 1999; Andreose et al., 1993; Frank et al., 1976; Levitt and Salpeter, 1981; Shyng

and Salpeter, 1989; Strack et al., 2015). Por lo tanto, las vías y efectores que participan tanto del ensamblaje de las subunidades del AChR, así como de su tráfico celular hacia y desde la membrana postsináptica, son un foco interesante para posibles intervenciones terapéuticas que permitan una transmisión sináptica correcta y eficiente (Li et al., 2018; Rudolf and Straka, 2019; Wanamaker et al., 2003).

Como conclusión de los antecedentes planteados, parte de la homeostasis de la unión neuromuscular recae en la regulación de los efectores involucrados en el ensamblaje del aparato postsináptico que alteran directamente el programa molecular de la fibra muscular. Por ejemplo, tratamientos de terapia génica utilizando virus adeno-asociados (AAV) que codifican para Dok-7 resultaron en la inhibición de la degeneración del terminal axónico y la atrofia muscular observada en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una patología neurodegenerativa que resulta en la muerte de las motoneuronas (Miyoshi et al., 2017). De forma similar, esta terapia logró incrementar la inervación, función motora y fuerza muscular en modelos de envejecimiento (Ueta et al., 2020). Por su parte, en animales modelo para miastenia congénita (a través de mutaciones en Dok-7) la letalidad y deterioros en la sinapsis neuromuscular fueron revertidos al utilizar un anticuerpo que activa a MuSK (Oury et al., 2021). Mediante este anticuerpo también fue posible retrasar la denervación, mejorar la función motora y disminuir la pérdida de motoneuronas al tratar ratones modelo de ELA en etapas sintomáticas tempranas de la enfermedad (Cantor et al., 2018). Similares resultados favorables se obtuvieron al sobreexpresar MuSK específicamente en músculos de ratones modelo de ELA, donde se observó tanto un retraso como una disminución en el grado de denervación de las fibras musculares (Perez-Garcia and Burden, 2012). Por lo tanto, estos datos demuestran que las vías que regulan la organización inicial de los AChRs también participan en su estabilidad una vez establecidas las uniones neuromusculares maduras (Henriquez et al., 2008; Miyoshi et al., 2017; Oury et al., 2021; Ueta et al., 2020), lo que abre la posibilidad de investigar a otros efectores involucrados en el desarrollo, función y degeneración de la sinapsis neuromuscular. A este respecto,

en esta tesis hemos considerado los resultados recientes de la literatura y de nuestro grupo que indican que efectores de distintas vías de señalización Wnt pueden ejercer funciones de preservar la sinapsis neuromuscular madura y tienen, por ende, un potencial como blancos terapéuticos en condiciones de deterioro de esta sinapsis.

5. Vías de señalización inducidas por Wnt.

El conjunto de señalizaciones y efectos gatillados por miembros de la familia de proteínas Wnt (por su abreviatura Wingless/Int-1) son un eje principal durante el desarrollo y función de los organismos, donde eventos como la formación del eje dorso-ventral, la proliferación, diferenciación y migración celular se encuentran directamente regulados por ligandos, receptores y co-receptores de esta vía (Steinhart and Angers, 2018). En vertebrados, la amplia variedad en el efecto y función de la vía Wnt se relaciona con que existen 19 ligandos, los cuales una vez secretados, señalizan río abajo a través de su unión al dominio rico en cisteína (CRD) de 1 de 10 posibles receptores Frizzled (Fzd1-10) (Ren et al., 2015; Willert and Nusse, 2012). Esto activará a la proteína de andamiaje citoplasmática Dishevelled (Dvl) y en este punto, dependiendo del contexto celular, se desencadenarán principalmente tres vías de señalización; *i*) una vía canónica Wnt/ β -catenina y dos vías no-canónicas *ii*) Wnt-PCP (polaridad celular en el plano) y *iii*) Wnt/ Ca^{2+} (Gordon and Nusse, 2006; He et al., 2004).

En ausencia de ligando Wnt, la proteína citosólica β -catenina es fosforilada en forma constitutiva a través de un complejo compuesto, entre otras proteínas, por GSK-3 β , Axina y APC (conocido como complejo de destrucción de β -catenina). La fosforilación de β -catenina media su ubiquitinación, lo que desencadena su degradación en el proteosoma (Willert and Nusse, 2012). En presencia de ligandos que gatillen la vía canónica Wnt/ β -catenina, la activación de Dvl genera la inhibición de la quinasa GSK-3 β , desacoplando el complejo de destrucción de β -catenina, lo que inhi-

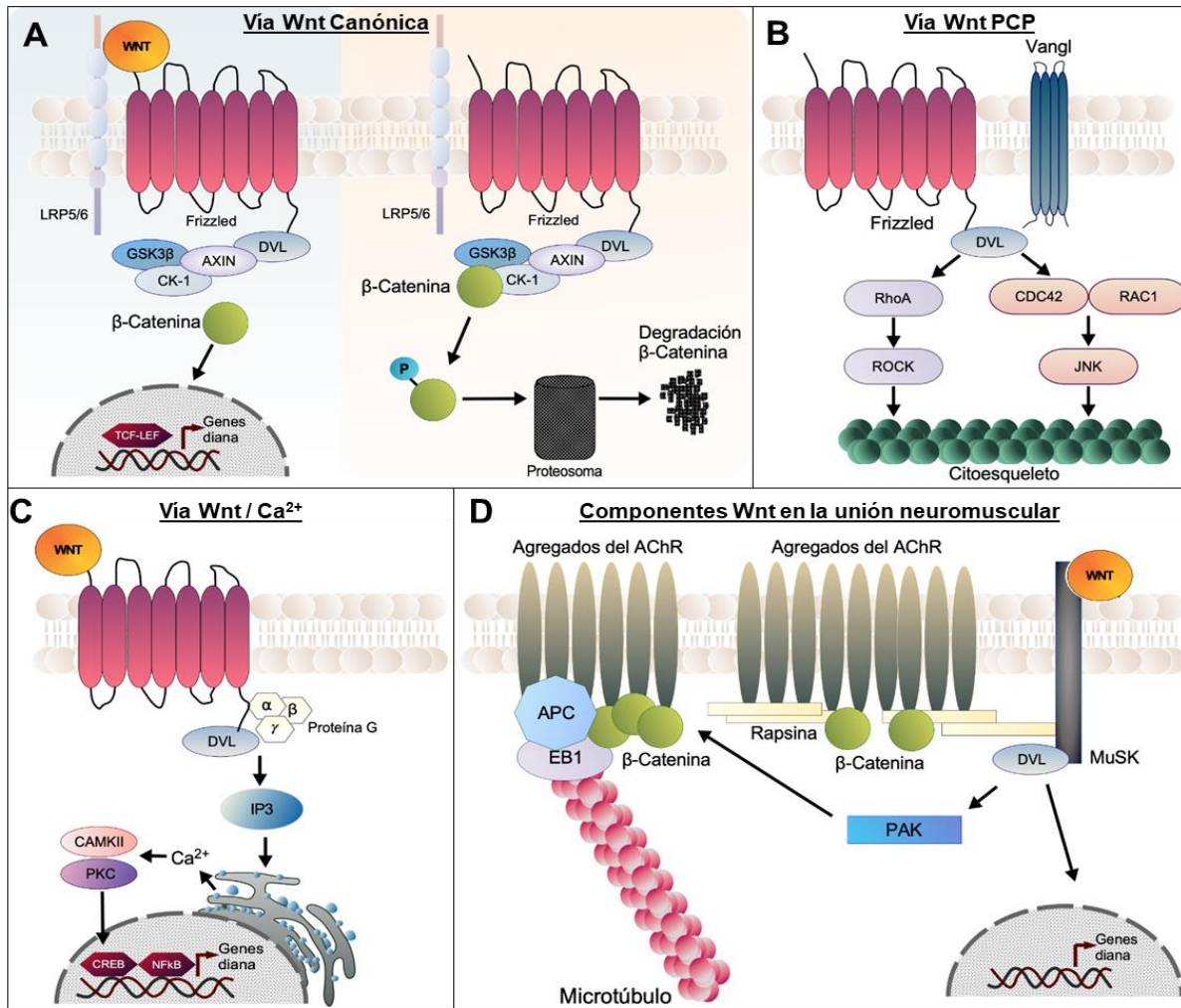


Figura 4: Vías de señalización inducidas por Wnt.

La unión de un ligando Wnt al receptor Frizzled activa a Dishevelled (Dvl), donde tres posibles vías se desencadenan. **(A)** En la vía Wnt canónica, GSK-3 β es inhibida, lo que evita la degradación constitutiva de β -catenina, la que transloca al núcleo y se une al factor de transcripción TCF/Lef1, activando genes blanco de la vía. **(B)** La vía PCP actúa de forma local modificando componentes del citoesqueleto a través de las GTPasas pequeñas Rac y Rho. **(C)** La vía Wnt/Ca²⁺ regula el compromiso y migración celular mediante el incremento de Ca²⁺ intracelular, lo que activa a las proteínas dependiente de calcio CAMKII o PKC, entre otros. **(D)** En la sinapsis neuromuscular, existe un entrecruzamiento entre la vía Wnt y Agrina/LRP-4/MuSK. Rapsina interactúa con β -catenina, mientras que MuSK se une a Dvl o también presenta sitios de unión a ligandos Wnt.

be la fosforilación de β -catenina y conlleva su estabilización, acumulación en el citoplasma y posterior translocación al núcleo, donde regulará la expresión de genes a través de su asociación con los factores de transcripción TCF/Lef1 (Gordon and Nusse, 2006; Steinhart and Angers, 2018) (Figura 4A). Por su parte, la vía Wnt/PCP comanda procesos de polaridad celular planar y de tejidos, esencialmente mediante la activación de GTPasas pequeñas tales como RhoA, Rac1 o de la quinasa c-Jun amino-terminal (JNK), las que desencadenan el rearrreglo del citoesqueleto de actina y microtúbulos (McEwen and Peifer, 2000) (Figura 4B). Por último, la vía Wnt/ Ca^{2+} modula el compromiso y migración celular a través del incremento intracelular de Ca^{2+} , lo que activará a las quinasas PKC y CAMKII, entre otros efectores, regulando la transcripción de genes o la polimerización de actina (Figura 4C) (Kuhl et al., 2000). Además de regular distintos procesos del desarrollo embrionario, la vía Wnt está involucrada en la función y homeostasis del sistema nervioso, participando en procesos de diferenciación neuronal, guía axonal y en el establecimiento de sinapsis (Krylova et al., 2002; Lucas and Salinas, 1997; Salinas, 1999; Salinas and Zou, 2008). De manera importante, su rol no solo ha sido elucidado en sinapsis del sistema nervioso central, sino que también su participación se ha descrito en sinapsis del sistema nervioso periférico, como la unión neuromuscular.

6. Rol de la vía Wnt en la sinapsis neuromuscular.

Diversas aproximaciones han revelado que la vía Wnt exhibe una función tanto pro- como anti-sinaptogénica en la unión neuromuscular (Henriquez and Salinas, 2012; Koles and Budnik, 2012). En este contexto, se ha observado que distintos ligandos Wnt regulan el ensamblaje de especializaciones postsinápticas ya sea en cultivos de células musculares, en etapas tempranas (pre-patrón de los AChRs) de la formación de la unión neuromuscular o en sinapsis maduras. Por ejemplo, en *D. rerio* (pez cebra), el ligando Wnt1 1r, secretado por células mesenquimales, induce la agregación aneural del pre-patrón de AChRs (Jing et al., 2009). A su vez, el bloqueo de la secreción presináptica

de ligandos Wnts en el desarrollo embrionario resulta en uniones neuromusculares inestables y con diferenciación postsináptica reducida, así como en debilidad muscular (Shen et al., 2018) (Figura 4D).

De forma interesante, ha surgido evidencia que sustenta una comunicación cruzada entre la vía Wnt y la vía agrina/LRP-4/MuSK, sugiriendo una participación directa de la vía Wnt en la organización y estructuración de los AChRs en la fibra muscular. Por ejemplo, Wnt11r se une a MuSK específicamente en su dominio CRD (Jing et al., 2009), cuya secuencia comparte homología con el dominio CRD de los receptores Fzd. De hecho, la delección del dominio CRD específicamente en MuSK reduce el número de agregados de AChRs (Messeant et al., 2015). Por su parte, el regulador intracelular de la vía Wnt, Dvl, se une directamente a MuSK y actúa como intermediario con reguladores del citoesqueleto, como la quinasa activada por p21 (PAK) para controlar la distribución de los AChRs mediante vías no-canónicas dependientes de Rac (Luo et al., 2002). Otro componente de la vía Wnt, Poliposis Adenomatosa Coli (APC), el cual es un regulador directo de β -catenina (Aoki and Taketo, 2007), se une y co-localiza con los AChRs en la unión neuromuscular. Además, la interacción entre APC y los AChRs es requerida para la diferenciación postsináptica inducida por agrina en miotubos (Wang et al., 2003). Así mismo, se ha observado que APC interactúa con microtúbulos, filamentos de actina y la proteína de unión a microtúbulos EB1 (Moseley et al., 2007; Reilein and Nelson, 2005), lo que sugiere que APC regula la diferenciación postsináptica a través de una señalización local dependiente de la dinámica de componentes del citoesqueleto (Figura 4D). Por otro lado, β -catenina interactúa con la proteína de andamiaje rapsina (Zhang et al., 2007), generándose un complejo que incluye a los AChRs (Zhang et al., 2007) (Figura 4D). De manera destacable, la delección o ganancia de función *in vivo* de β -catenina específicamente en el músculo, pero no en la motoneurona, altera la distribución de los AChRs (Li et al., 2008; Liu et al., 2012), sugiriendo que distintos efectores de la vía Wnt ejercen su función sobre el dominio postsináptico de la unión neuromuscular.

Respecto a ligandos específicos de la vía, se ha descrito que Wnt3, que es expresado por la neurona motora al momento de inervar las fibras musculares (Krylova et al., 2002), incrementa la agregación de AChRs *in vivo* e induce la formación de micro-agregados de AChR en cultivos de células musculares, los cuales en presencia de agrina se estabilizan e incrementan su número y tamaño (Henriquez et al., 2008). El efecto de la vía Wnt en la distribución de AChRs también fue observado al implantar células que expresan Sfrp1 (proteína secretada relacionada al receptor Fzd tipo 1) en músculos de embriones de pollo, antagonista endógeno que se une a los ligandos Wnt a través de su dominio CRD, donde se observó una disminución significativa en la agregación de AChRs *in vivo* (Henriquez et al., 2008). De manera interesante, ensayos en cultivos de miotubos mostraron que, a diferencia de Sfrp1, el antagonista endógeno de la vía Wnt canónica Dickkopf-1 (Dkk1) no presenta un efecto antagónico sobre la agregación de AChRs estimulada por Wnt3, evidenciando que Wnt3 actúa por una vía distinta a la vía Wnt/ β -catenina (Henriquez et al., 2008). De hecho, se demostró que el efecto de Wnt3 sobre la organización postsináptica depende de la activación de Rac1 (Henriquez et al., 2008). Por otra parte, Wnt3a, ligando que presenta un 85% de similitud de secuencia con Wnt3 y es secretado por la fibra muscular en estadios embrionarios, inhibe la agregación de AChRs inducida por agrina (Wang et al., 2008). Este efecto fue mediado por la disminución de los niveles de rapsina y en este caso, fue prevenido por Dkk1, revelando que la vía Wnt canónica ejerce un efecto negativo sobre la agregación de los AChRs (Wang et al., 2008). Estos hallazgos confirman la existencia de una regulación variada en el ensamblaje postsináptico, donde ligandos relacionados a una misma familia de proteínas y con una alta homología gatillan río abajo mecanismos y efectos diferenciales sobre los AChRs. Al respecto, la sobreexpresión de Wnt4 en miotubos, o el tratamiento con los ligandos Wnt solubles Wnt9a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11 o Wnt16, incrementan el número de agregados de AChRs independiente de la presencia de agrina (Barik et al., 2014b; Strohlic et al., 2012; Zhang et al., 2012), mientras que Wnt7a, Wnt8a y Wnt10b inhiben la formación de agregados de AChR inducidos por agrina (Barik et al., 2014b).

Es relevante mencionar que, aun cuando se ha avanzado en conocer el rol de distintos ligandos Wnt sobre la organización de los AChRs, la identidad del o los receptores Frizzled que participan en el dominio postsináptico se desconoce. Si bien se ha descrito una posible transducción de la señalización Wnt mediante el receptor MuSK (Messeant et al., 2015; Zhang et al., 2012), la fibra muscular expresa los 10 tipos de receptores Frizzled (Aviles et al., 2014), de los cuales, solamente Frizzled-9 (Fzd9) ha sido implicado sobre la agregación y organización de los AChRs (Aviles et al., 2014).

7. El receptor de la vía Wnt, Frizzled-9, como receptor postsináptico.

Los receptores Frizzled presentan siete dominios transmembrana y pertenecen a la familia no convencional de proteínas acopladas a proteína G (Schulte and Bryja, 2007). Si bien su vía de transducción y su farmacología no han sido del todo descritas, su participación en sinapsis del sistema nervioso central los posiciona como mediadores directos en la formación y diferenciación de los componentes pre- y postsináptico. En específico, se ha observado que Fzd1, Fzd2, Fzd7 y Fzd9 se expresan diferencialmente durante la formación de neuronas hipocampales, detectándose una distribución específica tanto en neuritas, conos de crecimiento o regiones sinápticas (Varela-Nallar et al., 2012). Ensayos de inmunocitoquímica han revelado que Fzd9 co-localiza con la proteína de densidad postsináptica PSD-95 (marcador postsináptico) en espinas dendríticas de neuronas hipocampales (Ramirez et al., 2016). En este sistema, Fzd9 fue requerido para la formación de espinas dendríticas a través de su interacción con $G\alpha_o$ - $G\beta\gamma$, resultados que evidencian la relevancia de Fzd9 como un componente funcional específico de la postsinapsis para transducir señales evocadas por los ligandos Wnt. Consistente con esta evidencia en neuronas, Fzd9 se distribuye en el dominio postsináptico de la unión neuromuscular en ratones de estadio E17,5 y P0, donde co-localiza con los AChRs (Aviles et al., 2014). Experimentos funcionales mostraron que la sobreexpresión de Fzd9 en cultivos de células musculares inhibe la agregación de AChRs mediada por agrina e induce la

acumulación citosólica de β -catenina (Aviles et al., 2014). Al contrario, su silenciamiento mediado por un *short-hairpin* RNA (shRNA) específico provocó un incremento en el número y tamaño de los agregados de AChR en miotubos en cultivo (Aviles et al., 2014), sugiriendo que Fzd9 podría actuar como un inhibidor de la agregación del AChR en la unión neuromuscular de vertebrados. Aun cuando estos resultados sugieren que la organización y estabilidad postsináptica se ve alterada frente a la sobreexpresión y silenciamiento de Fzd9, los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno se desconocen. En este punto, surgen dos aspectos relevantes que aún no han sido abordados: *i) ¿Tiene Fzd9 un rol en la estabilidad de la unión neuromuscular?* y *ii) ¿Cuáles son los mecanismos por los que Fzd9 alteraría la organización de la maquinaria postsináptica, comprometiendo la estabilidad de la unión neuromuscular?*

Respecto a estas interrogantes, es importante mencionar que aun cuando los ligandos y vías de señalización Wnt ejercen diversos efectos en el dominio postsináptico de la unión neuromuscular, la mayoría de esta evidencia ha sido obtenida en etapas tempranas de la formación de esta sinapsis (Henriquez et al., 2008; Shen et al., 2018; Strohlic et al., 2012; Wang et al., 2008; Wu et al., 2010). De esta forma, la posible función de los ligandos Wnt y sus receptores en una unión neuromuscular ya constituida (es decir, madura) es ampliamente desconocida. A partir de los antecedentes expuestos, en este trabajo de tesis se estudiará la posible relación entre la estabilidad de la unión neuromuscular madura respecto a la función de Fzd9 como de otros efectores de la vía Wnt.

8. Participación de la vía Wnt luego del daño en la unión neuromuscular.

El deterioro de la unión neuromuscular puede manifestarse como consecuencia de una lesión traumática en la médula espinal o en los nervios periféricos, ocasionándose la denervación de la fibra muscular (Arbour et al., 2017; Hoke, 2006). De manera destacable y en gran diferencia a las sinapsis del sistema nervioso central, la unión neuromuscular presenta una alta capacidad regenerativa

(Huebner and Strittmatter, 2009) la que, dependiendo del grado de daño, conseguirá (o no) su restablecimiento mediante el proceso de reinervación (Fu and Gordon, 1997; Hoke, 2006). Notablemente, es posible reproducir la denervación en animales de experimentación, esencialmente a través de dos protocolos de daño. El primero, consiste en el aplastamiento del nervio (*axonotmesis*), el cual interrumpe la comunicación del axón motor, pero mantiene intacta la estructura conectiva del nervio, por lo que una vez ocurrida la degeneración axonal desde la región distal hasta el sitio de daño (y denervación), es posible observar una exitosa reinervación de la fibra muscular y una recuperación de la función motora (Savastano et al., 2014). El segundo protocolo consiste en una resección de un segmento del nervio (*neurotmesis*), generando la interrupción del axón motor y de la estructura conectiva del nervio, impidiendo así la reinervación de la fibra muscular (Savastano et al., 2014).

Si bien existen avances orientados a la comprensión de los mecanismos y procesos celulares que regulan la reparación axonal periférica, estos han estado principalmente enfocados a reparar el sitio de daño en el axón (Menorca et al., 2013), en desmedro de una comparativamente menor atención a la consecuencia funcional de la regeneración axonal, es decir, a la reinervación de los aparatos postsinápticos en la unión neuromuscular. En este punto, surge un interesante concepto mediado por el dominio postsináptico frente a la denervación, ya que incluso cuando la mayoría de los agregados del AChR se encuentran denervados como consecuencia del daño producido por aplastamiento del nervio, su estructura se mantiene a través del proceso de reinervación/regeneración, lo que se puede extender en las extremidades posteriores del ratón entre 4 a 6 semanas (Magill et al., 2007) o hasta 6 años en humanos (Chan et al., 2020). Esta evidencia indica que los aparatos postsinápticos son resilientes frente al daño, sugiriendo que la maquinaria molecular de la fibra muscular exhibe la capacidad de mantener la distribución global de los AChRs ante la ausencia del axón motor. Sin embargo, el mayor tamaño del organismo humano determina una mayor distancia y tiempo empleados para reestablecer el contacto entre la neurona motora y el músculo en comparación a modelos murinos (Hoke, 2006). En este contexto, cuando la reinervación ocurre en ventanas de

tiempo prolongadas, aun cuando se observa una regeneración **morfológica** de la sinapsis neuromuscular, esta no va acompañada de una recuperación **funcional**, surgiendo una pérdida sináptica en el dominio postsináptico después de tiempos prolongados de denervación (Sakuma et al., 2016). Al respecto, análisis en detalle a través del seguimiento de un mismo dominio postsináptico en el tiempo muestran que tan pronto como la actividad de la fibra muscular es bloqueada (químicamente o mediante denervación), existe una reducción significativa en la densidad de AChRs postsinápticos, sin variación de la morfología tipo pretzel (Akaaboune et al., 1999; Turney et al., 1996). Estos resultados demuestran que la pérdida de AChRs en la unión neuromuscular ocurre independiente del mantenimiento de la estructura global de los AChRs, indicando una variable adicional para el análisis de estabilidad postsináptica.

Considerando la evidencia que indica que Wnt3 promueve la agregación de los AChRs en colaboración con agrina a través de Rac1 (Henriquez et al., 2008), y que Wnt3a por medio de β -catenina exhibe un efecto desagregante de los AChRs *in vivo* (Wang et al., 2008), se evaluó el rol de estas vías Wnt sobre la estabilidad postsináptica en un evento de denervación. Al respecto, se observó en músculos denervados que la expresión de Wnt3 disminuyó irreversiblemente desde 1 semana luego del daño (Kurimoto et al., 2015), mientras que la expresión de Wnt3a incrementó concomitante al tiempo de denervación, alcanzando además una marcada localización sináptica luego de 2 meses del daño (Kurimoto et al., 2015). Por su parte, tanto los niveles de β -catenina activa (un indicador de activación de la vía Wnt canónica) como su localización en el dominio sináptico incrementaron luego de la denervación. De forma interesante, tanto Wnt3a como β -catenina activa se localizaron preferentemente en regiones con pérdida de AChRs (Kurimoto et al., 2015). Además, se observó que utilizando un gen reportero que expresa GFP (con destinación nuclear) bajo un promotor TCF/Lef-dependiente, el número de núcleos positivos para GFP se incrementó más del doble en comparación al grupo sin denervar (Kurimoto et al., 2015). Estos datos muestran una correlación entre la pérdida de AChRs gatillada por la denervación con la activación de la vía Wnt canónica.

En cuanto a la participación de otros componentes de la vía Wnt en un contexto de daño neuromuscular, análisis de microarreglo de RNA músculos de rata indican que las regiones subsinápticas en uniones neuromusculares del músculo extraocular expresan preferencialmente mRNAs de distintos antagonistas Wnt, incluyendo *Sfrp3*, *Sfrp5* y *Fzrb* (Ketterer et al., 2010). Lo anterior sugiere que, en condiciones basales, la vía Wnt se encuentra inhibida en la sinapsis neuromuscular. En concordancia a lo anterior, análisis de Western blot en músculos denervados muestran que los niveles proteicos de los efectores intracelulares β -catenina y GSK-3 β incrementan significativamente (Svensson et al., 2008), indicando que la vía Wnt canónica se sobreactiva frente a la denervación (Kurimoto et al., 2015).

Si bien el daño traumático a los nervios periféricos ocasiona una pérdida en la organización y estabilidad postsináptica, un fenotipo similar ocurre en patologías neuromusculares. Tal es el caso de la miastenia gravis, donde el organismo genera autoanticuerpos contra distintos efectores de la sinapsis neuromuscular, tales como MuSK, LRP-4 o AChRs, lo que resulta en el desensamble postsináptico junto a una consecuente atrofia y debilidad muscular (Drachman et al., 1980; Huijbers et al., 2019; Yan et al., 2018). De manera destacable, autoanticuerpos contra el dominio CRD de MuSK, que ha sido vinculado como un dominio efector de la vía Wnt, también han sido detectados en un porcentaje de pacientes que padecen miastenia gravis (Takamori et al., 2013). En este contexto, análisis de ratones adultos que expresan una forma trunca de MuSK que carece del dominio CRD del receptor (*MuSK Δ CRD*) exhiben defectos morfológicos y funcionales del componente postsináptico de la unión neuromuscular, incluyendo fragmentación de los agregados del AChR, debilidad muscular, fatigabilidad, déficit de la contracción muscular y también denervación (Messeant et al., 2015). De manera interesante, estos parámetros fueron rescatados de forma parcial al tratar a los ratones *MuSK Δ CRD* con LiCl, inhibidor farmacológico de la quinasa GSK-3 β (Stambolic et al., 1996). Estos resultados proporcionan evidencia del potencial terapéutico del litio (y potencialmente de la activación de la vía Wnt canónica) para el mantenimiento del aparato postsináptico en

condiciones que resultan una desorganización de la sinapsis neuromuscular (Phillips and Vincent, 2016).

En cuanto a la participación de los receptores Frizzled frente al daño de la unión neuromuscular, el receptor Fzd9 destaca en distintos contextos. Por ejemplo, en esclerosis lateral amiotrófica, se ha evidenciado que en etapas pre-sintomáticas, es decir, previo a la pérdida de motoneuronas, ocurre daño y denervación de la unión neuromuscular (Arbour et al., 2017; Cantor et al., 2018; Dobrowolny et al., 2015). Al respecto, estudios de microarreglo en músculos provenientes de ratones modelo para el estudio de ELA (que expresan una forma mutada en G93A de la enzima hSOD1) (Gurney et al., 1994), revelan que Fzd9 incrementa su expresión en las etapas de la enfermedad cuando ya ha comenzado la denervación del dominio postsináptico (de Oliveira et al., 2014). Por otra parte, en un modelo de denervación tanto del músculo diafragma como de las extremidades traseras, la expresión de Fzd9 y de otros genes de la vía Wnt disminuye después de 6 días (Magnusson et al., 2005), siendo este intervalo de tiempo coincidente con el periodo donde incrementa el transcrito de los AChRs luego de la denervación (Merlie et al., 1984). Estos resultados muestran una correlación directa entre la expresión de Fzd9 con la pérdida de organización y disminución de niveles de los AChRs.

En complemento a estos estudios, datos previos obtenidos en el laboratorio indican que Fzd9 altera la distribución de los AChRs en las etapas postnatales donde transcurre la maduración postsináptica (P1-P44) (tesis doctoral Ojeda J; datos no publicados). Se observó que la sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9 resulta en un incremento o disminución del área de los agregados de AChR, respectivamente. Registros electrofisiológicos *ex vivo* mostraron que la sobreexpresión de Fzd9 induce una disminución en la amplitud del potencial de la placa motora miniatura (mEPP), mientras que el silenciamiento de Fzd9 generó un incremento en este parámetro, sugiriendo así que Fzd9 podría regular la densidad y organización de AChRs en la superficie (tesis doctoral Ojeda J; datos no publicados). Más aún, durante la reestructuración morfológica que ocurre en el aparato postsináptico

en la etapa de maduración (transición desde morfología tipo placa a pretzel), los niveles de Fzd9 incrementan en las etapas donde emergen zonas carentes del AChR en los agregados postsinápticos. A partir de ello, es posible plantear que cambios en los niveles de Fzd9 acompañan de forma directa a cambios en la distribución y cantidad de AChRs en el dominio postsináptico de la unión neuromuscular. Sin perjuicio de lo anterior, se desconoce el rol que Fzd9 podría ejercer sobre el aparato postsináptico de la unión neuromuscular madura, en específico, sobre la organización y estabilidad de los AChRs en condiciones basales, o en situaciones que comprometen esta sinapsis, como la denervación. De esta forma, el desarrollo de este estudio podría identificar una potencial molécula de interés para intervenir la regeneración de esta sinapsis luego del daño o en patologías asociadas al sistema locomotor.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La unión neuromuscular es la sinapsis entre la neurona motora y el músculo esquelético, y regula el movimiento coordinado de los organismos. El daño traumático de la médula espinal o de los nervios periféricos son factores que generan la pérdida de esta sinapsis, resultando en la denervación de los dominios postsinápticos. La orquestación de distintas moléculas y vías de señalización son requeridas durante el establecimiento y mantenimiento de la unión neuromuscular. Aun cuando distintos ligandos, efectores y vías Wnt parecen regular positiva y negativamente la organización de esta sinapsis, poco se conoce respecto al rol de los receptores Frizzled (Fzd) en este contexto. Los receptores Fzd poseen siete dominios transmembrana y se clasifican como receptores acoplados a proteína G no convencionales. Fzd9 es de particular interés, pues regula la conectividad sináptica en el sistema nervioso central y se encuentra localizado en la postsinapsis. De manera interesante, datos previos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que Fzd9 inhibe la diferenciación postsináptica, además de alterar el aparato postsináptico en uniones neuromusculares normalmente inervadas. Por otra parte, se ha observado que los niveles de Fzd9 son diferencialmente regulados a través del curso de la denervación de los aparatos postsinápticos, sugiriendo un rol de este receptor en el mantenimiento de la unión neuromuscular. No obstante, los mecanismos que subyacen el efecto de Fzd9 se desconocen, surgiendo así dos aspectos que se han abordado en este trabajo de tesis: ¿tiene Fzd9 un rol en la estabilidad de la unión neuromuscular luego del daño al nervio? y ¿cuáles son los mecanismos por los que Fzd9 alteraría la organización de la maquinaria postsináptica, comprometiendo la estabilidad de la unión neuromuscular normalmente inervada? De esta forma, el desarrollo de esta tesis ha permitido comprender la dinámica de los AChRs y la organización postsináptica, como también la participación de componentes o reguladores de la vía Wnt en la unión neuromuscular madura, lo que promovería las bases para potenciales estrategias de regeneración frente a situaciones que afectan negativamente a esta sinapsis.

III. HIPÓTESIS

“La pérdida en la estabilidad de AChRs de superficie en la membrana postsináptica muscular está directamente relacionada con la desorganización del dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular. La expresión del receptor Frizzled-9, así como la activación de la vía Wnt/ β -catenina, resultan en la desestabilización de los AChRs de superficie”.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre el recambio de AChRs y la organización del dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular tanto en condiciones basales como frente a la denervación de corto y largo plazo. Determinar la participación del receptor Frizzled-9 así como de la vía activación de la Wnt/ β -catenina sobre el recambio de los AChRs.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la correlación entre la estabilidad de los AChRs de superficie con la organización del dominio postsináptico frente a la denervación de la unión neuromuscular.
2. Estudiar la organización de la subpoblación intracelular de AChRs frente a la denervación de la sinapsis neuromuscular.
3. Determinar el efecto de la expresión del receptor Fzd9 sobre la estabilidad de los AChRs en la superficie del dominio postsináptico de la unión neuromuscular.
4. Analizar el efecto de la activación farmacológica de la vía Wnt canónica sobre la estabilidad y organización de los AChRs en uniones neuromusculares inervadas y denervadas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Para este estudio, fueron utilizados ratones adultos *wild type* Swiss Webster, CF-1 y/o ratones transgénicos Pax7-CreERT2:ROSA26 mT/mG, los cuales se mantuvieron a una temperatura de 20-26°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno respectivamente. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con pellet (Prolab RMH-3000, LabDiet) y agua. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados y conducidos siguiendo los protocolos del manual de bioseguridad y bioética de la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID, Gobierno de Chile) y del Comité de Bioética de la Universidad de Concepción. Los tratamientos de intervención quirúrgica se realizaron bajo anestesia inhalatoria (Isoflurano 2,5% con una mezcla de oxígeno a 0,8-1 L/minuto).

2. Plásmidos.

Los constructos utilizados en el desarrollo de esta tesis fueron preparados a través de maxipreps utilizando el kit Qiagen® Pasmid Maxi Kit (Qiagen, #12163), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al respecto, los plásmidos utilizados codifican respectivamente para:

Fzd9-HA-pCS2+: La proteína Fzd9 de ratón, donde el epítipo HA está acoplado hacia el extremo C-terminal de Fzd-9. Esta secuencia está contenida en un vector pCS2+.

CRISPR-Cas9-sgFzd9/RFP: Un ARN guía (ARNsg) de secuencia 5'-GCGTGCGGGTTCGTTG-CGCGT (GGG)-3' el cual reconoce a la secuencia ubicada en el exón 1 del gen de Fzd9 de ratón. Además, este constructo codifica para la proteína fluorescente roja (RFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV).

tdTomato: La proteína fluorescente roja Tomate, la cual está controlada por el promotor CMV. Se utiliza como constructo control o para acompañar en co-electroporación a constructos que carecen de un epítipo o proteína fluorescente acoplada dentro del vector.

3. Electroporación del músculo *Levator auris longus*.

Para llevar a cabo la sobre-expresión o silenciamiento de proteínas de interés en el músculo *Levator auris longus* (LAL), se generó la transferencia a través de la electroporación del tejido. Para ello, ratones adultos fueron anestesiados mediante inhalación de isofluorano (2,5% con una mezcla de 0,8-1,0 L/min de oxígeno, Baxter) y posicionados sobre un panel termoregulado, donde se inyectó de manera subcutánea una solución de 10 μ l de hialuronidasa 2 mg/ml (Sigma-Aldrich) y se incubó por 15 minutos. Posteriormente, se realizó una incisión de la piel de ~1,5 centímetros sobre la región donde se ubica el músculo LAL. Una vez localizado el músculo, el que está compuesto por una hemiregión izquierda y una hemiregión derecha, se inyectaron 10 μ g del ADN plasmidial (contenidos en un volumen de 10 μ l) dentro de la fascia que recubre a cada hemiregión del músculo, hasta generar un abultamiento en forma de burbuja. Finalmente, los electrodos se posicionaron de forma paralela a la dirección del músculo y se desencadenó en cada hemiLAL, 5 pulsos de 100 V/cm con una duración de 20 ms a 1 Hz de frecuencia (Electroporador ECM 830). Una vez realizada la electroporación, la piel fue suturada y los ratones fueron devueltos a sus cajas para su respectivo monitoreo y recuperación hasta un nuevo tiempo de intervención.

4. Denervación del músculo LAL.

El daño al nervio facial fue realizado de acuerdo a (Olmstead et al., 2015) con algunas modificaciones (Ojeda et al., 2020). Brevemente, los animales fueron anestesiados mediante la inhalación de isofluorano y la región posterior de la oreja fue rasurada para despejar y exponer la piel, donde una incisión de 5 milímetros fue llevada a cabo para localizar las ramas del nervio facial. La rama auricular posterior del nervio (la cual inerva al músculo LAL), fue cuidadosamente despejada, evitando así la intervención directa en este. Una vez localizado el nervio, se llevó a cabo uno de los siguientes tipos de daño; i) corte del nervio (neurotmesis), en el cual una sección de 4 milímetros de la rama del nervio facial fue removida y ii) aplastamiento del nervio (axonotmesis), donde la rama del nervio facial fue expuesta y aplastada durante 30 segundos utilizando pinzas Dumont #5/45 (Fine Science Tools).

Finalmente, la piel fue suturada con hilo quirúrgico absorbible (Ethicon Vicryl USP 6-0) y los animales fueron devueltos a sus cajas para un posterior monitoreo y recuperación. Animales sin denervar fueron utilizados como control.

5. Análisis de recambio de los AChRs *in vivo*: Ensayo de doble BTX.

Para estudiar la estabilidad de los AChRs dentro de cada dominio postsináptico, se procedió a marcar a los AChRs que se encontraban inicialmente en la superficie de la fibra muscular (denominados AChRs *pre*-existentes), donde una vez transcurridas distintas ventanas de tiempo, se detectaron los AChRs que se incorporaron a la superficie del dominio *post*-sináptico (llamados AChRs nuevos). Una mayor tasa de recambio será indicativa de una menor estabilidad de la *postsinapsis*. Experimentalmente, para llevar a cabo este análisis, los ratones procedentes de las respectivas intervenciones fueron anestesiados y la región de la piel que cubre al músculo LAL fue limpiada con etanol al 70% v/v, donde se inyectó de manera subcutánea α -BTX (Molecular Probes) acoplada al fluoróforo Alexa@488 (BTX-488) con una dosis no saturante (Akaaboune et al., 1999) correspondiente a 4 μ g/ml diluidos en PBS (marcaje denominado BTX-1). Una vez transcurrido una ventana de tiempo entre 3-7 días (especificado para cada aproximación experimental en la descripción de resultados), los ratones fueron sacrificados y el músculo LAL fue disecado y fijado con formaldehído al 0,5% v/v en PBS durante 90 minutos. Luego de un lavado de 15 minutos en PBS frío, los músculos ya fijados se incubaron con α -BTX acoplada al fluoróforo Alexa@555 (BTX-555, 2 μ g/ml en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente para marcar los AChRs nuevos (marcaje denominado BTX-2). Finalmente, luego de 4 lavados con PBS de 15 minutos cada uno, los músculos fueron procesados para su montaje y posterior visualización por microscopía confocal. Todas las imágenes para cada condición experimental fueron obtenidas utilizando los mismos parámetros de adquisición en un microscopio láser confocal LSM700 (Zeiss) perteneciente al Centro de Microscopía Avanzada (CMA-BíoBío) en la Universidad de Concepción. Este análisis otorga la posibilidad de encontrar: **i**) estructuras postsinápticas con una mayor tinción de color rojo (debido a mayor señal de

BTX-555 en comparación a la señal de BTX-488), **ii**) estructuras postsinápticas con una coloración amarilla (similitud entre las señales de BTX-488 y BTX-555) y **iii**) estructuras postsinápticas de color verde (mayor señal de BTX-488 respecto a la señal de BTX-555). En este contexto, el recambio fue analizado de manera cuantitativa a través de la relación de intensidad de la señal de fluorescencia entre BTX-2/BTX-1. Estructuras *post*-sinápticas con valores $> 1,0$ en esta razón fueron clasificadas como inestables, mientras que las estructuras con valores $< 1,0$ se categorizaron como estables.

6. Inmunofluorescencia de músculo completo.

El músculo LAL una vez disecado fue fijado con formaldehído al 0,5% v/v en PBS durante 90 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de fijación, el tejido fue lavado durante 15 minutos con PBS y luego fue incubado por 30 minutos con una solución de PBS incluyendo glicina 0,15 M. Posterior a esto, el músculo fue permeabilizado mediante 8 lavados de 15 minutos cada uno con una solución de PBS conteniendo Tritón X-100 al 0,5% v/v (PBS-T) en agitación suave. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados toda la noche a 4°C mediante la incubación de una solución de PBS-T/BSA al 4% p/v, donde también se agregó el péptido anti fragmento Fab de ratón a una concentración final de 43 µg/ml. Al día siguiente, se incubaron los anticuerpos primarios contra el axón motor (2H3, 1:300. Developmental Studies Hybridoma Bank), el terminal axónico (SV2, 1:50. Developmental Studies Hybridoma Bank), o células de Schwann a través de la proteína de unión a calcio S100β (1:300, DAKO); diluidos en solución de bloqueo (PBS-T/BSA 4%) toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas durante 2 horas con PBS-T en agitación suave y se procedió a incubar toda la noche a 4°C las muestras con los anticuerpos secundarios respectivos para cada condición, los que están conjugados a los fluoróforos Cy2, Cy3 o Cy5 (1:250; Donkey H+L, Jackson Immunoresearch Laboratories), en conjunto con DAPI (1:100, Thermo Fisher) y BTX-488 o BTX-555 (1:500, Molecular Probes).

7. Administración de Litio *in vivo*.

Ratones adultos fueron anestesiados mediante la inhalación de isoflurano y posteriormente, la región de la piel que cubre al músculo LAL se limpió con etanol al 70% v/v y se inyectó una solución conteniendo LiCl 50 mM (Sigma-Aldrich) preparado en PBS estéril. Este procedimiento se realizó de forma diaria por 7 o 10 días, dependiendo del tipo de ensayo realizado, los que incluyen el efecto de litio sobre el recambio de AChRs en uniones neuromusculares normalmente inervadas o denervadas (ver descripción de resultados). Un grupo de ratones con inyecciones de NaCl 50 mM diluido en PBS estéril fueron utilizados como condición control para estos experimentos.

8. Marcaje con *Vicia Villosa in vivo*.

La visualización de la ubicación original de los AChRs dentro de los dominios *post*-sinápticos alterados debido a la denervación, fue revelada mediante la tinción *in vivo* con la lectina de *Vicia Villosa* acoplada a fluoresceína (VVL, Vector Laboratories), la cual reconoce preferencialmente a N-acetilgalactosaminas unidas por enlace α - a serinas o treoninas de polipéptidos presentes específicamente en la unión neuromuscular (Martinez-Pena et al., 2015; Scott et al., 1988). De esta forma, los cambios en la distribución inicial de los AChRs pueden ser detectados. Para esto, ratones que 7 y 6 días antes habían sido sometidos al daño del nervio por corte, y a la tinción con BTX1 respectivamente, fueron anestesiados e inyectados de manera subcutánea con una solución de VVL-fluoresceína a una concentración de 20 μ g/ml en PBS estéril. Luego de 30 minutos, los ratones fueron sacrificados y el músculo LAL fue disecado, fijado y procesado para la tinción con BTX2 (ensayo de doble BTX). Finalmente, las muestras montadas fueron analizadas mediante microscopía confocal, obteniendo imágenes para las estructuras postsinápticas que revelaron el marcaje de BTX1, BTX2 y VVL. Para este experimento en particular, los conjugados fluorescentes de BTX1 y BTX2 correspondieron a BTX-647 y BTX-555 respectivamente. Así, las imágenes fueron procesadas y exhibidas con el pseudocolor verde para BTX1, pseudocolor rojo para BTX2 y pseudocolor blanco para VVL.

9. Detección de subpoblaciones de AChRs sometidas a recambio y reciclaje.

Para discriminar el contenido de AChRs que fue sometido a recambio o a reciclaje dentro de los dominios postsinápticos de uniones neuromusculares denervadas o control, se procesaron animales una vez transcurrido 3 días desde el daño al nervio, donde los ratones fueron anestesiados, y se inyectó de manera subcutánea una solución de α -BTX acoplada a biotina (BTX-B, Molecular Probes) a una concentración 4 μ g/ml en PBS estéril. Luego de 1 hora, los ratones fueron anestesiados nuevamente y sometidos a una inyección subcutánea con una solución de estreptavidina acoplada al fluoróforo Alexa®-488 (Strep-488, Invitrogen™) diluido 1:100 (8 μ g/ml) en PBS estéril. Posteriormente, luego de 1-3 días, los ratones fueron nuevamente anestesiados y se inyectó de manera subcutánea, una solución conteniendo estreptavidina acoplada a Alexa-555 (Strep-555, Invitrogen™). Luego de 1 hora, los animales fueron sacrificados, el músculo LAL disecado, fijado con formaldehído al 0,5% v/v en PBS y posteriormente lavado con PBS durante 15 minutos. Finalmente, los AChRs sometidos a recambio fueron detectado a través de la incubación del músculo LAL con BTX-647 5 μ g/ml (BTX-2) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los músculos fueron lavados y procesados para su montaje y posterior análisis mediante microscopía confocal. De esta forma, los AChRs pre-existentes que no fueron sometidos ni a reciclaje ni a recambio fueron detectados con una tinción verde; los AChRs que fueron sometidos a reciclaje fueron detectados mediante la tinción roja (Bruneau et al., 2005; Bruneau and Akaaboune, 2006), y los AChRs que fueron incorporados a la membrana (AChRs nuevos) fueron detectados con una tinción blanca (ver descripción de resultados para más detalles).

10. Detección de subpoblaciones intracelulares de AChRs.

Una vez marcados los AChRs *pre*-existentes (BTX-1) o nuevos (BTX-2), el tejido fue posteriormente procesado para distinguir estructuras de AChRs intracelulares. Para esto, el tejido fue permeabilizado por 2 horas mediante la incubación con PBS-T a temperatura ambiente en agitación. Se implementó un tercer marcaje con BTX-3, la cual se aplicó como una solución de BTX-647 (2 μ g/ml) contenida en PBS toda la noche a 4°C. Esta incubación fue acompañada en paralelo con el marcaje de núcleos

mediante DAPI (1:100). Al día siguiente, el tejido fue lavado 8 veces con incubaciones de 15 minutos con PBS-T. Finalmente, el músculo fue montado y visualizado mediante microscopía confocal.

11. Inducción y detección de células satélites activas en el músculo LAL.

La participación de células satélite en la aparición de estructuras intracelulares localizadas en la vecindad de la unión neuromuscular fue llevada a cabo a través de la utilización de los ratones transgénicos Pax7^{CreERT2}:ROSA26^{mT/mG} (gentilmente donados por el Dr. Hugo Olgún de la Pontificia Universidad Católica de Chile). De manera general, estos ratones expresan de forma ubicua la proteína fluorescente roja Tomate en la membrana celular, la cual está flanqueada por sitios de recombinación *loxP*. De este modo, es posible inducir una recombinación mediada por CRE específicamente en células satélite (Pax7 es un promotor específico para estas células) a través de la administración de tamoxifeno, lo que generará que las células satélite activadas ya no expresen la proteína Tomate, sino que comiencen a expresar la proteína GFP en la membrana de las células satélite. De este modo, es posible seguir la localización de células satélites que fueron activadas debido al daño inducido por la denervación del músculo LAL. Para inducir la recombinación en estos animales, inmediatamente a continuación del corte del nervio facial, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente una vez al día con 100 μ l de tamoxifeno 10 mg/ml (Sigma-Aldrich), preparado en una solución compuesta del 95% v/v de aceite de sésamo (Sigma-Aldrich) y 5% v/v etanol. Este procedimiento se realizó durante 5 días seguidos, de acuerdo a lo descrito previamente (Park et al., 2008; Reinert et al., 2012). Transcurrido 2 días desde la última inyección, los ratones fueron sacrificados, y el músculo LAL disecado, fijado y procesado para la tinción respectiva con BTX-3 (ver sección Detección de subpoblaciones intracelulares de AChRs).

12. Análisis de internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.

La internalización de los AChRs *in vitro* fue evaluado en las línea celular heteróloga CHO-K1/A5, la cual expresa de manera estable el AChR tipo muscular adulto, de topología $\alpha 2\beta\delta\epsilon$ (Kumari et al.,

2008). Estas células fueron mantenidas en medio Ham's F-12 (Gibco™) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB). Inicialmente, las células fueron tratadas por 16 horas con LiCl 50 mM o con solución salina (PBS) diluidos en medio de crecimiento. Luego, se realizó el marcaje de los AChRs que se encontraban en la membrana celular a través de la incubación con BTX-555 (4 µg/ml) en PBS conteniendo CaCl₂ 0,6 mM y MgCl₂ 1,6 mM (PBS-Ca²⁺/Mg²⁺) durante 45 minutos en hielo. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS-Ca²⁺/Mg²⁺ frío para remover el exceso de BTX-555 y se incubaron con medio de crecimiento para permitir la internalización de los AChRs durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS-Ca²⁺/Mg²⁺ frío y los AChRs nuevos incorporados a la membrana celular se marcaron con BTX-488 (4 µg/ml) en PBS-Ca²⁺/Mg²⁺ durante 45 minutos en hielo. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% v/v en PBS durante 20 minutos a 4°C, lavadas 2 veces con PBS y montadas para la subsecuente adquisición de imágenes mediante microscopía de epifluorescencia. La intensidad de fluorescencia relativa fue cuantificada mediante la medición de la señal de BTX-555 remanente en la membrana o de BTX-488 a la membrana celular, restando el ruido de fondo localizado en la proximidad de la célula analizada.

13. Determinación de la densidad de AChRs *in vivo*.

La densidad de AChRs para los experimentos de animales tratados con LiCl o NaCl, fue determinada a través de la sumatoria de las intensidades de fluorescencia tanto de BTX1 (BTX-488) y BTX-2 (BTX-555) obtenidas a través de microscopía confocal utilizando parámetros de adquisición similares para todas las condiciones experimentales. Las sinapsis que se encontraban en capas más profundas del músculo, y que exhibían una intensidad de fluorescencia menor a 60 U.A no fueron consideradas para esta cuantificación.

14. Western blot.

Para la obtención de proteínas desde el músculo LAL, se realizó la disección y subsecuente homogenización del tejido a través de un homogenizador Dounce, realizando en hielo su disgregación

mecánica utilizando 150 µl de buffer RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1% v/v, deoxicolato de sodio 0.5% p/v, SDS 0.1% p/v y Tris 50 mM pH 8.0) en conjunto con inhibidores de proteasas (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X; #78430, Thermo Scientific™) y fosfatasas (Na₃VO₄ 2 mM y NaF 100 mM). Posteriormente, el homogenado fue incubado 20 minutos en hielo antes de ser centrifugado a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado y cuantificado mediante el método de Bradford (1610406; Bio Rad), utilizando una curva de albúmina de suero bovino (BSA) como referencia. Luego, 40 µg de proteínas fueron mezcladas con buffer de carga (LSB) al 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 40% v/v, SDS 8% p/v, β-mercaptoetanol 20% p/v, azul de bromofenol 0.04% p/v), calentadas a 95°C, y posteriormente cargadas y separadas en geles SDS-PAGE preparados al 10%. Subsecuentemente, las proteínas fueron transferidas utilizando corriente eléctrica constante de 350 mA durante 90 minutos a membranas de PVDF, las que fueron previamente activadas con metanol al 100% durante 2 minutos. Para corroborar una transferencia correcta de proteínas, se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau durante 1 minuto a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada 3 veces. Posteriormente, los sitios inespecíficos fueron bloqueados mediante la incubación de las membranas con una solución de TBS-Tween (Tris 10 mM pH 8,0; NaCl 3M, Tween-20 0,1% v/v)/leche libre de grasa al 5% (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Fzd9 (1:500, R&D), anti-GAPDH (1:2000, Santa Cruz Biotechnology), diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Luego de 5 lavados con TBS-Tween 0,05% (TBS-T), las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-rat, anti-goat y anti-mouse acoplados a peroxidasa de rábano (1:10000; Jackson ImmunoResearch, #705-035-003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, luego de 5 lavados con TBS-T, las membranas fueron reveladas utilizando el kit quimioluminiscente Western Lightning ECL Pro (NEL120001EA; PerkinElmer) de acuerdo con las instrucciones de fábrica. Las bandas respectivas fueron detectadas a través del sistema de imagen ChemiDoc MP (1708280; Bio-Rad) utilizando capturas acumuladas de 2 segundos de exposición cada una, hasta alcanzar el punto más alto previo a la saturación de la banda.

15. Inmunoprecipitación.

Para el enriquecimiento de Fzd9 desde el tejido muscular, se procedió a disecar el músculo LAL o el músculo diafragma de ratones adultos, los cuales fueron incubados por 5 minutos en hielo con el buffer de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 8,0; EDTA 1,0 mM; NaCl 150 mM; deoxicolato de sodio 0,5% p/v; SDS 0,1% p/v y NP-40 1% v/v), conteniendo tanto inhibidores de proteasas (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail 100X; #78430, Thermo Scientific™) como fosfatasas (NaF 100 mM, Na₃VO₄ 2 mM). Luego, el músculo fue disgregado en hielo mediante un homogenizador Dounce y el homogenado se incubó 20 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado y 10% de este almacenado como *input*. Al remanente de este sobrenadante se le agregó el anticuerpo primario contra Fzd9 (anti-Fzd9, #RB01. R&D systems), quedando en una dilución 1:50 (4 µg/ml), donde fue incubado toda la noche a 4°C en agitación. Al otro día, la mezcla se incubó por 2 horas a 4°C con 40 µl de una solución de proteína A/G acoplada a esferas de agarosa (Pierce™ Protein A/G Agarose, #20421), la cual previamente había sido equilibrada y preparada al 50% v/v en buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el complejo de unión conteniendo desde Fzd9 a las esferas de agarosa fue colectado mediante centrifugación a 8000 x g durante 2 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue descartado, y el pellet (correspondiente al complejo inmunoprecipitado) fue lavado 2-3 veces mediante la incubación por 10 minutos con 300 µl de buffer RIPA en agitación, seguido de una centrifugación a 8000 x g durante 2 minutos. Finalmente, el complejo colectado fue eluido a través de la resuspensión con 40 µl de LSB 2X y subsecuente incubación a 95°C por 5 minutos. Las fracciones eluidas fueron analizadas mediante western blot.

16. Adquisición de imágenes.

Las imágenes obtenidas y utilizadas para la cuantificación en este trabajo se obtuvieron a través de un microscopio láser confocal LSM700 (Zeiss), el cual presenta tres líneas de láser 488, 550 y 639 nm. Además, se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio multifotón espectral LSM780

(Zeiss), el que permite realizar un análisis confocal espectral, disponiendo de las líneas de láser 405, 458, 488, 514, 561 y 633 nm y un láser pulsado multifotónico ajustable entre 680-1080 nm en pasos de 1 nm, provisto para emitir también fotones de poca energía. Todo este equipamiento proviene del Centro de Microscopía Avanzada (CMA Bío-Bío) de la Universidad de Concepción.

Para la adquisición de imágenes respecto al recambio de los AChRs dentro del dominio postsináptico, el tejido fue observado con un objetivo 40X (Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27) o 63X (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27), y se capturaron imágenes confocales de dimensión 1024x1024 pixeles, utilizando los mismos parámetros de adquisición entre experimentos. Por ejemplo: ganancia láser-488: 720, láser-550: 700 y láser-639: 780; ganancia digital: 1.00, con apertura de *pinhole* entre 6-8 μm y una potencia de láser entre 6,0-8,0%. Las imágenes exhibieron entre 20-45 μm de grosor, donde la adquisición de estas fue realizada con planos focales capturadas cada 1 μm . Cabe destacar, que para las distintas condiciones la adquisición de imágenes no generó la saturación de los pixeles respectivos a cada canal. En algunos experimentos, las muestras montadas fueron visualizadas mediante Microscopía de Iluminación Estructural (Zeiss ELYRA S1- SIM, microscopía de super resolución) y las imágenes fueron capturadas con un objetivo 63X (Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27).

17. Medición de intensidad de fluorescencia en la región postsináptica.

Las imágenes de todos los planos z obtenidas por microscopía confocal para cada condición fueron procesadas como proyección de máxima intensidad, donde en los aparatos postsinápticos revelados se trazó el perímetro de cada uno de estos mediante la herramienta de selección a mano alzada del software Image J. Para cada canal respectivo, se midió la intensidad de fluorescencia promedio, donde los datos fueron procesados para analizar el grado de recambio de los AChRs dentro de cada dominio postsináptico. El recambio de los AChRs dentro de cada dominio postsináptico fue evaluado de forma cuantitativa por la relación entre la intensidad de fluorescencia promedio de la señal de BTX-555 respecto a la señal de BTX-488 (BTX-2/BTX-1). En consecuencia, los valores obtenidos fueron

utilizados para categorizar las estructuras postsinápticas como estables si el valor en la relación de intensidad de fluorescencia de BTX-2/BTX-1 fue $\leq 1,00$. Por el contrario, las estructuras que exhibían valores $> 1,00$ en la relación de intensidad de fluorescencia entre BTX-2/BTX-1 fueron consideradas inestables.

18. Análisis morfométricos del dominio postsináptico.

La distribución de los AChRs que conllevan a la manifestación en la morfología global de cada dominio postsináptico fue evaluada cuantitativamente utilizando un método semiautomatizado denominado “NMJ-morph” (Jones et al., 2016), el cual permite obtener análisis robustos y comparables de distintos parámetros tanto *pre-* como postsinápticos. En el caso de este trabajo en particular, los parámetros postsinápticos analizados correspondieron a: área y perímetro de los agregados de AChR; área y perímetro de la placa motora; diámetro de la placa motora; número de fragmentos o agregados de AChRs que componen a una estructura postsináptica; y *compactness*, parámetro que indica la proporción de AChRs que componen a una placa motora.

19. Análisis compartimentalizados de la localización de AChRs en el dominio postsináptico.

Para determinar si el tratamiento de Litio induce un rearrreglo en la ubicación de AChRs dentro de las estructuras postsinápticas en uniones neuromusculares maduras, se procedió a analizar compartimentos tanto de la placa motora, como de las ramas que componen al dominio postsináptico mediante el software ImageJ. Para el primer caso, se trazó de manera manual una línea que delimitó el perímetro de la placa motora, de la cual se obtuvieron 5 segmentos concéntricos de acuerdo con la topología inicial del borde que fue marcado (ver Figura 7A). En cada segmento, se midió la intensidad de fluorescencia promedio ya sea de BTX-488 o BTX-555, donde además, la relación entre BTX-555/BTX-488 fue calculada para determinar el recambio de AChRs en cada compartimento. Para el segundo caso, se realizaron tres pares de secciones rectangulares, las cuales se realizaron desde la periferia hacia el centro de las ramas localizadas en las estructuras postsinápticas maduras. Similar al

procedimiento anterior, se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia promedio de la señal de BTX-488 y BTX-555, calculando también la relación de sus intensidades para determinar el recambio en cada segmento del dominio postsináptico (Ver Figura 7B).

20. Análisis estadístico.

En este trabajo, se utilizó test-t para determinar la existencia de diferencia entre dos grupos. A su vez, comparaciones de 3 o más grupos frente a una misma condición experimental fueron realizadas mediante ANOVA de una vía seguido del post-test de Tukey. Por otro lado, los análisis para datos que presentaban agrupaciones con más de dos variables fueron analizados mediante ANOVA de doble vía seguido del post-test de Tukey. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados para otorgar significancia en las comparaciones. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces de forma independiente ($N=3$), al menos que se especifique lo contrario. Dependiendo del experimento, 10-20; 30-50 o 80-120 uniones neuromusculares fueron analizadas (n = número de sinapsis utilizadas en la cuantificación).

VII. RESULTADOS

Capítulo I: Dinámica de los AChRs en la unión neuromuscular luego del daño.

El estudio de la estabilidad postsináptica de la unión neuromuscular, específicamente de los AChRs, fue evaluada utilizando como parámetro el recambio de los AChRs *in vivo* (Figura 5). Para esto, se utilizó una aproximación denominada “ensayo de doble BTX”, que consistió en el marcaje de AChRs a través del tiempo con α -bungarotoxina (BTX) acoplada a distintos fluoróforos, identificando así dos subpoblaciones de AChRs: los “pre-existentes”, definidos como los receptores que se encuentran en la superficie al momento de una primera tinción con 488-BTX (BTX-1, t_1), y los AChRs “nuevos”, receptores que se incorporaron a la superficie del músculo LAL debido al proceso de recambio (Figura 5, t_2), los que fueron marcados con 555-BTX (BTX-2). Este experimento permite la visualización de ambas subpoblaciones de AChRs dentro de un mismo aparato postsináptico (Figura 5, t_2 ; panel derecho), donde la coloración que adquiere este dependerá de la abundancia respectiva a cada tipo de AChR al momento del análisis. Es decir, si un aparato postsináptico presenta una coloración mayoritariamente verde, es porque exhiben una mayor proporción de AChRs “pre-existentes” versus los AChRs “nuevos” (dominios postsinápticos estables), mientras que la coloración principalmente roja denota una mayor proporción de AChRs “nuevos” sobre los “pre-existentes” (dominios postsinápticos dinámicos).

Inicialmente, se realizó la caracterización de los parámetros requeridos para determinar de forma óptima la distribución de los AChRs dentro del dominio postsináptico, donde se estableció la ventana de tiempo que debe transcurrir entre el marcaje con BTX-1 y BTX-2 para evaluar cuantitativamente el proceso de recambio de los AChRs. Se evaluaron ventanas de tiempo que abarcaron desde las 6 horas hasta los 14 días (Figura 6A) y las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal, manteniendo todos los parámetros de adquisición de imágenes entre experimentos.

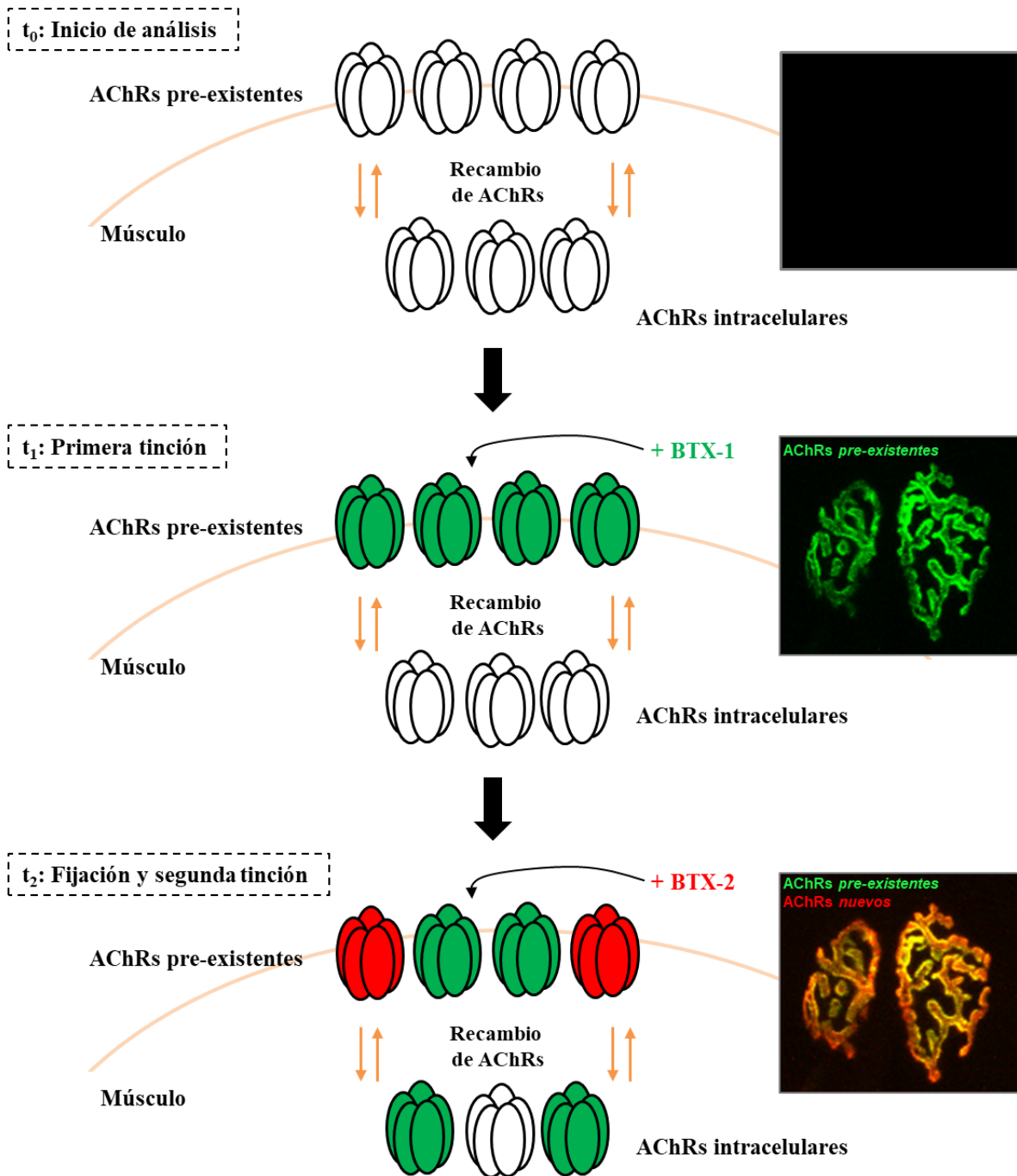


Figura 5: Ensayo de doble BTX para la determinación del recambio de los AChRs *in vivo*.

Inicialmente (t_0), los AChRs se encuentran ya sea en la superficie de la fibra muscular o intracelularmente. Estos serán detectados mediante una primera tinción *in vivo* (t_1) con 488-BTX (BTX-1, verde). Luego del recambio de los receptores (t_2), los músculos serán disecados, fijados, y los AChRs que se incorporaron a la superficie serán marcados con 555-BTX (BTX-2, roja).

Se observó que al analizar el recambio de AChRs por 6 horas, los dominios postsinápticos exhibieron una marcada tinción con BTX-1 (Figura 6B, panel izquierdo), cuya señal fue cercana a los límites de saturación en la adquisición del canal verde. A su vez, existió una escasa señal para BTX-2 (Figura 6B, panel medio), indicando que la composición del dominio postsináptico fue principalmente de AChRs “pre-existentes” (Figura 6B, panel derecho). A medida que el tiempo de recambio fue incrementando, la intensidad en la señal de BTX-1 fue disminuyendo y respectivamente, la señal de BTX-2 fue incrementando en cada estructura postsináptica (Figura 6B). A los 7 días, bajo nuestras condiciones experimentales, fue posible determinar de manera cualitativa la presencia de intensidades equivalentes de ambas subpoblaciones de AChRs en la postsinapsis (Figura 6B, panel derecho). A los 14 días de recambio, la señal de BTX-2 fue abundante y cercana a los límites de saturación del canal rojo (Figura 6B, panel medio 14d), mientras que la señal de BTX-1 fue escasa, pero aún detectable (Figura 6B, panel izquierdo 14d). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia promedio para cada BTX en los dominios postsinápticos en los distintos tiempos de recambio (Figura 6C) mostró una pérdida del ~50% en la tinción de BTX-1 a los 14 días de recambio (Figura 6C, BTX-1), mientras que la incorporación de AChRs “nuevos” fue gradual durante los primeros 7 días de recambio, incrementando casi 3 veces hacia los 14 días (Figura 6C, BTX-2). Con la medición de estos valores fue posible analizar el grado de recambio de AChRs dentro de cada estructura postsináptica, calculado como la razón en la intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 (Figura 6D). Se observó que a medida que incrementa el tiempo de recambio, la relación BTX-2/BTX-1 va incrementando, alcanzando su máximo valor a los 14 días de recambio ($1,90 \pm 0,12$), lo que es consistente con la coloración mayoritariamente roja de las estructuras postsinápticas en este tiempo de análisis. A partir de estos resultados, se determinó 7 días como una ventana de tiempo óptima para la detección cuantitativa en el incremento o disminución del recambio de AChRs como medida de estabilidad del dominio postsináptico.

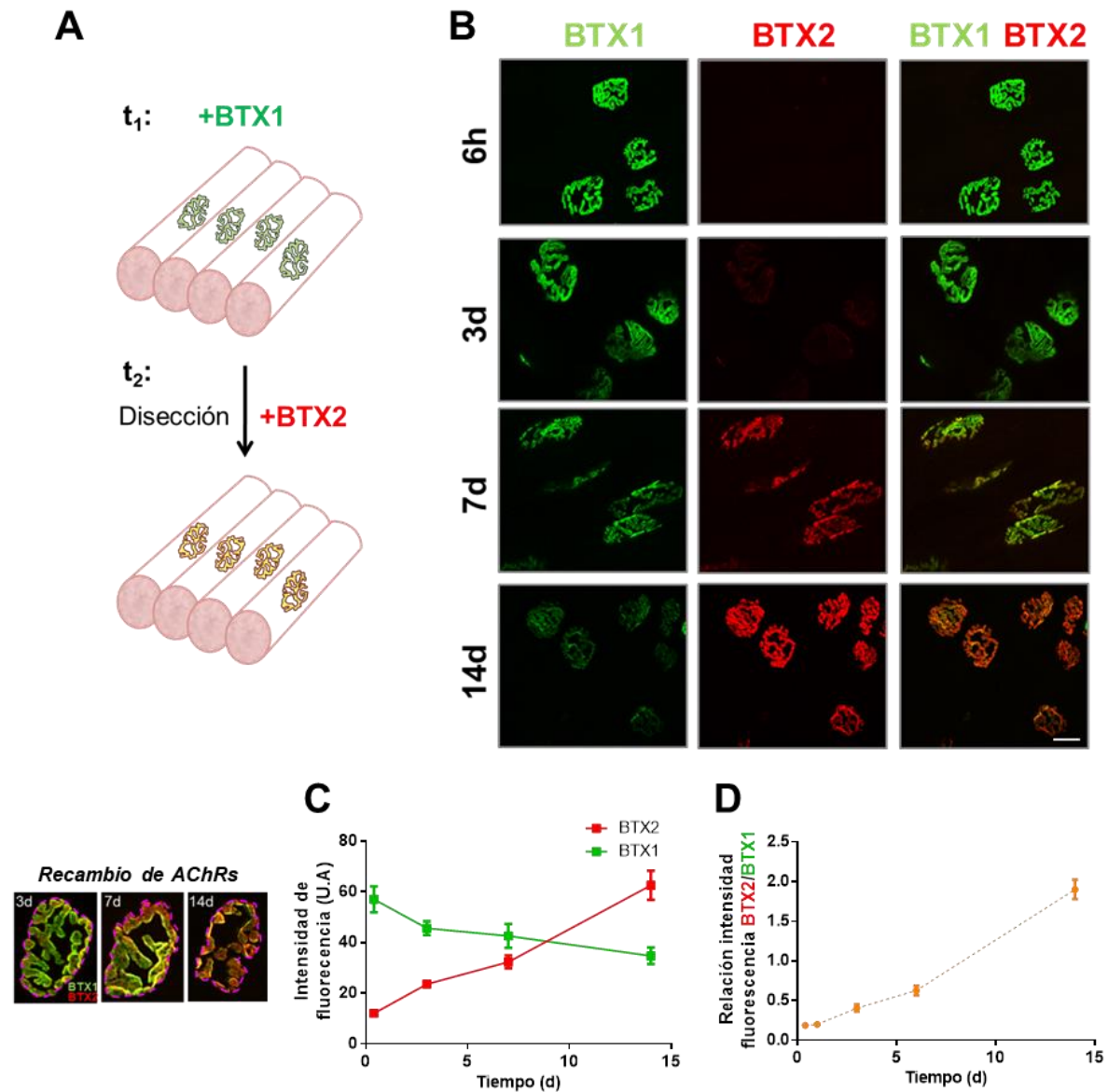


Figura 6: Análisis del recambio de AChRs a través del tiempo.

(A) Esquema indicando la ventana de tiempo entre el marcaje con BTX-1 y BTX-2, los cuales fueron desde las 6 horas hasta los 14 días. (B) Imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran la señal respectiva para BTX-1 (verde), BTX-2 (roja) o en conjunto (BTX-1 BTX-2) en los distintos tiempos de análisis. Barra; 20 μ m. (C) La intensidad de fluorescencia promedio para cada BTX dentro de las estructuras postsinápticas fue medida utilizando el programa Image-J y graficada como el promedio \pm SEM. (D) Se calculó la relación en la intensidad de fluorescencia entre 555/488-BTX para los distintos tiempos de análisis, los que fueron graficados como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. Se cuantificaron 25-50 sinapsis para cada tiempo.

La observación cualitativa de aparatos postsinápticos sugiere que la incorporación de los AChRs nuevos no es homogénea en el plano de la placa motora, sino que se torna más evidente hacia la periferia, particularmente en los intervalos de tiempo más prolongados de recambio de AChRs (Figura 6C). Para cuantificar esta tendencia, cada placa motora se subdividió en cinco regiones concéntricas, donde se determinó la razón de intensidad BTX-2/BTX-1 para cada segmento (Figura 7A). Los análisis indicaron que en la ventana de tiempo de 1 día, la razón BTX-2/BTX-1 promedió $0,18 \pm 0,10$ en toda la placa motora (Figura 7A, línea naranja). A su vez, el grado de recambio luego de 7 días fue variable, donde su mayor valor fue $\sim 0,9$ en la periferia (segmento 1), disminuyendo a $\sim 0,7$ en el centro de cada estructura postsináptica (segmento 5). La tasa de recambio alcanzó su máximo luego de 14 días, donde las magnitudes de la razón BTX-2/BTX-1 fueron $\geq 1,9$ en los dos segmentos más periféricos (segmentos 1 y 2) y alrededor de 1,7 tanto en la región media (segmento 3) como la central (segmentos 4 y 5) de la placa motora, respectivamente (Figura 7A, línea gris). Por su parte, observamos que el recambio de los AChRs dentro de cada rama del aparato postsináptico también fue alterado progresivamente (Figura 7B). La cuantificación de la relación de intensidad de BTX-2/BTX-1, ya sea en la periferia o en el centro de cada rama, mostró que mientras la razón BTX-2/BTX-1 fue $\sim 0,2$ en todos los segmentos de una rama luego de 1 día, un incremento pronunciado en los AChRs nuevos ocurrió en el centro de las ramas (segmento 3), donde la razón BTX-2/BTX-1 alcanzó valores cercanos a 0,9 (Figura 7B). Cuando el recambio de los AChRs de superficie fue analizado en una ventana de tiempo de 14 días, las ramas centrales exhibieron un recambio de AChRs incrementado, con valores de $1,62 \pm 0,51$ (segmento 2) y $1,76 \pm 0,59$ (segmento 3), respectivamente. Por lo tanto, nuestros análisis muestran que a medida que incrementa el intervalo de tiempo, el recambio progresivo de los AChRs ocurre de manera compartimentalizada, donde los AChRs nuevos se incorporan tanto como un patrón diferencial en el plano de la placa motora, como también dentro de las ramas de las estructuras tipo pretzel.

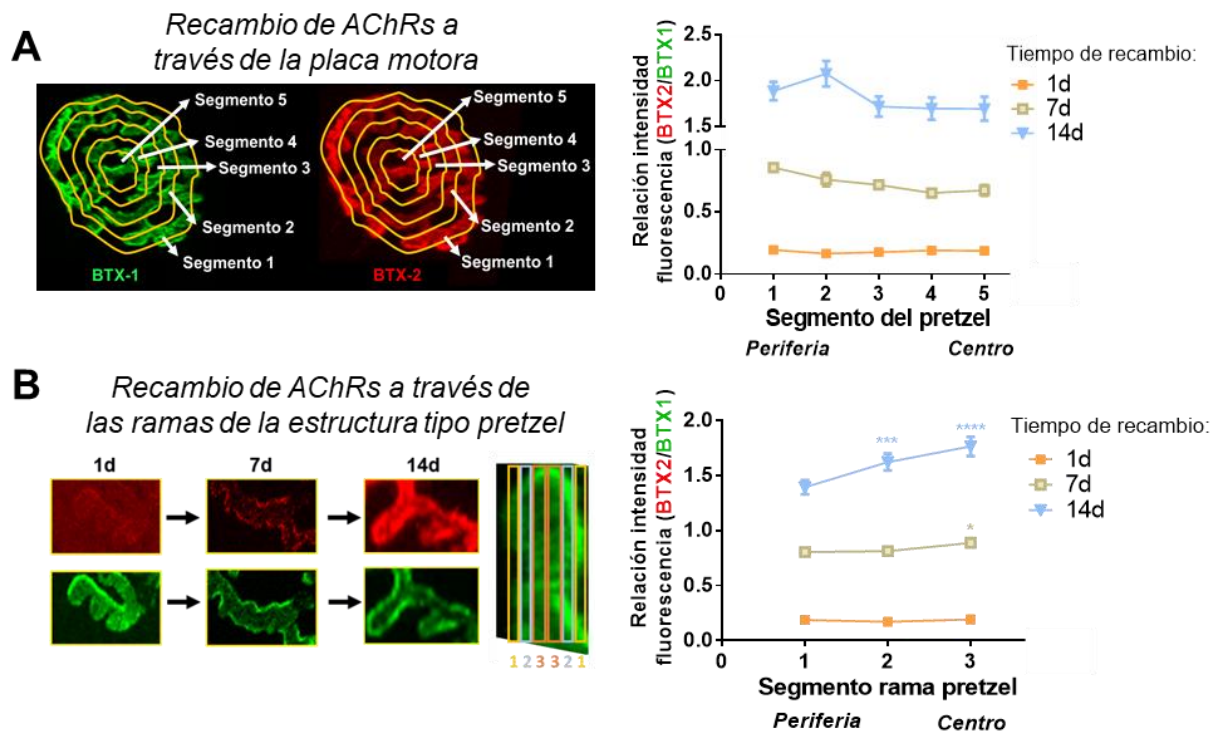


Figura 7: Análisis del recambio de AChRs por compartimentos en el dominio postsináptico.

(A) El recambio de AChRs por compartimentos fue determinado mediante la división de cada placa motora en cinco secciones concéntricas, donde se midió la intensidad de fluorescencia para BTX-1 y BTX-2 para cada una. El gráfico representa el promedio \pm SEM para el recambio de AChRs en cada segmento (1 a 5, desde la periferia al centro) de 10 placas motoras por animal. (B) El recambio de AChrs dentro de cada rama de la estructura tipo pretzel fue analizada en tres ramas de cada pretzel, localizándose en la región periférica, media y central de la estructura postsináptica respectivamente. Cada rama fue posteriormente seccionada en los segmentos periféricos (1, amarillo), medio (2, gris) o central (3, naranja). La razón en la intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 fue cuantificado y graficado. El gráfico representa el valor del promedio \pm SEM para cada segmento de la rama obtenido desde 30 ramas del pretzel por animal. $n = 2$ (14d) y $n = 3$ (6h-7d). ANOVA de una vía seguido de la comparación múltiple de Tukey se realizó para cada tiempo. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ cuando el segmento de la rama media (2) o central (3) fue comparada con el segmento de la periferia (1).

Existen distintos eventos que afectan negativamente la estructura y funcionalidad de la sinapsis neuromuscular, con impacto directo sobre la maquinaria postsináptica. Considerando que a los 7 días de recambio se observó una intensidad de fluorescencia relativamente similar entre BTX-1 y BTX-2 (Figura 6B), se procedió a evaluar con esta ventana de tiempo, la dinámica de los AChRs en una situación de daño a esta sinapsis.

1. La denervación resulta en la desorganización de los AChRs en el dominio postsináptico.

Para generar la denervación de los aparatos postsinápticos, se realizó la resección del nervio facial tal como se describe en la Figura 8. El éxito del procedimiento para el largo plazo fue corroborado a través de la inmunotinción de los componentes pre- y postsináptico 60 días luego del daño, donde se observó una pérdida de tinción del perfil neuronal motor dentro de la región sináptica (yuxtapuesta a los AChRs en una condición control) (Figura 8A), indicando la denervación del dominio postsináptico. Por otra parte, el dominio postsináptico exhibió un cambio abrupto en la distribución de los agregados del AChR, donde la morfología tipo pretzel representativa de una unión neuromuscular madura control fue escasamente observada en las fibras musculares denervadas, encontrándose principalmente estructuras de AChRs con una morfología tipo placa (Figura 8A).

En estas condiciones de denervación, se evaluó la estabilidad de los AChRs utilizando el ensayo de doble BTX antes descrito (Figura 5). Con este fin, se marcaron los AChRs pre-existentes con BTX-1 luego de 53 días posteriores al daño al nervio. Luego de 7 días (60 días post-daño), los AChRs nuevos fueron teñidos con BTX-2. De forma consistente, los AChRs presentes en los músculos sin daño (contralateral) exhibieron un recambio cuya distribución en la tinción de BTX-1 y BTX-2 fue homogénea en la estructura tipo pretzel (Figura 8B).

Por otra parte, en los músculos denervados se observó que los AChRs presentes en las estructuras tipo placa, inducidas por la denervación, fueron altamente estables, debido a que presenta-

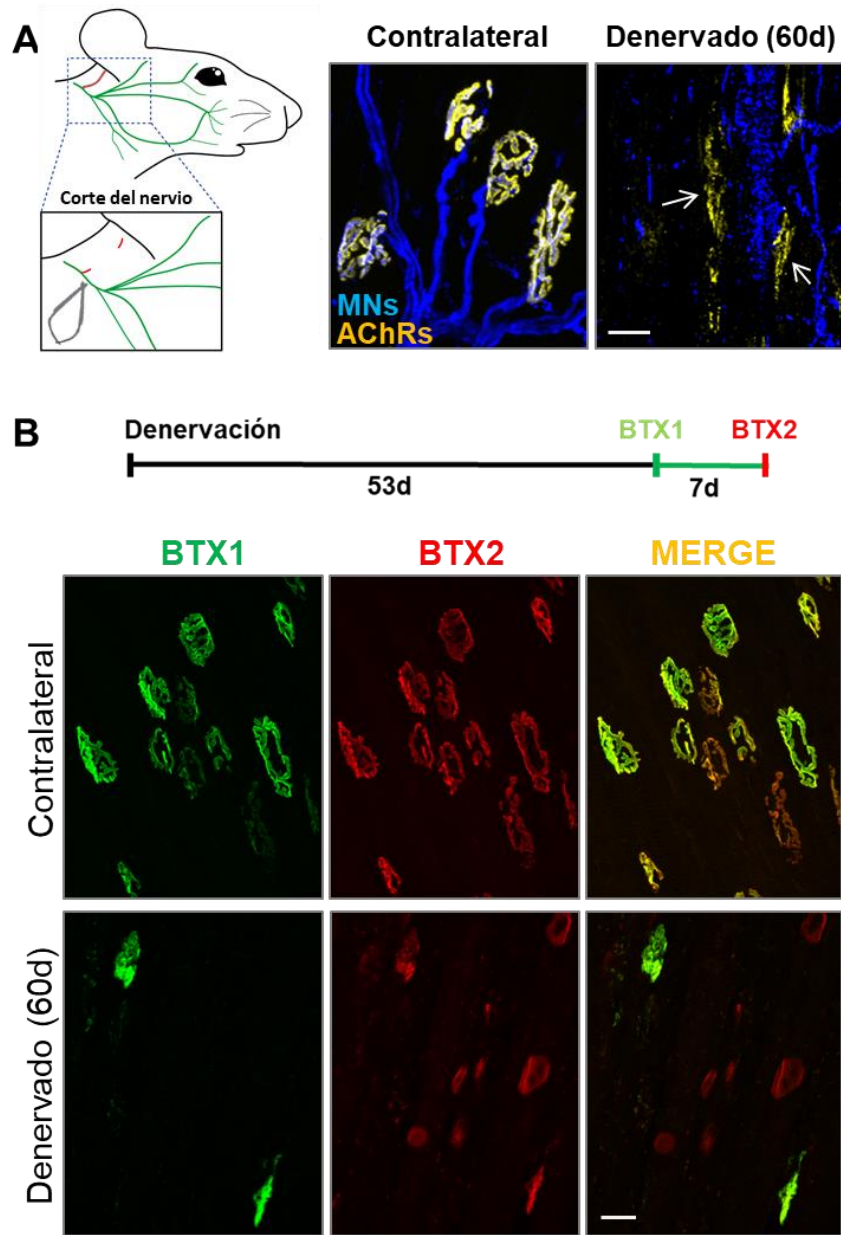


Figura 8: Análisis del efecto de la denervación a largo plazo sobre la morfología y estabilidad del dominio postsináptico.

(A) Esquema mostrando el procedimiento para la denervación del musculo LAL. Luego de 60 días, los músculos fueron disecados, fijados y se realizó inmunofluorescencia contra las motoneuronas (MNs, azul), mientras los AChRs fueron teñidos con α -BTX (amarillo). (B) Metodología para analizar la estabilidad de los AChRs luego del daño. Los AChRs pre-existentes fueron teñidos con BTX-1 (verde) y 7 días después, los AChRs nuevos fueron teñidos con BTX-2 (rojo). Las muestras se analizaron por microscopía confocal. Se realizaron 3 experimentos independientes. Barra: 20 μ m.

ron una tinción relativamente mayor para BTX-1 (Figura 8B, fila inferior). Así mismo, el cambio morfológico del dominio postsináptico también estuvo acompañado por la aparición de estructuras que fueron positivas solamente para BTX-2 (Figura 8, canal rojo), las que si bien exhibieron una morfología más compleja y redondeada que las placas, presentaron un menor tamaño que las estructuras tipo pretzel de un aparato postsináptico maduro sin daño (Figura 8B, fila superior). En base a estas observaciones, razonamos que es posible que luego de la denervación a largo plazo exista una desorganización de las estructuras postsinápticas, las que transitarían desde una morfología tipo pretzel a una morfología tipo placa. Además, la aparición de estructuras con una tinción positiva solo para BTX-2 es sugerente de que estas exhiben una estabilidad reducida en comparación a las estructuras tipo placa localizadas en el mismo campo. Dado que existe un patrón diferenciado en la estabilidad de los AChRs presentes en las estructuras postsinápticas inducidas por la denervación a largo plazo, se evaluó si existe una relación entre la estabilidad de los AChRs y el cambio morfológico del dominio postsináptico luego del daño.

2. La pérdida en la estabilidad de los AChRs precede al desmantelamiento del dominio postsináptico inducido por la denervación.

Para estudiar el detalle de la transición desde una estructura postsináptica tipo pretzel a una estructura tipo placa, se procedió a reducir los tiempos de denervación. El análisis del recambio de los AChRs ($t_0 \rightarrow t_1$ entre BTX-1 y BTX-2 se mantuvo en 7 días) se llevó a cabo en músculos donde el daño al nervio había transcurrido durante 1, 3, 7 ó 15 días (Figura 9A). Los análisis muestran que tan temprano como 1 día luego del daño al nervio, se gatilló la pérdida en la estabilidad de los AChRs, evidenciada por un incremento en el recambio de estos receptores en la estructura postsináptica (Figura 9B), lo que conllevó a una mayor señal de BTX-2 sobre BTX-1 en una misma estructura

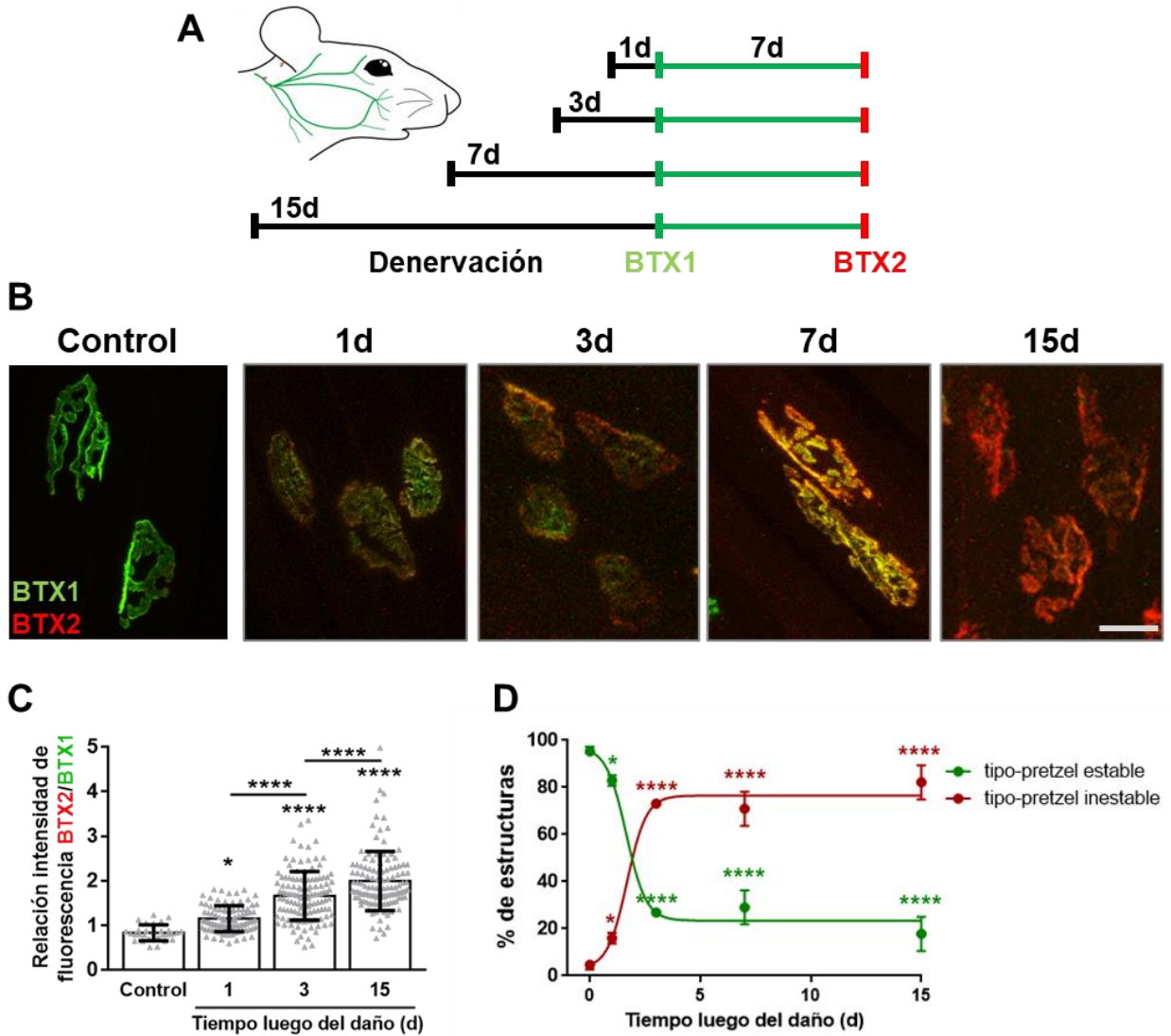


Figura 9: Análisis del efecto de la denervación sobre la estabilidad de los AChRs en el dominio postsináptico.

(A) Metodología para analizar la estabilidad de los AChRs luego de distintos tiempos de denervación. Los AChRs pre-existentes fueron teñidos con BTX-1 y 7 días después, los músculos fueron colectados, fijados y los AChRs nuevos fueron teñidos con BTX-2. (B) Visualización por microscopía confocal del marcaje de BTX-1 (verde) y BTX-2 (rojo). Barra: 20 μm . (C) El recambio de los AChRs fue cuantificado a través de la relación de intensidad de fluorescencia entre BTX-2 y BTX-1. (D) De acuerdo a la coloración adquirida, las estructuras tipo-pretzel fueron clasificadas como estables (mayoritariamente verde) o inestables (amarillo/rojo). Se graficó el promedio \pm SD para (C) y \pm SEM para (D) sobre 3 experimentos independientes. **** $p < 0,0001$; * $p < 0,05$ tras realizar ANOVA de una vía (C) o test-t (D).

(Figura 9C), indicando estructuras postsinápticas inestables (Figura 9D). Este efecto se acentuó a mayores rangos de tiempo de denervación, pues desde los 3 hasta los 15 días luego del daño se observó un incremento sostenido en la inestabilidad de los AChRs ($>$ BTX-2/BTX-1) (Figura 9B). Cuantitativamente, la inestabilidad postsináptica alcanzó su máximo cuando el recambio fue evaluado 15 días luego del daño, observándose en promedio el doble de señal de BTX-2 en relación con la intensidad de BTX-1 (Figura 9C), comparado con el músculo contralateral sin denervar, donde la relación BTX-2/BTX-1 alcanzó valores cercanos a 0,8 (Figura 9C). Además, a medida que incrementó el tiempo de denervación, también incrementó progresivamente el porcentaje de estructuras postsinápticas inestables en las fibras musculares (Figura 9D), evidenciado por los análisis realizados 3 ó 7 días luego del daño, lo que mostraron valores de $\sim 70\%$, mientras que a los 15 días este valor superó el 80% (Figura 9D).

De forma interesante, el cambio en la estabilidad de los AChRs estuvo acompañado por cambios morfológicos dinámicos en las estructuras postsinápticas luego del daño. En este contexto, si bien 1 día luego del daño se distinguieron estructuras con una morfología tipo-pretzel similar a la situación control (Figura 10, “1 día”), los AChRs presentes en estos dominios postsinápticos exhibían en promedio una menor estabilidad (Figura 9C, 11A). Sin embargo, al iniciar el análisis de recambio 3 días luego del daño al nervio se comenzó a observar un colapso de los dominios postsinápticos, caracterizado por un marcado enriquecimiento de AChRs marcados con BTX-1 en el centro de estas estructuras (Figura 10, “3 días”), mientras que la incorporación de AChRs nuevos (BTX-2) se observó preferentemente en la periferia de las estructuras postsinápticas denervadas, donde no siempre pre-existían AChRs (teñidos con BTX-1) (Figura 10 y Figura 11B). Similares estructuras colapsadas también fueron observadas a los 7 días, (Figura 10, “7 días”), donde además se evidenció la pérdida en la integridad de las estructuras con morfología-tipo pretzel (Figura 10, “7 días”). Cuando el análisis del recambio de los AChRs inició 15 ó 30 días luego del daño, los AChRs pre-existentes exhibieron un patrón similar a la estructura tipo placa observada 60 días luego del daño (Figura 10, Figura 8);

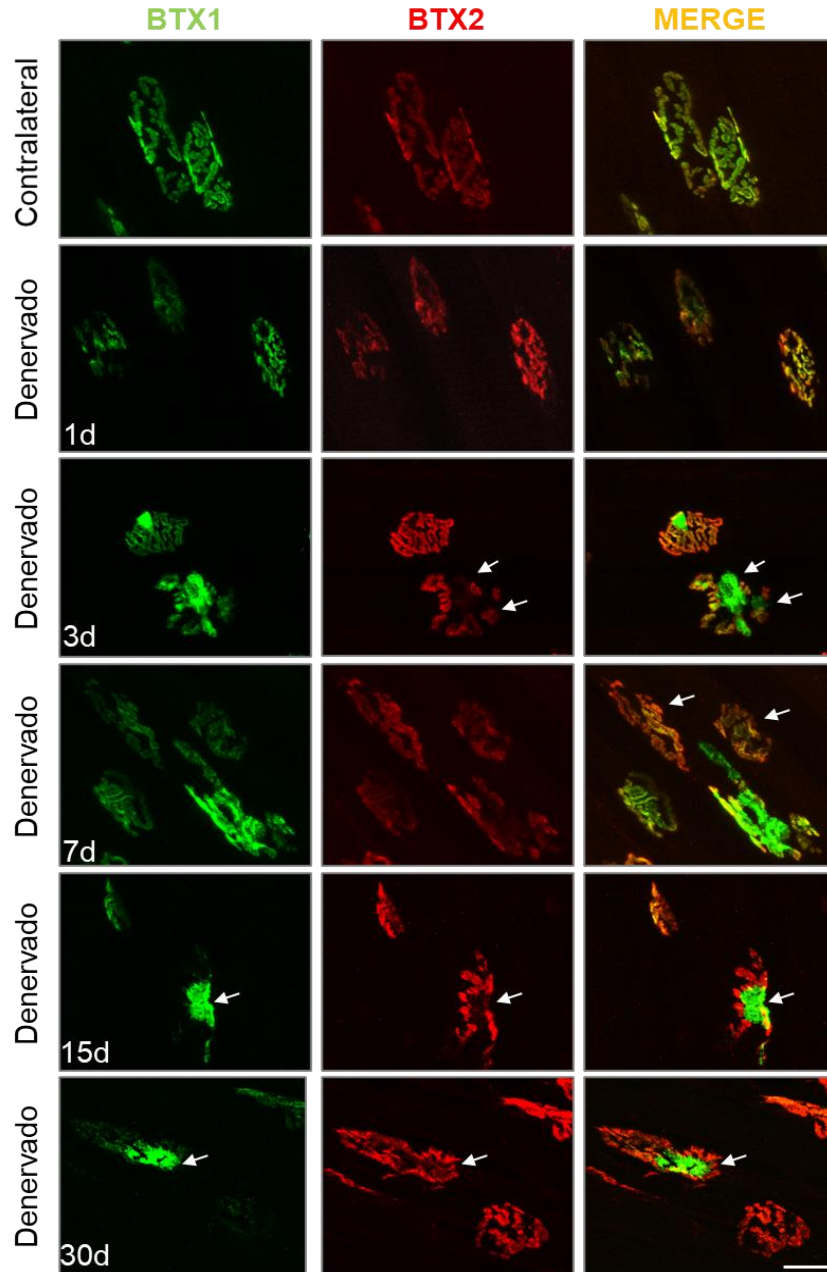


Figura 10: Análisis del efecto de la denervación sobre la morfología del dominio postsináptico.

El músculo LAL fue denervado mediante el corte de un segmento del nervio facial, donde 1, 3, 7 o 15 días luego del daño, los AChRs pre-existentes fueron teñidos con BTX-1 (verde). Luego de 7 días, los músculos fueron disecados, fijados y los AChRs incorporados en la superficie fueron teñidos con BTX-2 (rojo) y las muestras fueron visualizadas por microscopía confocal. Flechas en 3 y 15d indican la incorporación de AChRs en la periferia de la estructura postsináptica, mientras que las flechas en 7d indican la pérdida en la organización morfológica tipo pretzel. (N=3). Barra: 20 μ m.

sin embargo, estas estructuras incorporaron nuevos AChRs en su periferia (Figura 10, “15, 30 días”). Estos análisis sugieren que la denervación induce la aparición de distintos compartimentos dentro de las estructuras postsinápticas. Por una parte, un compartimento donde se posicionan los AChRs pre-existentes cuyo colapso inhibe la dinámica de los AChRs, y otro compartimento con mayor integridad morfológica, donde se promueve la dinámica de los AChRs a través de su recambio.

Con el fin de cuantificar la abundancia de las distintas estructuras postsinápticas generadas por la denervación, ellas fueron clasificadas como: *i)* pretzel estable; *ii)* pretzel inestable y *iii)* estructura colapsada (Figura 11D). Se observó que en ausencia de daño al nervio, la mayoría de las estructuras presentaban una morfología pretzel estable (es decir una mayor tinción de BTX-1 sobre BTX-2). Sin embargo, el valor de estas estructuras se redujo a un ~40% cuando el recambio de los AChRs fue analizado 1 día luego del daño al nervio (Figura 11C), tendencia que aumentó concomitante al tiempo de denervación (Figura 11C). Por su parte, en este tiempo de análisis, la abundancia de estructuras inestables incrementó de forma abrupta, alcanzándose valores del ~50% del total de estructuras (Figura 11C). Es relevante destacar que a medida que transcurrió el tiempo de denervación (3, 7 y 15 días luego del daño), no existió un incremento significativo en el porcentaje de estructuras inestables, sino que éstas se mantuvieron en un rango de ~50-60% (Figura 11C). Por otra parte, a diferencia de las estructuras inestables, la aparición significativa de estructuras postsinápticas colapsadas se alcanzó 3 días luego del daño, cuya abundancia del ~30% fue mantenida tanto a los 7 como 15 días luego del daño. Dicho comportamiento fue completamente diferente en la denervación a largo plazo (60 días), pues se observó una sutil abundancia tanto de estructuras estables como inestables, mientras que la gran mayoría correspondió a estructuras colapsadas en forma de placa (Figura 11C).

En conjunto, estos resultados indican que la denervación genera la co-existencia de estructuras postsinápticas que varían tanto en morfología como en estabilidad y que su abundancia es dependiente del tiempo de denervación. Más aún, previo a que los dominios post-sinápticos sufran

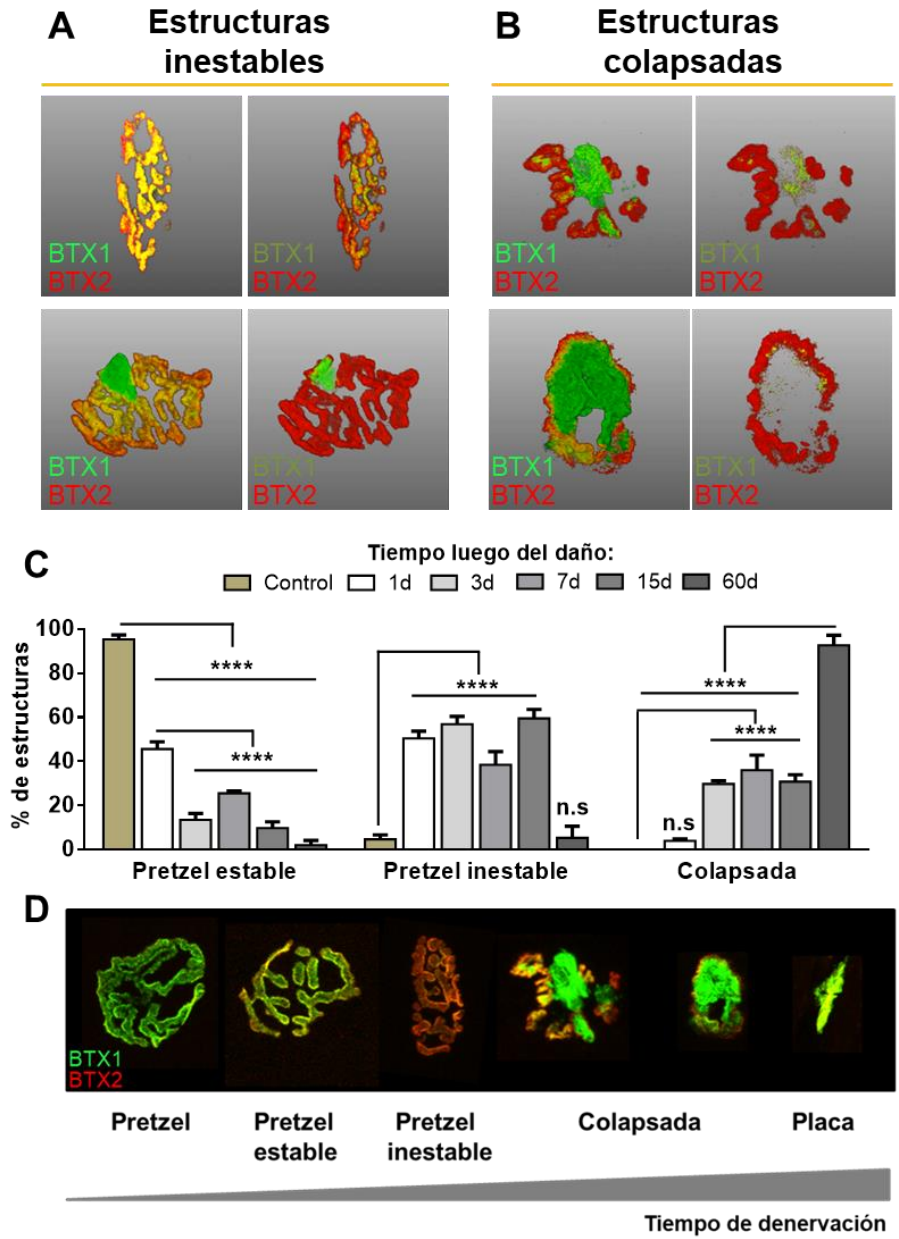


Figura 11: Análisis de los tipos de estructuras postsinápticas generadas por la denervación.

Los dominios postsinápticos denervados fueron procesados utilizando el software IMARIS®, representándose estructuras (A) inestables, caracterizadas por una mayor tinción de BTX-2 sobre BTX-1 y (B) colapsadas, donde la señal de BTX-1 se concentra al centro de estas. (C) El porcentaje de abundancia de estas estructuras en las fibras musculares denervadas fue calculado y graficado como el promedio \pm SEM. **** $p < 0,0001$ al utilizar test ANOVA doble vía. (D) Representación de las estructuras postsinápticas generadas durante el transcurso de la denervación (desde 1 a 60 días luego del daño al nervio) en base a tres experimentos independientes.

cambios morfológicos drásticos, desde un pretzel hacia una placa, estos exhiben una pérdida en la estabilidad de los AChRs de superficie que los componen (Figura 11D).

3. La denervación genera compartimentos en las estructuras postsinápticas, donde las subpoblaciones de AChRs se localizan de manera diferencial.

Considerando el hallazgo que muestra que las estructuras colapsadas exhibieron una diferencia notoria entre la localización central de los AChRs pre-existentes (marcados con BTX-1, verde en Figura 11B) en comparación a la ubicación periférica de los AChRs nuevos (marcados con BTX-2, rojo en Figura 11B), se exploraron las propiedades que presentan dichas estructuras denervadas para generar el recambio diferencial de los AChRs (Figura 12).

Con este fin, se utilizó la lectina extraída de la planta *Vicia villosa* (VVL), la cual se une a los sacáridos de N-acetil-d-galactosamina presentes específicamente en la lámina basal del espacio sináptico en la unión neuromuscular. Dado que la matriz extracelular del espacio sináptico es más resistente a los cambios morfológicos generados por estímulos externos, la VVL ha sido utilizada como indicador de la ubicación original de esta sinapsis, previo a su desorganización (Martínez-Pena et al., 2015; Scott et al., 1988). Así, las estructuras postsinápticas denervadas fueron marcadas inicialmente con BTX-1 (Alexa647-BTX, pseudocolor verde); luego de 7 días, las sinapsis se marcaron con VVL-fluoresceína (pseudocolor blanco) en conjunto con BTX-2 (Alexa555-BTX, color rojo). Los análisis por microscopía confocal revelaron que en la situación control, VVL marcó de forma robusta los aparatos postsinápticos, con un perfil específico hacia el borde de estas estructuras, circundando el marcaje de BTX-1 y BTX-2 (Figura 12A). Sin embargo, esta distribución se observó alterada en las fibras musculares denervadas, donde se distinguieron regiones dentro de los dominios postsinápticos en que la señal de VVL era escasa o prácticamente inexistente (flechas en Figura 12A).

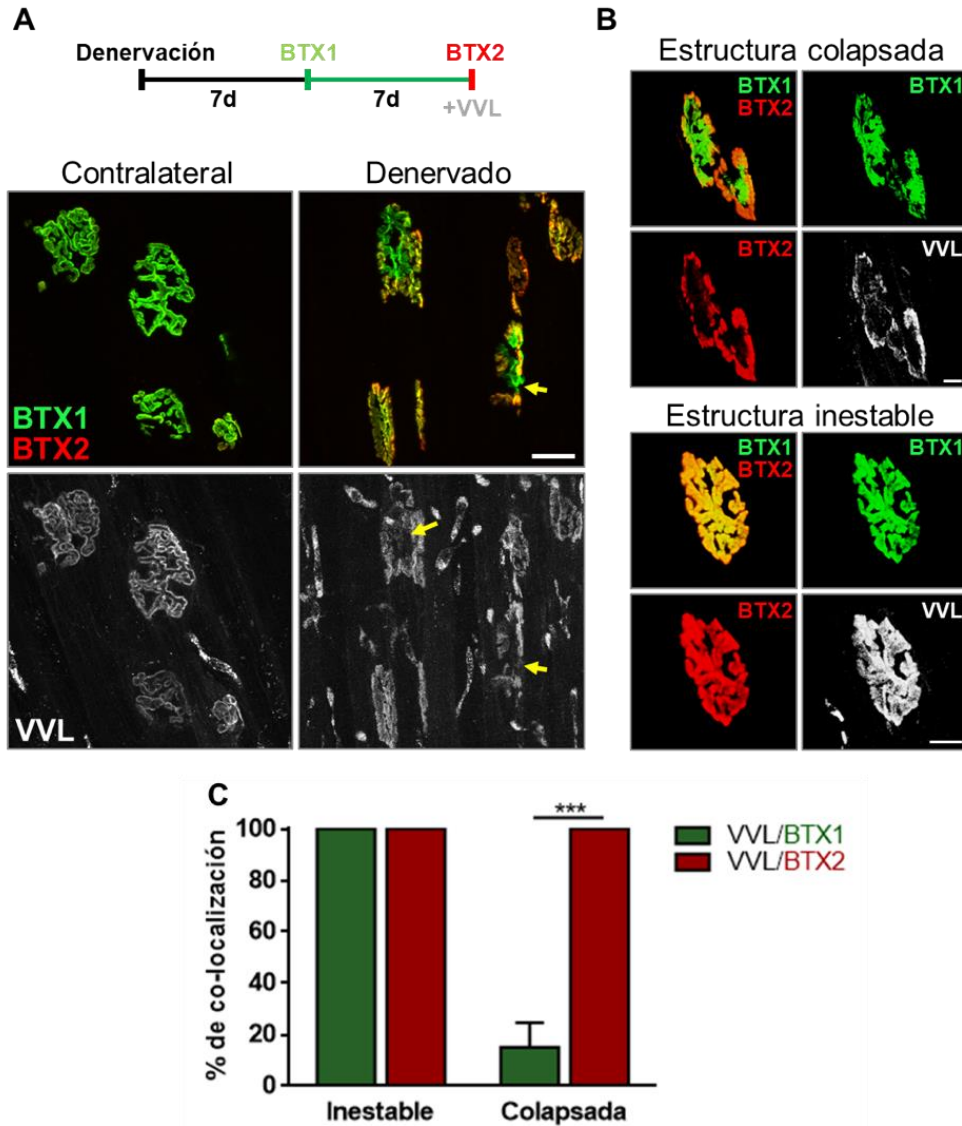


Figura 12: Análisis de los compartimentos donde se localizan las subpoblaciones de AChRs en los dominios postsinápticos denervados.

(A) Después de 7 días desde el daño al nervio, los AChRs pre-existentes fueron teñidos con BTX-1 (verde) *in vivo* y luego de 7 días, los dominios postsinápticos fueron teñidos con BTX-2 (rojo) y la lectina de *Vicia villosa* (VVL, blanco). Las muestras fueron procesadas y analizadas mediante microscopía confocal. Barra: 20 μm . (B) Se indica la distribución de VVL, BTX-1 y BTX-2 en estructuras denervadas inestables y colapsadas. Barra: 10 μm . (C) La distribución del marcaje de VVL en relación con el marcaje de BTX-1 o BTX-2 dentro de las estructuras postsinápticas denervadas fue cuantificado y graficado como el promedio \pm SEM al analizar 20-25 sinapsis por condición. *** $p < 0,001$ al comparar los valores utilizando el test-t.

En este contexto, el tipo de estructura que presentó este patrón diferencial de marcaje con VVL fueron solo las estructuras denervadas colapsadas, no así las estructuras inestables (Figura 12B). Más aún, los análisis en detalle de las estructuras colapsadas indicaron que el marcaje con VVL fue excluyente de la región con marcaje preferencial de BTX-1 (Figura 12B), concentrándose en los subdominios de los dominios postsinápticos colapsados donde se localizó la señal de BTX-2 (Figura 12B). La distribución diferencial entre VVL y las distintas BTXs fue cuantificada, obteniéndose que todas las estructuras inestables (las que mantienen su morfología tipo-pretzel) exhibieron una distribución similar entre las señales de VVL, BTX-1 y BTX-2 (Figura 12C). Por otra parte, al analizar las estructuras colapsadas, se obtuvo que el porcentaje de estructuras que presentaron una similitud entre la distribución de VVL y BTX-1 se redujo a un $15,0 \pm 9,6\%$ (***) $p < 0,001$, test-t), mientras que todas las estructuras colapsadas exhibieron una distribución similar entre VVL y BTX-2 (Figura 12C). Estos resultados sugieren que la denervación genera la aparición de una nueva compartimentalización en las estructuras postsinápticas, la que podría ser causal de la marcada distribución diferencial de AChRs. A medida que las estructuras postsinápticas colapsan, en estas nuevas regiones: *i*) los AChRs pre-existentes se concentran; *ii*) los AChRs disminuyen su recambio y *iii*) aparecen zonas que carecen de componentes propios de la sinapsis neuromuscular.

4. Los AChRs que componen las estructuras postsinápticas denervadas exhiben recambio y reciclaje localizado de manera diferencial.

Una vez que son internalizados, los AChRs de la superficie postsináptica presentan dos posibles destinos: la degradación en compartimentos liso/autolisosomales o el reciclaje y retorno al sarcolema (Rudolf and Straka, 2019). Esta última propiedad ha sido previamente identificada a través de una aproximación *in vivo* que consta de una preincubación con BTX-biotina (que se une a los AChRs de superficie) seguida de una incubación con Alexa488-estreptavidina para formar un complejo AChRs/BTX-biotina/488-estreptavidina (AChR/BTX-B/Strep1) que se deposita sobre la

población de AChRs pre-existentes (Figura 13A). Una vez que el complejo AChR/BTX-B/Strep1 es internalizado (en compartimentos de reciclaje), este pierde la unión de Alexa488-estreptavidina. Así, una vez que dichos receptores (con sitios libres de unión a biotina) retornan a la superficie, ellos pueden ser marcados e identificados con Alexa555-estreptavidina, formando un complejo AChR/BTX-B/Strep2 (Figura 13A) que se deposita sobre los AChRs reciclados (Bruneau et al., 2005; Bruneau and Akaaboune, 2006). A través de esta aproximación, se evaluó el comportamiento de los AChRs dentro de las estructuras postsinápticas denervadas, tanto las que preservan una morfología tipo-pretzel, como las estructuras que exhiben colapso morfológico. Con este fin, 3 días luego de inducir la denervación a través del corte del nervio facial, los AChRs que se encontraban en la superficie fueron marcados *in vivo* con BTX-Biotina (BTX-B) seguido de la tinción con Alexa488-estreptavidina (Strep1). Una vez transcurridos 3 días desde el primer marcaje, los AChRs que se internalizaron y luego reciclaron a la superficie fueron detectados con Alexa555-estreptavidina (Strep2). A su vez, los AChRs que se incorporaron *de novo* a la superficie fueron detectados a través del marcaje con BTX-2 (647-BTX) (Figura 13A)

En una condición control, los análisis por microscopía confocal indicaron una detección efectiva de las subpoblaciones de AChRs que reciclan como también las incorporadas *de novo* en la superficie (Figura 13B, rojo y azul respectivamente), las cuales adquirieron un patrón de distribución similar a la subpoblación de AChRs de superficie inicial (Figura 13B, verde). Sin embargo, al analizar las estructuras postsinápticas denervadas, se observó un incremento en el grado de reciclaje de los AChRs en las estructuras tipo-pretzel (evidenciado por la señal aumentada de Strep2), cuyo patrón de distribución fue homogéneo y generó estructuras tipo pretzel de coloración amarilla (Figura 13C). En contraparte, al analizar la localización de los AChRs nuevos (BTX-2, color azul), si bien estos se distribuyeron a través de toda la estructura tipo-pretzel, existió también una preferencia en la localización hacia la periferia de las estructuras (Figura 13C, superposición de imágenes). De manera interesante, este fenómeno se acentuó en las estructuras colapsadas, donde se observó que la señal de

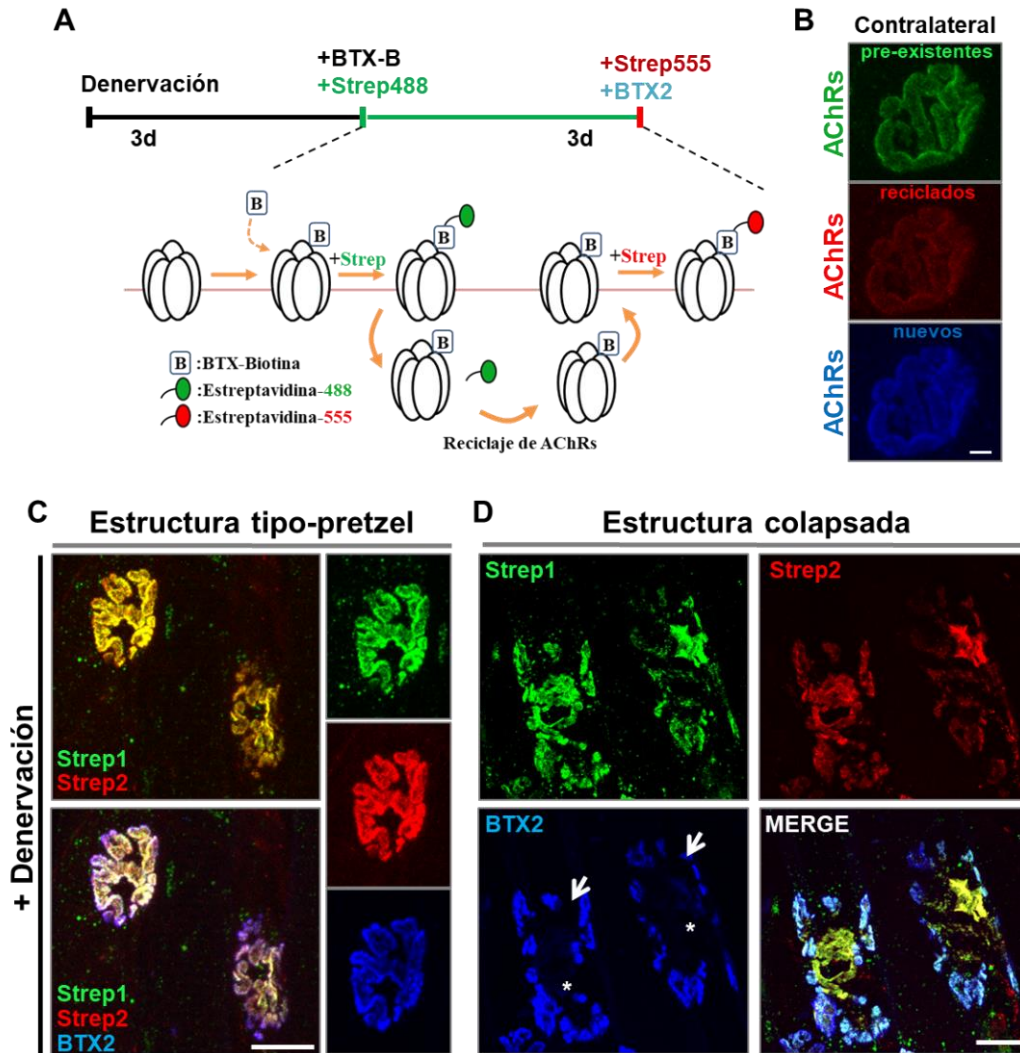


Figura 13: Análisis del reciclaje y recambio de los AChRs que componen los dominios postsinápticos denervados.

(A) Aproximación experimental para analizar el reciclaje de AChRs en la sinapsis neuromuscular. Mediante una inyección *in vivo* con BTX-biotina y una subsecuente incubación con estreptavidina-488 (Strep1, verde) se tiñeron los AChRs pre-existentes. Luego, estos pierden su unión a Strep1 al internalizarse, lo que permite su detección al llegar nuevamente a la superficie con la tinción de estreptavidina-555 (Strep2, rojo). (B) Los AChRs pre-existentes, reciclados o nuevos se detectaron mediante microscopía confocal. Barra: 5 μm . (C) Se analizó el reciclaje y recambio de los AChRs 3 días luego del daño al nervio en las subpoblaciones de AChRs localizadas en estructuras postsinápticas con morfología de pretzel o en (D) estructuras colapsadas. Los asteriscos denotan una región carente de tinción para BTX-2 (i.e. zona con bajo recambio de AChRs). Las flechas denotan la distribución periférica del recambio de AChRs. Barra: 20 μm .

Strep2 (rojo) de los AChRs reciclados se concentró hacia el centro de las estructuras colapsadas, con un menor grado de tinción hacia la periferia (Figura 13D, canal rojo). A su vez, el marcaje de los AChRs pre-existentes (Strep1, verde) se distribuyó tanto en el centro como en la periferia de los dominios postsinápticos (Figura 13D), lo que indica que el proceso de reciclaje de AChRs procede de manera localizada. Consistentemente, el recambio de los AChR (BTX-2) se efectuó hacia la periferia de las estructuras colapsadas (flechas en Figura 13D), observándose regiones que carecen de señal para BTX-2 (Figura 13D, asteriscos). Más aun, las regiones centrales de las estructuras que carecen de BTX-2, fueron las que presentaron un reciclaje de AChRs incrementado, lo que generó una distribución diferencial tanto en las subpoblaciones de AChRs que reciclan, como en las que exhiben recambio (Figura 13D). Por lo tanto, en conjunto con los hallazgos previamente descritos, estos resultados sugieren que la denervación induce la aparición de compartimentos en las estructuras postsinápticas donde los AChRs presentan un tráfico celular diferenciado. Por un lado, el recambio de AChRs se concentra hacia la periferia de las estructuras postsinápticas, mientras que su reciclaje se produce mayoritariamente en la región central, en donde el dominio postsináptico se desorganiza.

5. Los AChRs en los dominios extrasinápticos exhiben un alto grado de recambio y reciclaje.

Una vez caracterizada la dinámica de las estructuras postsinápticas generada por la denervación a largo (Figura 8B) y a mediano plazo (Figura 14A), se evaluaron las propiedades que exhiben las estructuras que fueron positivas solamente para la tinción con BTX-2. Inicialmente, para analizar la aparición de estas estructuras en la superficie de la fibra muscular durante el transcurso de la denervación, se procedió a evaluar el recambio de AChRs mediante la tinción con BTX-1 y BTX-2 (rango de tiempo 7 días) en músculos donde el daño al nervio se había generado hace 1, 3, 15 y 53 días. La visualización por microscopía confocal permitió identificar principalmente 2 tipos de morfología para estas estructuras, las que fueron clasificadas como tipo-*cluster* o tipo-O, de acuerdo a si presentaban una distribución uniforme de los AChRs o carecían de AChRs en su centro, respec-

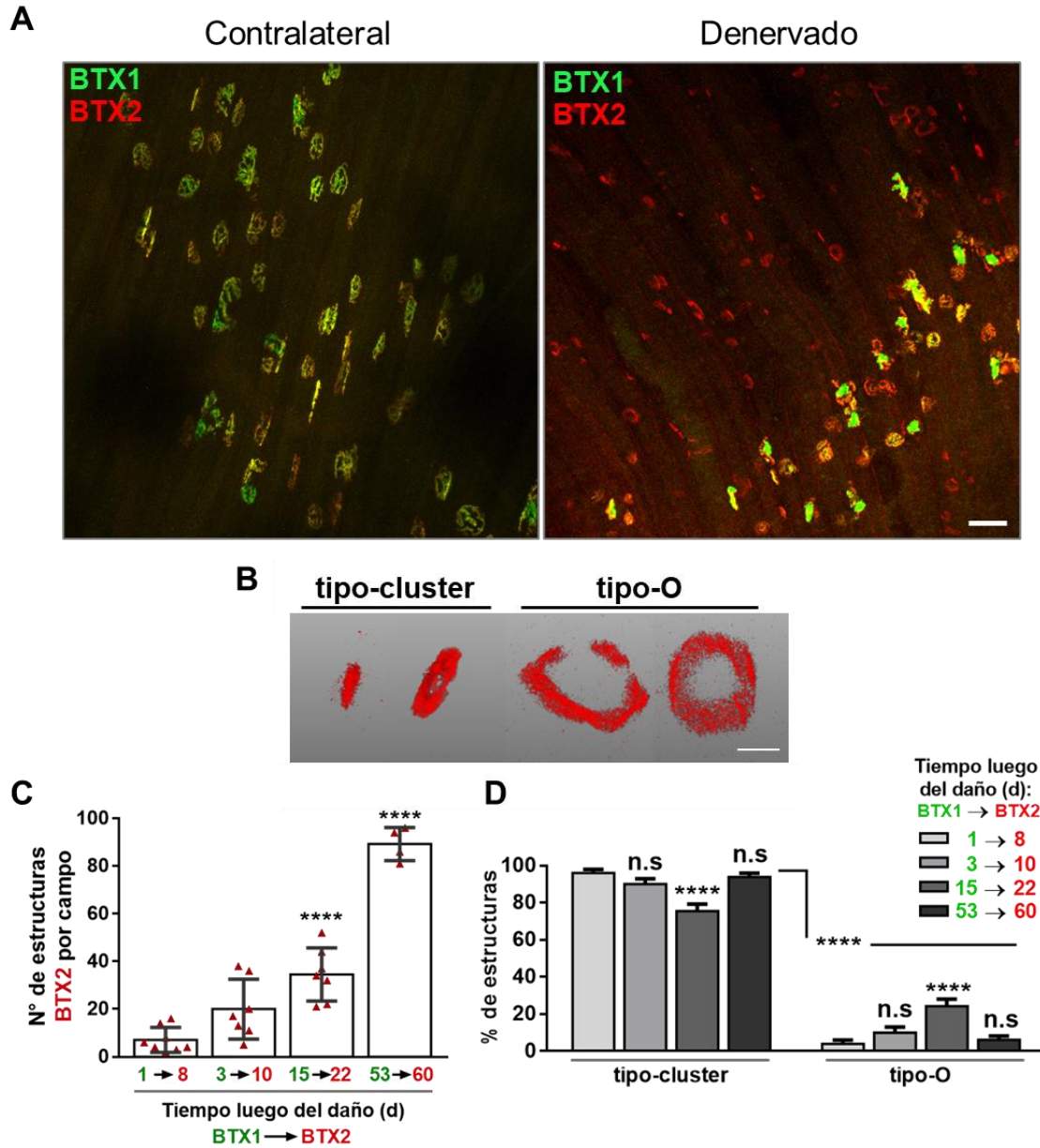


Figura 14: Análisis del número y tipo de estructura postsináptica positiva solo para 555-BTX.

(A) Imágenes obtenidas por microscopía confocal del músculo LAL sometido al análisis de recambio de AChRs iniciado 15 días luego del daño al nervio (BTX-1, verde) y concluido 7 días después (BTX-2, rojo). Barra: 50 μ m. Se destaca que en el músculo denervado, existen estructuras positivas solamente para BTX-2 (rojas), no así en el músculo contralateral. (B) Estas estructuras fueron procesadas por IMARIS y fueron clasificadas respecto a la distribución de los AChRs como tipo-*cluster* o tipo-O. Barra: 10 μ m. La cantidad (C) y el porcentaje (D) de estructuras en cada campo fue cuantificada a distintos tiempos post denervación. Los gráficos representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. **** $p < 0,0001$ al realizar ANOVA de (C) una o (D) dos vías.

tivamente (Figura 14B). La cuantificación indicó que fue posible detectar estas estructuras en todos los tiempos de denervación, con una abundancia que fue incrementando concomitante al tiempo de denervación (Figura 14C). A su vez, la morfología que presentaron las estructuras postsinápticas fue mayoritariamente de tipo-*cluster*, independiente del tiempo de análisis (Figura 14D). Si bien se observó que el porcentaje de las estructuras tipo-*cluster* fue disminuyendo a medida que transcurría la denervación desde 1 a 15 días (Figura 14D), esta tendencia se revirtió cuando se analizaron las estructuras postsinápticas presentes en las fibras musculares sometidas a una denervación a largo plazo (es decir, 60 días; Figura 14D). Contrariamente, las estructuras postsinápticas tipo-O, cuya abundancia fue menor, exhibieron un incremento en su porcentaje entre 1 y 15 días luego del daño; sin embargo, 60 días post-daño, su presencia fue muy escasa (Figura 14D). Esto indicaría que a medida que el dominio postsináptico se torna más inestable debido a la denervación, incrementa la aparición de estructuras positivas solamente para BTX-2.

La tinción positiva exclusivamente para BTX-2 podría ser indicativa de que ellas aparecen en la superficie posterior a la primera tinción con BTX-1, como también de que estas estructuras presentan una estabilidad reducida. Para resolver esta disyuntiva, se acortó la ventana de tiempo entre BTX-1 y BTX-2 a solo 1 día para el marcaje de los distintos AChRs en las fibras musculares denervadas (Figura 15A). De manera interesante, el análisis por microscopía confocal de la señal de BTX-2 representado en la Figura 15A mostró que además de agregados tipo-pretzel, también se identificaron agregados con morfología tipo-O (Figura 15A, canal rojo) los que, como resultado de la dismunicón del tiempo de análisis, también presentaron tinción positiva para BTX-1 (Figura 15A, canal verde). Este hallazgo fue confirmado por la superposición de imágenes, el que reveló que estas estructuras poseen un mayor índice de recambio que las estructuras tipo-pretzel. Así, es posible hipotetizar que las estructuras que fueron positivas solo para BTX-2 presentan una estabilidad reducida. Considerando su morfología y su localización en la fibra muscular, es factible proponer que dichos agregados del AChR corresponden a agregados ectópicos (no sinápticos) de los AChRs. Esta

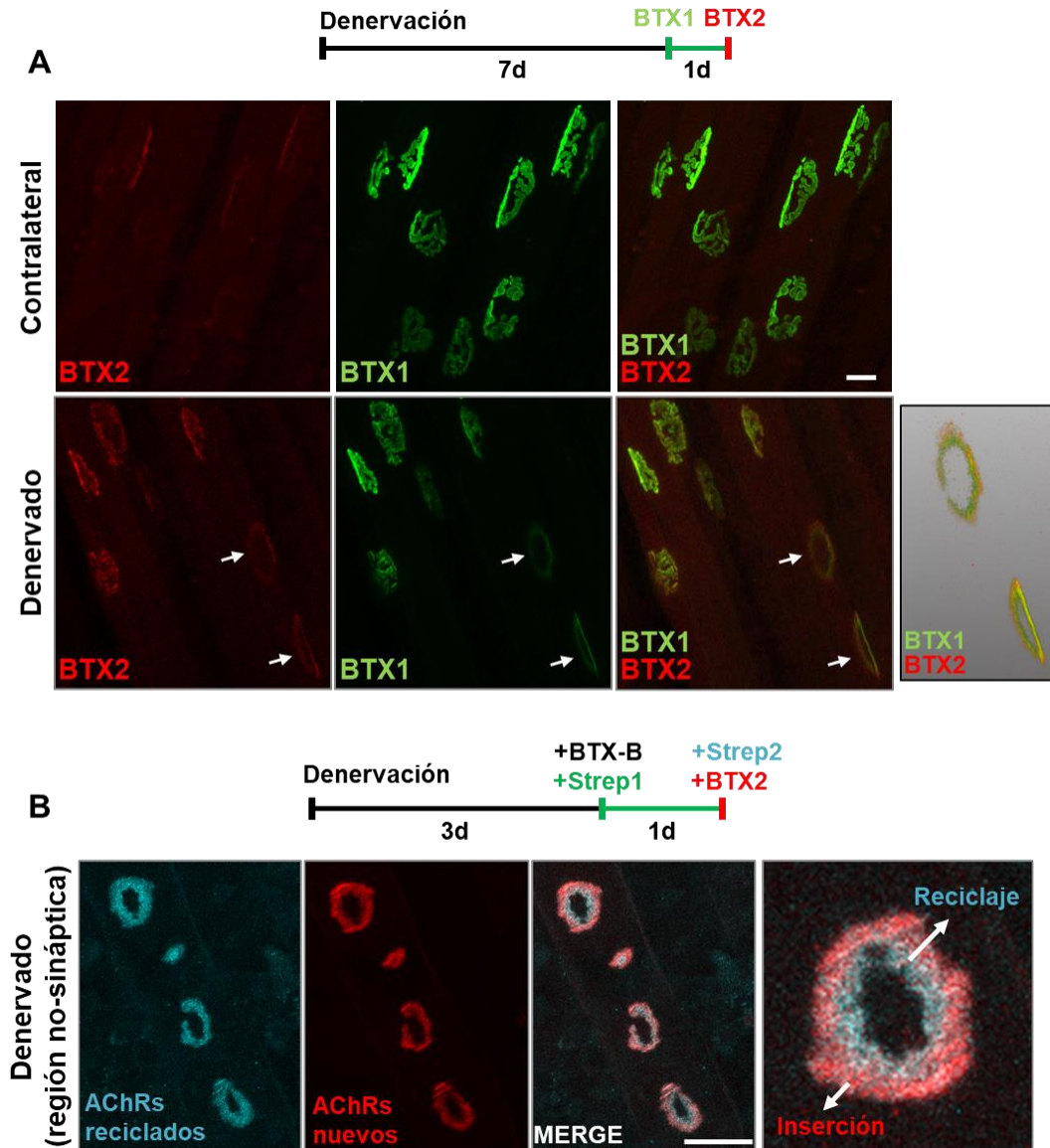


Figura 15: Análisis de la estabilidad y reciclaje de los AChRs en estructuras postsinápticas ectópicas.

(A) Para determinar la estabilidad de las estructuras ectópicas, los músculos denervados fueron sometidos al análisis de recambio de AChRs en una ventana de tiempo reducida (1 día entre BTX-1 y BTX-2). Las muestras fueron visualizadas por microscopía confocal. Barra: 20 μ m. (B) El reciclaje de los AChRs en estructuras ectópicas inducidas por la denervación fue evaluado por la incorporación de estreptavidina-555 sobre los AChRs de superficie previamente incubados con BTX-biotina y estreptavidina-488. La localización del recambio (rojo) y reciclaje (celeste) de los AChRs está representada en la magnificación a la derecha del panel. Barra: 20 μ m.

conjetura fue resuelta más adelante en el transcurso de este trabajo (ver Figura 32D).

Finalmente, otra propiedad que fue evaluada en las estructuras ectópicas fue la capacidad de reciclaje de los AChRs. Los análisis demostraron que estas estructuras no solo exhibieron un recambio acelerado de los AChRs, sino que en tan solo 1 día revelaron reciclaje de los AChRs, donde la subpoblación de AChRs reciclados se distribuyó marcadamente hacia el centro de estas estructuras (Figura 15B). Por lo tanto, la denervación induce la formación de estructuras postsinápticas ectópicas con estabilidad reducida, lo que se debe a una acelerada tasa de recambio y reciclaje de los AChRs.

6. La reinervación de los dominios postsinápticos no restituye la estabilidad de los AChRs reducida por la denervación.

La ausencia del nervio motor inducida por la denervación provocó alteraciones notorias en la morfología del componente postsináptico de la unión neuromuscular y un incremento en el recambio de los AChRs. Con el fin de explorar el efecto de la reinervación de la sinapsis neuromuscular sobre la inestabilidad de los AChRs provocada por la denervación, se estableció un protocolo de aplastamiento del nervio facial, el que luego de 5 días conlleva a la denervación de la fibra muscular, para finalmente reestablecerse contactos sinápticos funcionales al día 11 después del daño (resultados previos del laboratorio [Bermedo-García *et al.* 2022. BMC Biology, *aceptado*]). Así, se analizó el recambio de los AChRs en este paradigma a través del ensayo de doble BTX iniciando 7 días luego del aplastamiento del nervio (donde los dominios postsinápticos se encuentran denervados) y finalizando 14 días luego del aplastamiento, cuando ya ha ocurrido la reinervación por parte del axón motor (Figura 16A). Los análisis por microscopía confocal mostraron que el recambio de los AChRs en las uniones neuromusculares que fueron reinervadas se encontraba exacerbado respecto a la condición control (Figura 16B), exhibiendo valores en la relación de intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 de más del doble a los observados en las sinapsis del músculo contralateral ($1,81 \pm$

0,66 vs $0,70 \pm 0,21$ respectivamente; ****p < 0,0001, test-t) (Figura 16C). Más aun, las fibras denervadas mostraron agregados del AChRs ectópicos (de baja estabilidad) a través de la fibra muscular (Figura 16B, 16D), lo que reproduce los efectos observados en uniones neuromusculares denervadas por transección del nervio facial (Figura 14A). De manera interesante, cuando se analizaron las subpoblaciones de AChRs que componen a los agregados ectópicos del AChR, se distinguió que estas estructuras inestables no solo presentaban AChRs nuevos (positivas para BTX-2, rojas), sino que también AChRs pre-existentes (positivas para BTX-1, verdes) (Figura 16D, fila superior). Este patrón contrastó con las estructuras ectópicas observadas en el modelo de denervación crónica, las que, en un mismo tiempo de análisis, estuvieron compuestas en amplia mayoría por AChRs nuevos (Figura 16D, fila inferior). Por lo tanto, aun cuando la reinervación no restituye la estabilidad de los AChRs reducida por la denervación 14 días luego del daño, la inestabilidad de los agregados ectópicos del AChRs se ve efectivamente revertida producto del restablecimiento de la sinapsis.

7. La reinervación de la sinapsis neuromuscular impide el colapso estructural de los dominios postsinápticos inducido por la denervación.

Considerando que la ausencia del axón motor conlleva la pérdida morfológica de los dominios postsinápticos y que la reinervación no restableció la estabilidad de los AChRs (al menos en los tiempos analizados), se evaluó si el retorno del axón motor podría impedir el colapso morfológico del aparato postsináptico inducido por la denervación. Para ello, se llevó a cabo el daño a través del aplastamiento del nervio y se evaluó la morfología de los agregados del AChRs en tiempos previos y posteriores a la reinervación (desde los 10 días, hasta los 14-60 días respectivamente). Los análisis por microscopía confocal muestran que al aplicar un daño por aplastamiento del nervio, la distribución tipo-pretzel de los agregados del AChR se mantuvo práctica-

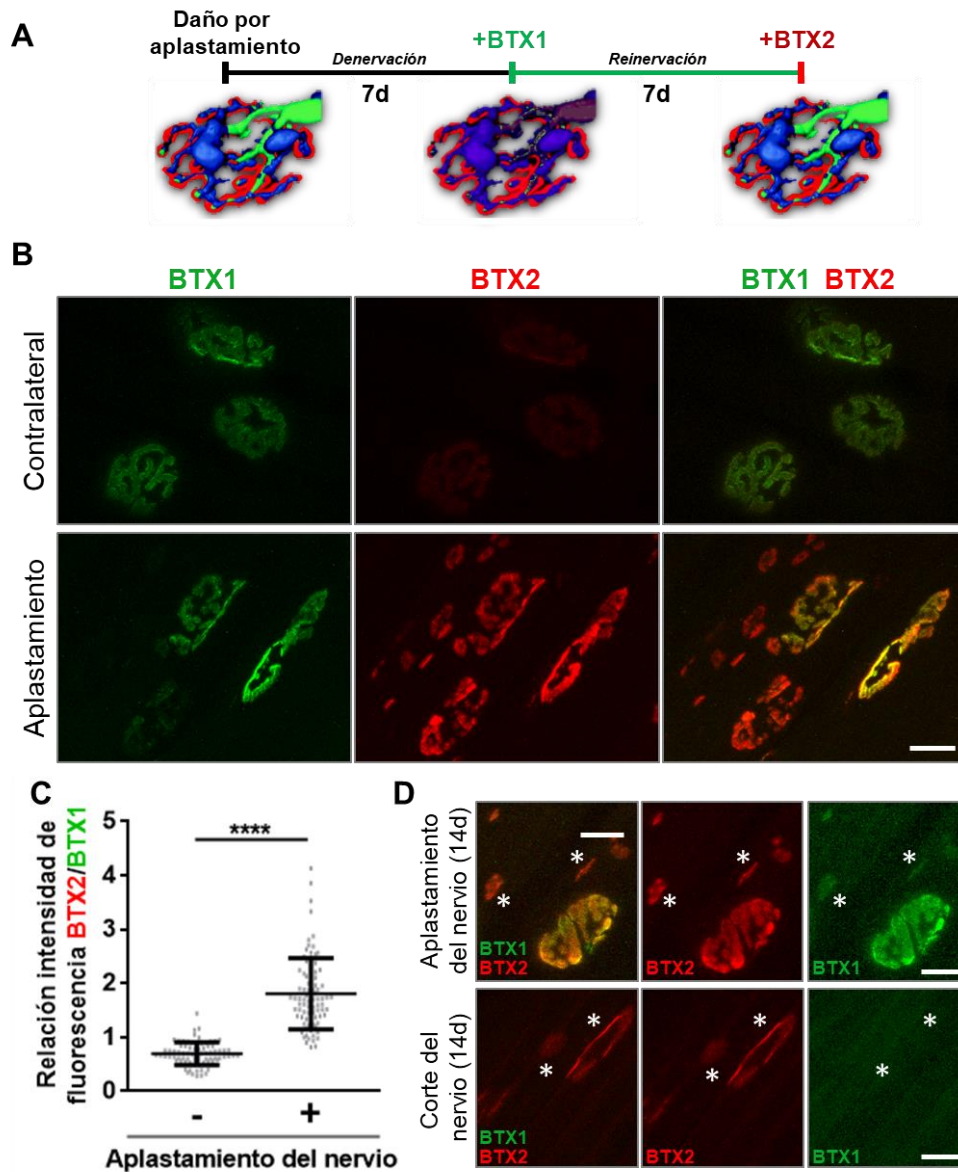


Figura 16: Análisis de la estabilidad de los AChRs luego de la reinervación de los dominios postsinápticos.

(A) Diagrama experimental para analizar la estabilidad de AChRs en un evento de denervación/reinervación. (B) Visualización por microscopía confocal de los AChRs pre-existent (BTX-1, verde) y nuevos (BTX-2, rojo) 14 días tras el aplastamiento del nervio. Barra: 20 μm (C) La relación de intensidad de fluorescencia entre BTX-2/BTX-1 fue cuantificada y graficada como el promedio \pm SD (N=3). **** $p < 0,0001$, test-T. (D) Comparación en la estabilidad de los AChRs ectópicos 14 días luego de denervar el músculo por aplastamiento o por corte del nervio, respectivamente.

mente a lo largo de todos los tiempos analizados (Figura 17A, fila superior). Al comparar estas morfologías con los dominios postsinápticos denervados mediante el corte al nervio (Figura 17A, fila inferior), se observó que la denervación crónica generó un cambio abrupto en la morfología postsináptica desde los 10 días en adelante, el que se mantuvo a través de todo el transcurso de la denervación (Figura 17A, fila inferior). La cuantificación muestra que el aplastamiento del nervio mantuvo por sobre un 90% la cantidad de dominios postsinápticos con morfología tipo-pretzel en todos los tiempos analizados (10-60d; Figura 17B), mientras que la denervación por corte redujo de manera significativa este porcentaje a valores cercanos a 65% durante los 21 días luego del daño, disminución que se exacerbó al transcurrir 60 días luego del daño ($7,35 \pm 4,59\%$ vs $93,11 \pm 1,43\%$, valores de corte y aplastamiento respectivamente. **** $p < 0,0001$). Estos resultados indican que aun cuando la reinervación no restablece la estabilidad de los AChRs denervados, sí tiene un efecto en preservar la morfología de los dominios postsinápticos, al menos en el plazo de 20 días. Esto podría ser interpretado como que, una vez dañada, la sinapsis neuromuscular nunca recupera su estabilidad, aun cuando mantiene su morfología. En base a esta idea, a continuación se evaluó la dinámica de los AChRs en ventanas de tiempos prolongadas luego de la recuperación morfológica.

8. La restauración en la estabilidad de los AChRs es precedida por la fragmentación del aparato postsináptico.

Dado que la estabilidad de los AChRs no fue restituida durante la reinervación temprana de la fibra muscular (ver Figura 16), se exploró la estabilidad postsináptica en ventanas de tiempo más prolongadas, por ejemplo, en el orden de meses. Así, el análisis del recambio de los AChRs se extendió desde el día 10 (previo a la reinervación) hasta 3 meses post-aplastamiento del nervio (Figura 18). La visualización por microscopía confocal mostró que el perfil inestable de los AChRs no fue recuperado 21 día post-daño (Figura 18A, 21 días), denotado por la prominente tinción roja (BTX-2) sobre la tinción verde (BTX-1) en los dominios postsinápticos. Sin embargo, 30 o 60 días luego del

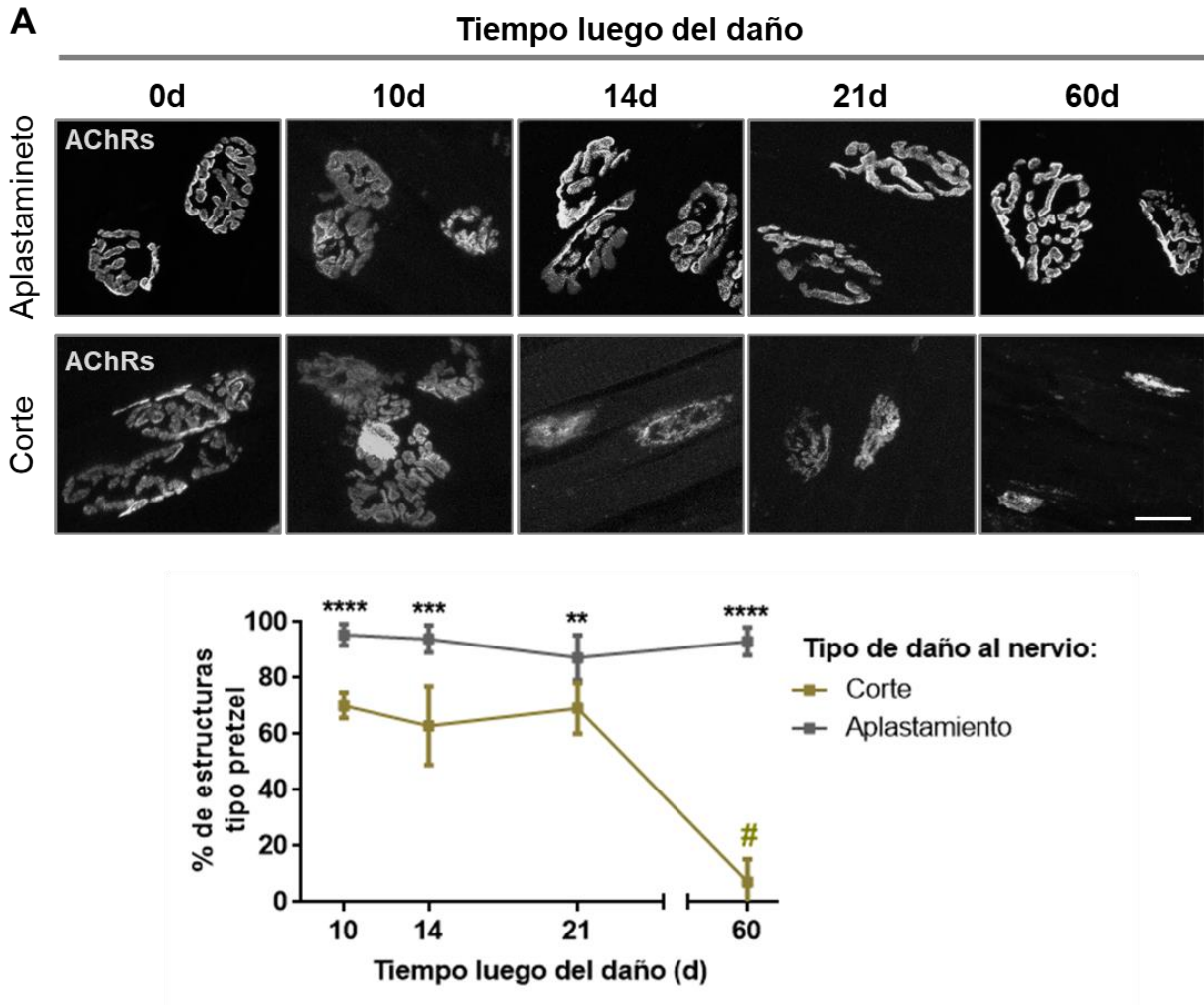


Figura 17: Análisis de la morfología postsináptica ante distintos tipos de daño a la sinapsis neuromuscular.

(A) Se realizó aplastamiento o corte del nervio facial para generar la denervación del músculo LAL. A los tiempos indicados (10, 14, 21 y 60d luego del daño), los músculos fueron colectados y procesados para tinción de los AChRs con α -BTX (gris), los cuales fueron visualizados mediante microscopía confocal. Barra: 20 μ m (B) La abundancia de las estructuras postsinápticas que exhibieron morfología tipo-pretzel fueron cuantificados y graficados como el porcentaje respecto al total de sinapsis neuromusculares, tanto en la condición de corte (línea gris) o aplastamiento (línea dorada). Se graficó el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, test-T. # $p < 0,0001$ al analizar 60 días contra 10, 14 y 21 días mediante ANOVA de una vía.

aplastamiento, los aparatos postsinápticos fueron mayormente teñidos con BTX-1 (verde), generando un marcaje aparente de color amarillo (Figura 18A, 37-60 días). Por otra parte, cuando el tiempo de análisis se extendió a 3 meses post-aplastamiento del nervio, la abundancia de los AChRs que se incorporaron a la superficie (BTX-2, rojo) fue menor en comparación a la de los AChRs pre-existentes (BTX-1, verde), observándose un patrón de recambio similar a la situación control (sin daño) (Figura 18A, 90 días). La cuantificación indicó que la denervación inicialmente generó un incremento abrupto en la relación de intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 (Figura 18B, 10 días), cuya magnitud se mantuvo significativamente mayor en tiempos donde la reinervación ha ocurrido ($^{\#}p < 0,0001$, ANOVA. Figura 18B, 14 y 21 días). Si bien a mayor tiempo se observó una tendencia a la recuperación en la relación de fluorescencia BTX-2/BTX-1, al transcurrir 1 mes desde el daño por aplastamiento, los AChRs exhibieron un grado de recambio 35% mayor en comparación al grupo control ($^{\#}p < 0,0001$, ANOVA), efecto que se observó en forma sostenida incluso 2 meses luego del daño al nervio (Figura 18B). La tasa de recambio de los AChRs fue similar al grupo control solo 3 meses después del aplastamiento, obteniéndose valores próximos a 0,7 ($p > 0,05$. ANOVA).

Con el fin de determinar la variación en el porcentaje de estructuras de acuerdo con su estabilidad, estas fueron clasificadas como inestables si la relación BTX-2/BTX-1 fue ≥ 1 , mientras que el resto fueron consideradas como estables (Figura 18C). Mediante esta aproximación, se observó que durante la denervación, y en tiempos cercanos post-reinervación (es decir, 10 y 14-21 días, respectivamente), el porcentaje de estructuras inestables incrementó de forma significativa hacia valores que superaron el 90% ($p < 0,0001$; ANOVA) (Figura 18C). Por otra parte, a tiempos posteriores (1-3 meses), la abundancia de estructuras inestables fue similar a la condición control. En contraparte, mientras las estructuras postsinápticas estables disminuyeron entre 10 y 21 días, estas incrementaron al transcurrir 1 a 3 meses luego del daño. (Figura 18C).

Una particularidad que acompañó al comportamiento dinámico en el recambio de los AChRs, fue la fragmentación de las estructuras postsinápticas concomitante al tiempo luego del aplastamiento

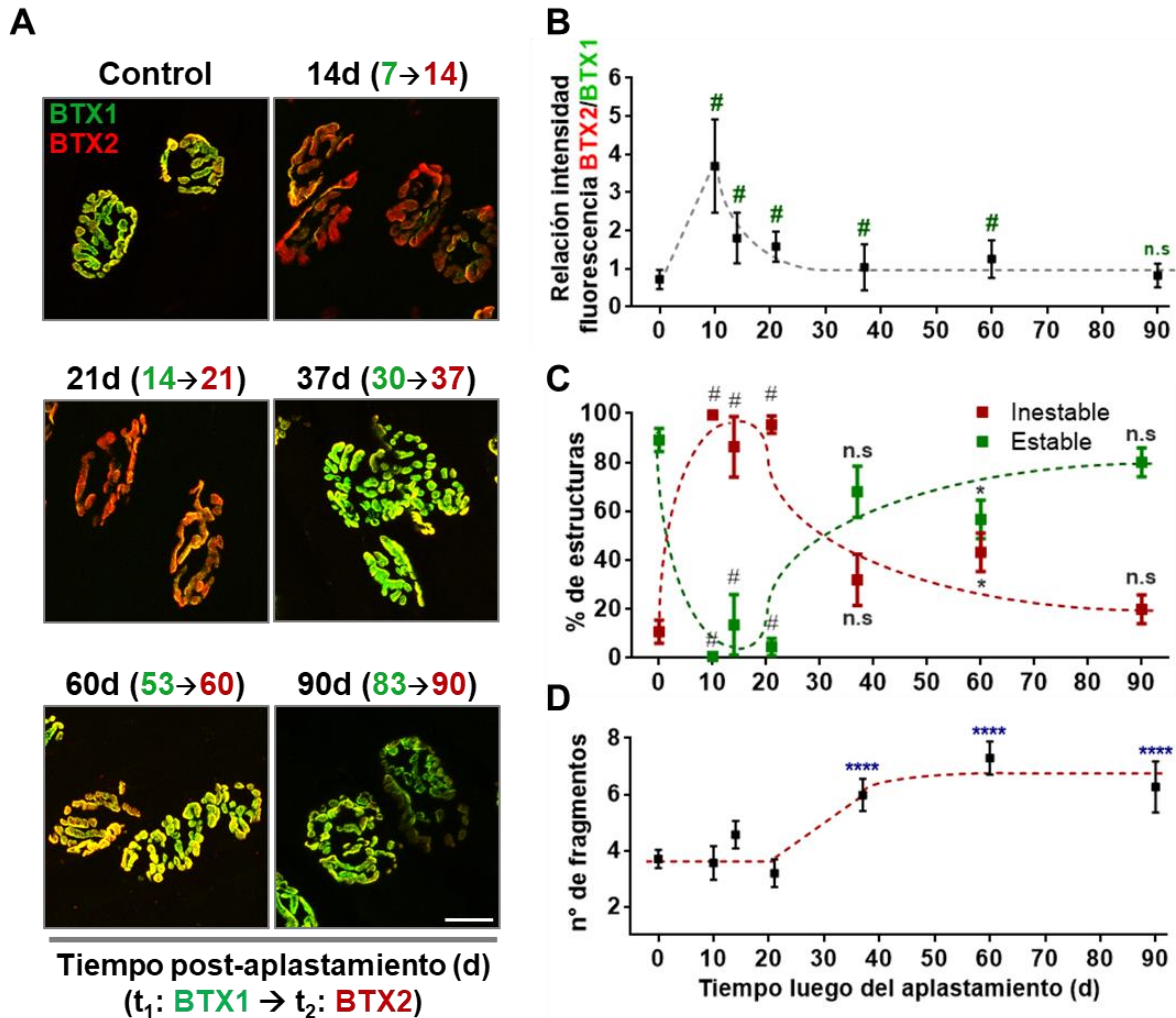


Figura 18: Análisis del recambio y fragmentación del dominio postsináptico luego del aplastamiento del nervio.

(A) Se realizó el aplastamiento del nervio facial para generar la denervación y subsecuente reinervación del músculo LAL. Posteriormente, a los tiempos indicados (14, 21, 30, 60 y 90 luego del daño), el recambio de los AChRs fue analizado mediante la tinción con BTX-1 (verde) y BTX-2 (rojo) en una ventana de tiempo de 7 días. Las sinapsis fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Barra: 20 μ m. (B) La relación de intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 fue medida para todos los tiempos. (C) Las estructuras postsinápticas fueron categorizadas en inestables ($\text{BTX-2/BTX-1} \geq 1,0$) o estables ($\text{BTX-2/BTX-1} < 1,0$). (D) El número de fragmentos fue cuantificado para cada tiempo luego del aplastamiento. Se graficó el promedio \pm SEM obtenidos de tres experimentos independientes. # o **** indican valor de $p < 0,0001$ al realizar análisis de ANOVA de una vía.

(Figura 18A, D), propiedad característica en algunos contextos patológicos que afectan a la sinapsis neuromuscular, como enfermedades motoras o distrofias musculares (Arbour et al., 2017; Rudolf et al., 2014; van der Pijl et al., 2016). De manera interesante, cuando los músculos fueron sometidos a la denervación por aplastamiento del nervio, aun cuando dentro de los primeros 21 días existió un recambio acelerado de los AChRs (Figura 18B), el número de fragmentos no fue alterado ($p > 0,05$. ANOVA), manteniéndose en promedio un valor cercano a 4 fragmentos. Sin embargo, al analizar este parámetro 1 mes luego del daño, se observó un incremento significativo en el número de fragmentos, los cuales en promedio exhibieron sobre 6 fragmentos ($p < 0,0001$. ANOVA. Figura 18D). Este número incrementado de fragmentos fue observado de forma persistente 2 y 3 meses luego de haber realizado el aplastamiento del nervio (Figura 18D) patrón que, a diferencia del recambio, no recobró los valores del control (comparar Figura 18B y 18D).

De manera interesante, el análisis conjunto del patrón de estabilidad y de fragmentación postsináptica mostró que previo a la recuperación de la estabilidad postsináptica (es decir, 90 días, Figura 18B), los agregados del AChR exhibieron un número mayor de fragmentos (37 días, Figura 18D). Así, estos datos sugieren que frente a la denervación parcial seguida de re-inervación de la sinapsis neuromuscular, la fragmentación de los dominios postsinápticos es un evento separado y antecede a la restauración de la estabilidad de los AChRs que lo componen.

9. La estabilidad de los AChRs no depende del número de fragmentos que exhibe el dominio postsináptico tras el aplastamiento del nervio.

Diversos trabajos han relacionado la fragmentación de los agregados del AChR con un deterioro de la sinapsis neuromuscular (Slater, 2019; van der Pijl et al., 2016). A partir de esto, se analizó una posible relación entre la fragmentación de los dominios postsinápticos resultante de la reinervación y la tasa de recambio de los AChRs que los componen a distintos tiempos luego del

aplastamiento del nervio (Figura 19A). En la condición control, se observaron relaciones de fluorescencia BTX-2/BTX-1 variables, encontrándose estructuras con un bajo índice de fragmentación (es decir, < a 5 fragmentos) y que presentaban valores de BTX-2/BTX-1 variados, desde 0,3 hasta valores sobre 1,4 (Figura 19B). No se observó una correlación entre el número de fragmentos y el recambio de los AChRs (Figura 19B). En músculos donde el daño por aplastamiento se había realizado hace 14 días, se observó que independiente del número de fragmentos, la mayoría de la población de estructuras postsinápticas exhibían valores de recambio sobre 1,0 (Figura 19C), lo que fue también observado 21 días post-aplastamiento (Figura 19D). A los 30 días o más (60 y 90 días), aun cuando se observó evidente fragmentación, estas estructuras no presentaron un patrón de recambio definido. En todas las condiciones, los análisis de regresión lineal mostraron índices de correlación r^2 alejados de 1, (Figura 19 B-E). Estos resultados indican que no existe una relación directa entre el número de fragmentos y la estabilidad de los dominios postsinápticos. En conjunto con nuestros datos anteriores, se puede concluir que la pérdida de estabilidad de los AChRs no se debe a la fragmentación postsináptica, sino que es consecuencia del daño inducido por la denervación en la sinapsis neuromuscular. Así, junto con otras evidencias de la literatura (Slater, 2019; van der Pijl et al., 2016), estos resultados apoyan la idea de que la fragmentación del dominio postsináptico corresponde a un cambio o adaptación morfológica requerida para la estabilización funcional de esta sinapsis.

10. La reinervación del dominio postsináptico es llevada a cabo por múltiples axones motores.

Uno de los cambios más drásticos en cuanto a la morfología postsináptica se observa durante la maduración de la unión neuromuscular, donde los agregados tipo-placa **inestables** (que son inicialmente inervados por múltiples axones motores) comienzan a exhibir regiones carentes de AChR junto a la retracción de todos los axones motores, excepto uno (Tapia et al., 2012). Esto lleva a la formación de estructuras tipo-pretzel **estables** que son contactadas por solo un axón motor (Lanuza et al., 2002). Considerando que la reinervación precede a la fragmentación postsináptica, se

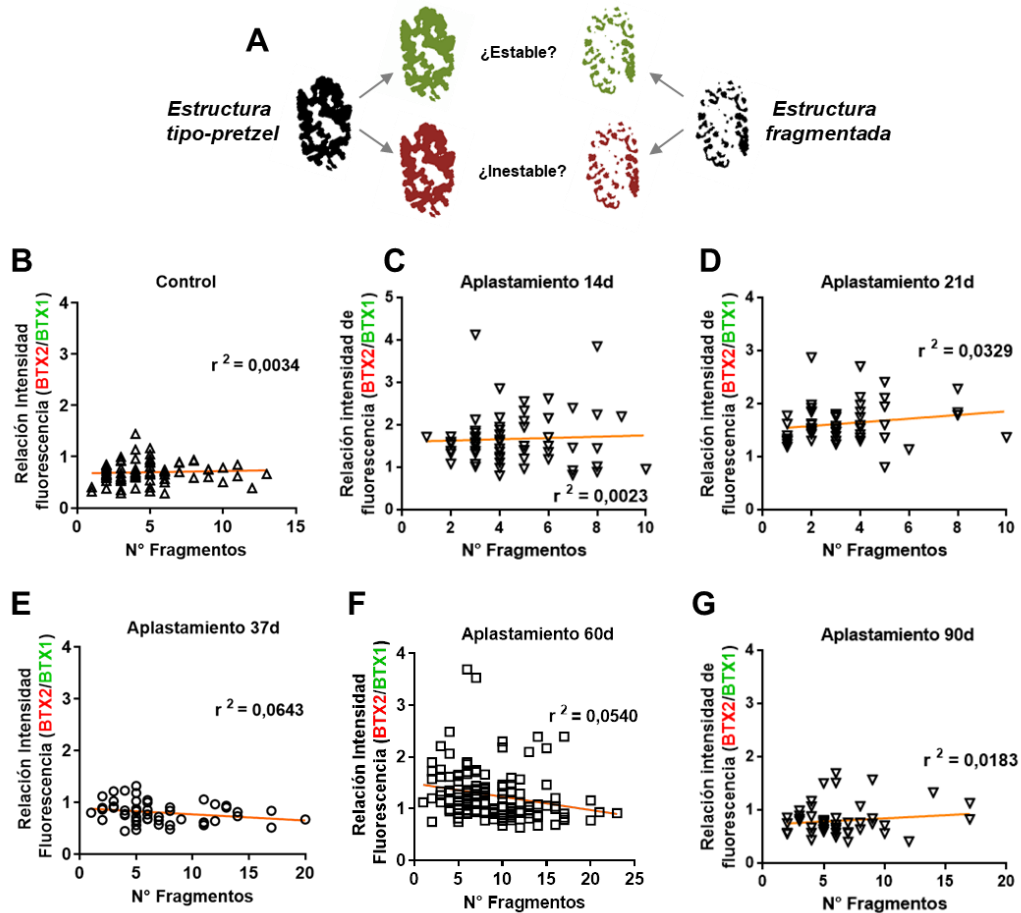


Figura 19: Análisis de la relación entre estabilidad de AChRs y fragmentación del dominio postsináptico

(A) Esquema representando la posibilidad de una correlación entre número de fragmentos e inestabilidad postsináptica generada por el aplastamiento del nervio. Se graficó de manera individual cada dominio postsináptico distribuido en el valor del número de fragmento y relación de intensidad de fluorescencia BTX-2/BTX-1 que este exhibía. Luego, se realizó un análisis de regresión lineal, donde el valor de r^2 se clarifica para la condición (B) control, (C) 14, (D) 21, (E) 37, (F), 60 o (G) 90 días luego del aplastamiento del nervio. Se analizaron entre 40-70 sinapsis por cada condición.

evaluó el número de axones presentes en las neuronas motoras que reinervan a la fibra muscular. Con dicho fin, se realizó marcaje inmunohistoquímico del dominio presináptico además de tinción de los agregados del AChR de uniones musculares de ratones sometidos a aplastamiento del nervio facial, abarcando ventanas de tiempo desde 5 a 90 días (Figura 20A). Los análisis por microscopía confocal y reconstrucción en 3D mostraron monoinervación del terminal presináptico en el control, patrón que se pierde en músculos donde el daño al nervio se había generado hace 5 días (Figura 20A). Desde 15 a 90 días, los axones motores reinervaron a los aparatos postsinápticos, abarcando gran parte de los agregados del AChR (Figura 20A). En todos estos tiempos, se observó que una proporción de los dominios postsinápticos exhibían reinervación por más de un axón motor (Figura 20A, flechas amarillas). De manera interesante, dicha inervación múltiple precedió a la aparición de estructuras fragmentadas (pues ocurrió antes de 30 días luego del daño) y permaneció incluso 90 días luego del aplastamiento del nervio. La cuantificación mostró que más del 30% de los dominios postsinápticos fueron contactados por inervación múltiple en todos los tiempos de reinervación analizados (Figura 20B). Al evaluar la morfología que exhibían las estructuras postsinápticas poli-inervadas en el transcurso de esta ventana de reinervación, se obtuvo que tan pronto como ocurre la reinervación (15 días luego del aplastamiento), la mayor cantidad de estructuras poli-inervadas presentaban una morfología tipo pretzel (Figura 20C), mientras que a los 30 días, o incluso 90 días luego del daño, la morfología de las estructuras poli-inervadas fue mayoritariamente fragmentada (Figura 20C). Respecto a la abundancia de estas estructuras, los análisis realizados 15 días luego del daño indicaron que cerca del 75% del total de sinapsis poli-inervadas exhibían una morfología tipo-pretzel, magnitud que disminuyó significativamente a un ~15% a 30 y 90 días post-daño (**p < 0,01. ANOVA). De forma complementaria, las estructuras que fueron poli-inervadas y que exhibían una morfología fragmentada incrementaron desde un ~20% a un ~80% (**p < 0,01. ANOVA) cuando se analizó la abundancia a 15 y 90 días luego del daño, respectivamente (Figura 20C).

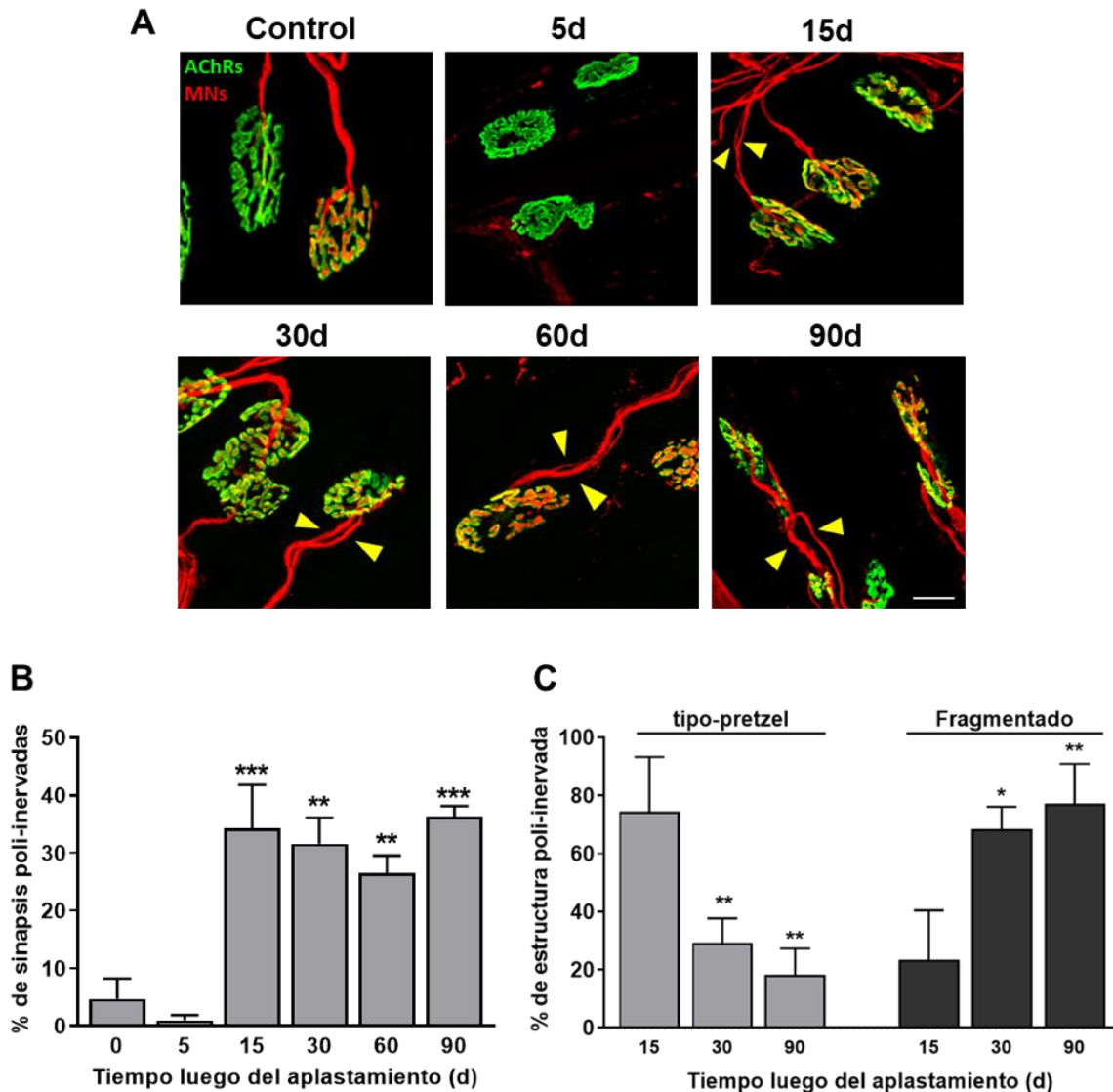


Figura 20: Análisis del perfil de reinervación luego del aplastamiento del nervio.

(A) Se realizó el daño por aplastamiento del nervio facial. Posteriormente, luego de distintos tiempos, los músculos LAL fueron colectados y procesados para inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra los axones y terminales motores (rojo) y 488-BTX para marcar AChRs (verde). Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Barra: 20 μ m. (B) El porcentaje de dominios postsinápticos que fueron inervados por 2 o más axones o ramas de axones motores fue graficado como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. (C) Además, se correlacionó la abundancia de sinapsis con inervación múltiple versus la morfología postsináptica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a la condición control tras realizar ANOVA de una vía. Figura generada en colaboración con la Dra.(c) Francisca Bermedo-García (Bermedo-García *et al.* BMC Biology 2022, Aceptado).

En su conjunto, estos análisis sugieren que tras la reinervación, la fibra muscular es inervada por múltiples terminales motores, los que a través de un cambio drástico en la morfología de los dominios postsinápticos, inducen la aparición de agregados del AChR fragmentados.

Capítulo II: Identificación de una subpoblación intracelular de AChRs que antecede a la fragmentación del dominio postsináptico.

Considerando que la mayoría de los análisis en la estabilidad postsináptica abordaron en distintos contextos fisiológicos el recambio entre las subpoblaciones de AChRs pre-existentes y nuevos, y que además se observó un posicionamiento diferencial de estas subpoblaciones en la membrana de la fibra muscular, a continuación decidimos evaluar la dinámica y localización de la subpoblación intracelular de AChRs y así avanzar en entender su contribución frente a dichos eventos.

1. La subpoblación de AChRs intracelulares exhibe un patrón de distribución similar a la subpoblación de AChRs ubicada en la superficie de los dominios postsinápticos.

En primer lugar, se analizó el comportamiento y distribución basal de la subpoblación de AChRs intracelulares mediante una aproximación que incluyó marcaje con BTX acoplada a un tercer fluoróforo (Alexa647-BTX; BTX-3) tras la permeabilización de la fibra muscular (Figura 21A). La visualización por microscopía confocal mostró que independiente del grado de recambio que exhiben los AChRs en la membrana de la fibra muscular producto del incremento en la ventana de tiempo entre BTX-1 y BTX-2, los AChRs intracelulares se distribuyeron de manera similar a las subpoblaciones marcadas con ambas BTXs a través de la placa motora (Figura 21B), siguiendo el patrón en forma de pretzel que caracteriza al dominio postsináptico de una sinapsis neuromuscular madura. Por otra parte, esta subpoblación intracelular no exhibió una diferencia notoria al comparar su intensidad de fluorescencia a 3, 7 ó 14 días de recambio (Figura 21B, fila inferior). De esta forma, los AChRs intracelulares en una condición basal se distribuyen cercanos al dominio postsináptico y podrían revelar de forma temprana perturbaciones en la sinapsis neuromuscular que se relacionen con los ensayos de estabilidad de AChRs.

2. Cambios en la distribución de AChRs intracelulares como resultado de la denervación.

Considerando que la denervación generó inicialmente un incremento en el recambio de los AChRs y subsecuentemente una pérdida morfológica del dominio postsináptico (Capítulo 1), se evaluó el posible efecto temprano del dismantelamiento postsináptico sobre la distribución y dinámica de los AChRs intracelulares. Con el fin de visualizar estructuras postsinápticas tanto en colapso morfológico como con recambio diferencial de AChRs, los músculos LAL fueron denervados y 3 días luego del daño fueron sometidos al ensayo de triple BTX en los tiempos descritos anteriormente ($t_{\text{BTX-1}} \rightarrow t_{\text{BTX-2}}$: 7 días. Figura 21C). Los análisis por microscopía confocal mostraron que los dominios postsinápticos exhibían de forma robusta un marcaje con BTX-3 que siguió la marca de BTX-1 y BTX-2 (Figura 21C). Si bien el marcaje de BTX-3 fue levemente más tenue en el compartimento central de una estructura colapsada (enriquecido en la marca BTX-1), esta tinción no resultó excluyente, como ocurre con el marcaje para BTX-2 (Figura 21C, asterisco blanco). Además, la periferia de los aparatos postsinápticos colapsados también fueron positivas al marcaje con BTX-3 (Figura 21C, asterisco celeste), lo que corrobora que los AChRs intracelulares ocupan las mismas regiones que los AChRs pre-existentes y nuevos, independiente del colapso morfológico de los aparatos postsinápticos. Debido que la ventana de tiempo utilizada abarcó un periodo donde existe una pérdida morfológica drástica de los agregados de AChRs, se redujo el rango temporal de análisis de recambio a 3 días ($t_{\text{BTX-1}} \rightarrow t_{\text{BTX-2}}$: 3 días. Figura 21D). Al observar mediante microscopía confocal, se pudo discernir que existió un incremento esperable en el recambio de AChRs dado por un aumento evidente en la intensidad de fluorescencia de BTX-2 en la placa motora denervada (comparar Figura 21D con 21B, 3 días). De manera interesante, se observó un cambio radical en la distribución y localización de los AChRs intracelulares, donde la morfología tipo-pretzel fue reemplazada completamente por un patrón de anillos agrupados (Figura 21D, BTX-3). De forma interesante, este patrón de anillos no solo fue observado en las estructuras sinápticas, sino que también en las estructuras ectópicas que poseen menor estabilidad (Figura 22B). Al analizar en detalle el número de

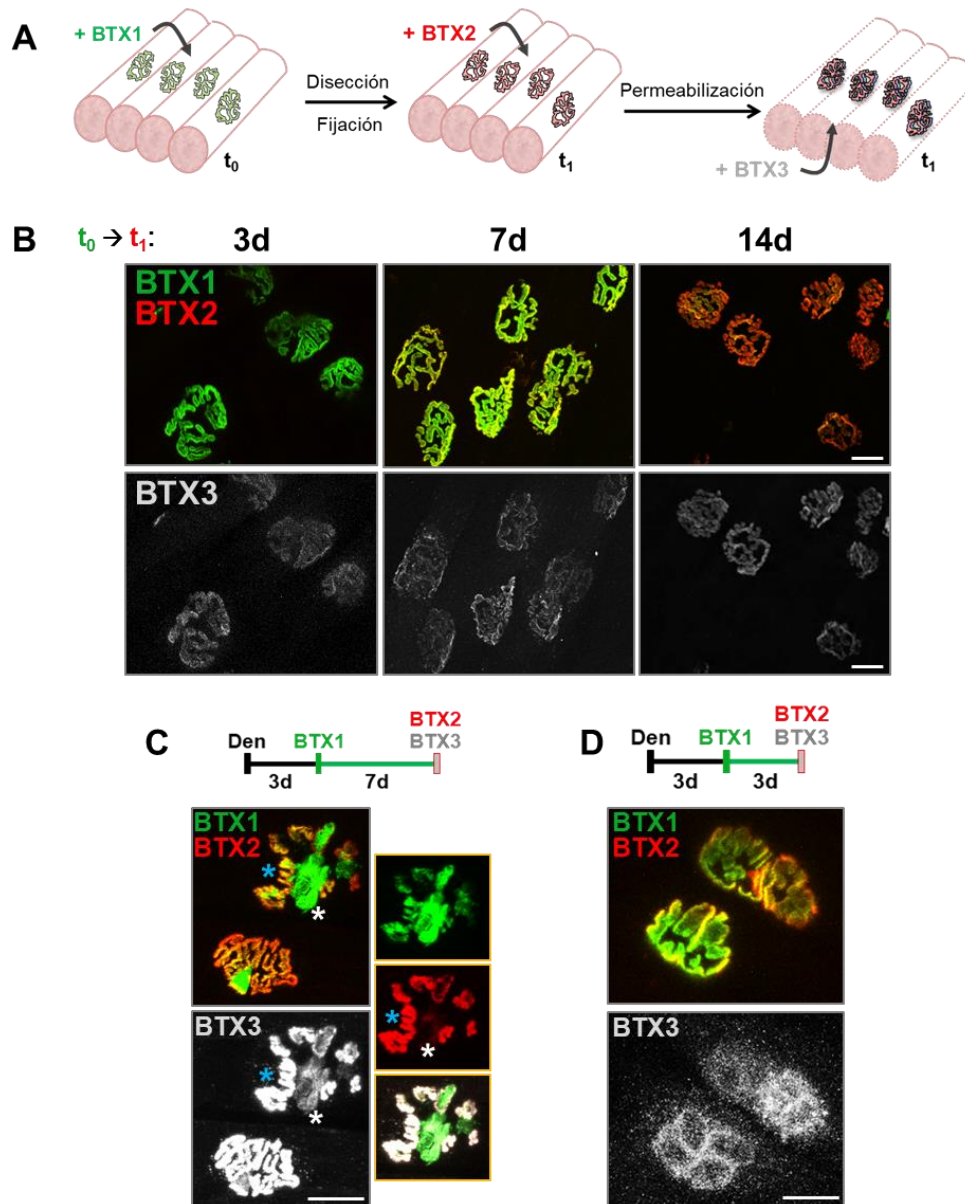


Figura 21: Análisis de la distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares en la unión neuromuscular madura.

(A) Diagrama de la aproximación experimental para la detección de tres subpoblaciones de AChRs. Luego de distintos tiempos entre BTX-1 y BTX-2 (3, 7 y 14 días), los músculos fueron colectados, fijados y permeabilizados, marcándose AChRs pre-existentes (BTX-1, verde), nuevos (BTX-2, rojo) e intracelulares (BTX-3, gris). (B) Imágenes adquiridas por microscopía confocal para los distintos tiempos de recambio. Barra: 20 μm . (C-D) Los músculos fueron denervados y luego de 3 días se realizó el marcaje de las subpoblaciones de AChRs utilizando ventanas de tiempo de 7 (C) ó (D) 3 días, respectivamente. Se realizaron 3 experimentos de forma independiente. Barra: 10 μm .

anillos que se encontraban en estas estructuras, se determinó que en la región sináptica (pretzel) las estructuras positivas para BTX-3 contenían de 3 a 5 anillos, mientras que en las regiones extra-sinápticas, la mayoría de las estructuras positivas para BTX-3 poseían 1 ($95,58 \pm 0,38\%$) o 2 anillos ($48,89 \pm 15,6\%$, $p < 0,01$. Figura 22C). Tomando en cuenta la morfología circular/ovalada de estas estructuras, en conjunto con el posicionamiento circundante a las estructuras postsinápticas, se evaluó la posibilidad de que la fuente de las estructuras marcadas con BTX-3 fueran los núcleos de la fibra muscular.

3. Los mionúcleos no subyacen a las estructuras de AChRs intracelulares inducidas por la denervación.

Durante la diferenciación postsináptica, el incremento localizado en la expresión de los genes que codifican para proteínas postsinápticas, tales como AChRs, MuSK, LRP4 y rapsina, ocurre exclusivamente en unos pocos núcleos localizados de forma adyacente a la especialización postsináptica, denominados núcleos subsinápticos (Brenner et al., 1990; Grady et al., 2005). Considerando que las estructuras positivas para BTX-3 exhibían una forma de anillo y se localizaron próximas al dominio postsináptico, evaluamos si los AChRs intracelulares tenían una relación topológica cercana con los núcleos de la fibra muscular. Al teñir con DAPI estas muestras se logró determinar que si bien algunas estructuras de anillos positivas para BTX-3 coincidían con la presencia de mionúcleos, el posicionamiento, ubicación y distribución de estos núcleos no coincidió con la de las estructuras positivas para BTX-3, independiente de si eran sinápticas o extra-sinápticas (Figura 23A). El análisis de reconstrucción por IMARIS corroboró esta observación (Figura 23A, derecha), donde se aprecia que existe una localización cercana de los mionúcleos con los dominios postsinápticos intracelulares, pero no una relación evidente entre estos. Más aún, al determinar el número de núcleos contenidos en las estructuras positivas para BTX-3, se observó que en promedio 1 anillo presentaba ~ 2 mionúcleos (Figura 23B), mientras que las estructuras positivas para BTX-3

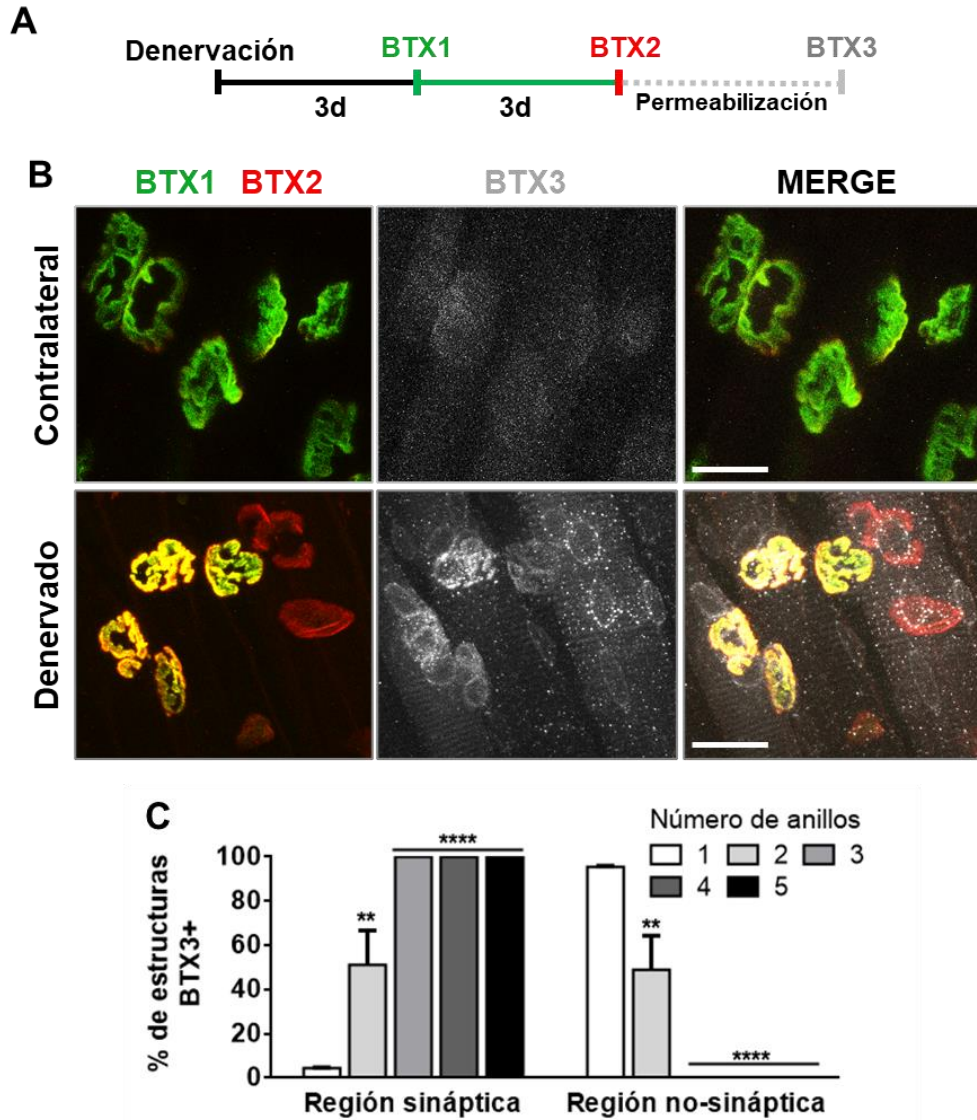


Figura 22: Análisis de la distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares en la unión neuromuscular luego de la denervación.

(A) Aproximación experimental para la detección de las tres subpoblaciones de AChRs. Al tercer día luego de la denervación, se analizó el recambio de AChRs con una ventana de tiempo entre BTX-1 y BTX-2 de 3 días. Luego de la permeabilización del tejido, los AChRs intracelulares se marcaron con BTX-3 (gris). (B) Imágenes adquiridas por microscopía confocal muestran el cambio en la distribución de los AChRs intracelulares. Barra: 20 μ m. (C) Se cuantificó la abundancia del tipo de estructura positivas para BTX-3 presente tanto en la región sináptica como la no-sináptica de las fibras musculares denervadas y se graficó el promedio \pm SEM. (N=3). ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ al comparar respecto al grupo de estructura positivas para BTX-3 con un anillo.

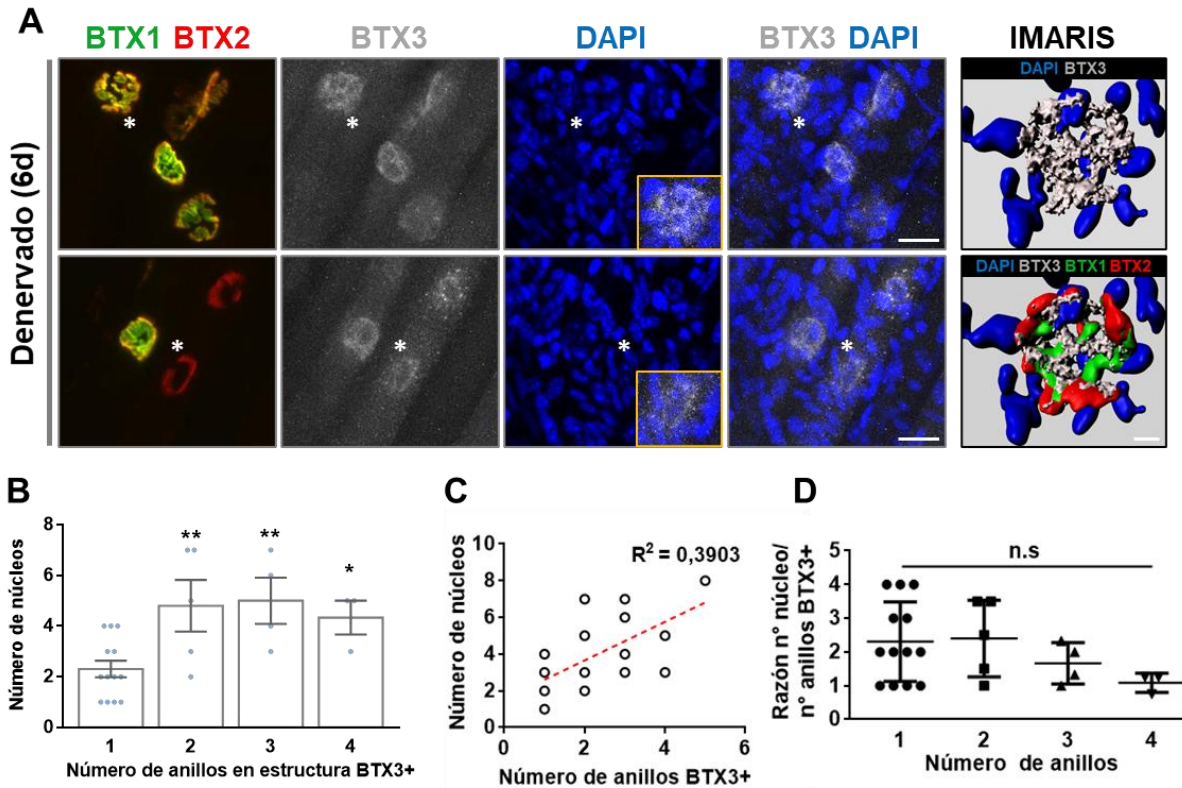


Figura 23: Análisis entre la co-distribución de la subpoblación de AChRs intracelulares y los núcleos de la fibra muscular.

(A) Imágenes adquiridas por microscopía confocal de músculos denervados por 6 días, donde el análisis del recambio de AChRs inició 3 días previo a colectar el tejido. Los músculos fueron fijados, teñidos con BTX-2 (rojo) y permeabilizados para marcar la subpoblación intracelular con BTX-3 (gris) de AChRs intracelular y los núcleos con DAPI (azul). Se utilizó un procesamiento de imágenes con el programa IMARIS para analizar en mayor detalle la distribución entre los mionúcleos y las distintas poblaciones de AChRs. Barra: 20 μm (B) El número de núcleos contenido por cada estructura de anillo positiva para BTX-3 fue cuantificado y graficado como el promedio \pm SEM. (C) Se realizó una correlación entre el número de núcleos observados respecto al número de anillos que presentaban estructuras positivas para BTX-3, donde posteriormente se calculó el coeficiente r^2 al generar un análisis de regresión lineal. La línea roja demarca una recta indicando una correlación con valor $r^2=1$, resaltando la dispersión de los datos (círculos blancos) en la correlación calculada. (D) Se cuantificó la razón entre el número de núcleos y el número de anillos que presentaba cada estructura, graficándose el promedio \pm SD. (N=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s: $p > 0,05$.

que presentaban 2 a 4 anillos exhibieron alrededor de 4 mionúcleos (Figura 23B). Por otra parte, se observó que no existió una correlación directa entre el número de anillos de estructuras positivas para BTX-3 con el número de mionúcleos que poseían, demostrado por el bajo valor del coeficiente de determinación lineal (r^2 : 0,3903) (Figura 23C). Finalmente, al cuantificar la razón del número de mionúcleos respecto al número de anillos positivos para BTX-3, se obtuvo que en promedio cada anillo contenía entre 1 y 2 mionúcleos (Figura 23D, $p > 0,05$), descartando así que la fuente de los AChRs intracelulares que forman las estructuras tipo anillo sean los núcleos de la fibra muscular.

4. Las estructuras de AChRs intracelulares no son proporcionadas por las células satélites residentes en la fibra muscular.

Las células satélite normalmente residen en un estado quiescente en la fibra muscular (Mauro, 1961), donde en respuesta al daño muscular, se activan y dividen para proveer precursores miogénicos para la regeneración muscular (Yin et al., 2013). De forma interesante, las células satélite que se localizan en la vecindad de la unión neuromuscular se activan luego del daño al nervio y su activación es necesaria para la regeneración de esta sinapsis (Liu et al., 2015). De esta manera, las células satélite podrían participar como una fuente de proteínas postsinápticas, incluyendo a los AChRs. Para abordar esta idea experimentalmente, se utilizó como modelo ratones transgénicos $Pax7^{CreER} : ROSA^{mT/mG}$, los cuales provienen de la cruce entre un ratón que expresa de forma inducida (dependiente de tamoxifeno) la proteína Cre-recombinasa específicamente en las células satélite ($Pax7^{CreER}$) (Murphy et al., 2011), con un ratón que expresa ubicuamente la proteína fluorescente roja tdTomato (flanqueada con sitios *loxP* en su región genética). Posterior a una recombinación mediada por Cre, estos animales expresan la proteína fluorescente verde, GFP ($ROSA^{mT/mG}$; (Muzumdar et al., 2007)). De esta forma, en el ratón $Pax7^{CreER} : ROSA^{mT/mG}$, solamente las células satélite que fueron activadas serán las que expresen GFP (Figura 24A).

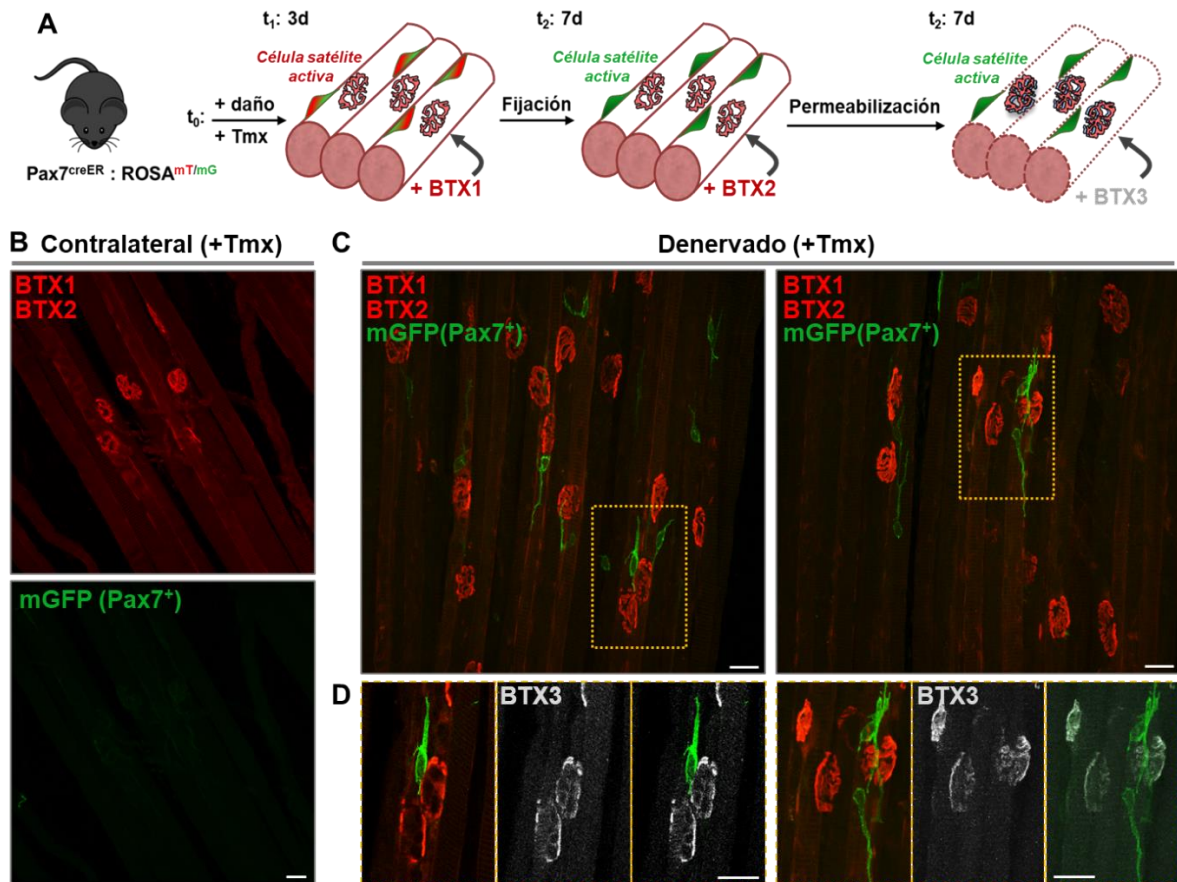


Figura 24: Análisis de la distribución de células satélite y AChRs intracelulares en uniones neuromusculares denervadas.

(A) Diagrama de trabajo para analizar la contribución de células satélite como fuente de AChRs intracelulares. Tras la administración diaria de tamoxifeno, el ratón transgénico Pax7^{CreER} : ROSA^{mT/mG} expresa GFP específicamente en las células satélite activas (positivas para Pax7). Se realizó la denervación del músculo LAL. Luego de 3 días se marcaron los AChRs pre-existentes y el tejido fue colectado 4 días después. Para este experimento, fue utilizada 555-BTX tanto para la tinción de BTX-1 como de BTX-2 (rojo). Finalmente, el tejido fue permeabilizado y los AChRs intracelulares fueron marcados con BTX-3 (gris). (B-C) Análisis por microscopía confocal del músculo contralateral (B) o denervado (C). En (D) se muestra una magnificación del recuadro amarillo trazado en C para cada campo. Las células positivas para GFP corresponden a células satélite activas. Barra: 20 μ m. Se realizaron tres experimentos de forma independiente.

Inicialmente, se realizó el daño al nervio en el ratón Pax7^{CreER} : ROSA^{mT/mG} y luego de 3 días se procedió al análisis de las células satélite activas como también de la subpoblación intracelular de AChRs, como se indica en la Figura 24A. La visualización por microscopía confocal indicó que la denervación conllevó a una abundante presencia de células positivas para GFP en la vecindad de las uniones neuromusculares denervadas (Figura 24C), en comparación a la situación contralateral (Figura 24B). Más aún, las células positivas para GFP exhibieron una o dos proyecciones delgadas que se extendían por la fibra muscular (Figura 24C), las que si bien se localizaron de forma cercana a las uniones neuromusculares, en su mayoría no contactaron directamente a los dominios postsinápticos (Figura 24C). Por otra parte, al analizar la distribución de las células positivas para GFP respecto a las estructuras intracelulares positivas para BTX-3, se observó que la marca de BTX-3 tipo anillo no coincidía con la región más ovoide de la marca de GFP (cuerpo celular), ni tampoco con alguna de las proyecciones que estas células satélite extendían (Figura 24D).

Para estudiar la distribución relativa de las células satélite y las estructuras tipo anillo positivas para BTX-3, se comparó por un lado su abundancia respecto al número de uniones neuromusculares, como también el número de núcleos presente dentro de cada célula positiva para GFP (Figura 25A-C). Los análisis indicaron que la cantidad de células satélite fue ~3 veces menor a la cantidad de estructuras positivas para BTX-3 que se encuentran por unión neuromuscular (**p < 0,01; test-t. Figura 25B), mientras que la cantidad de núcleos contenidos en las estructuras positivas para BTX-3 fue el doble respecto a los que contenían las células satélite (**p < 0,01; test-t. Figura 25A, C). Estos resultados demuestran que las estructuras de AChRs intracelulares positivas para BTX-3 no se relacionan con la distribución de las células satélite.

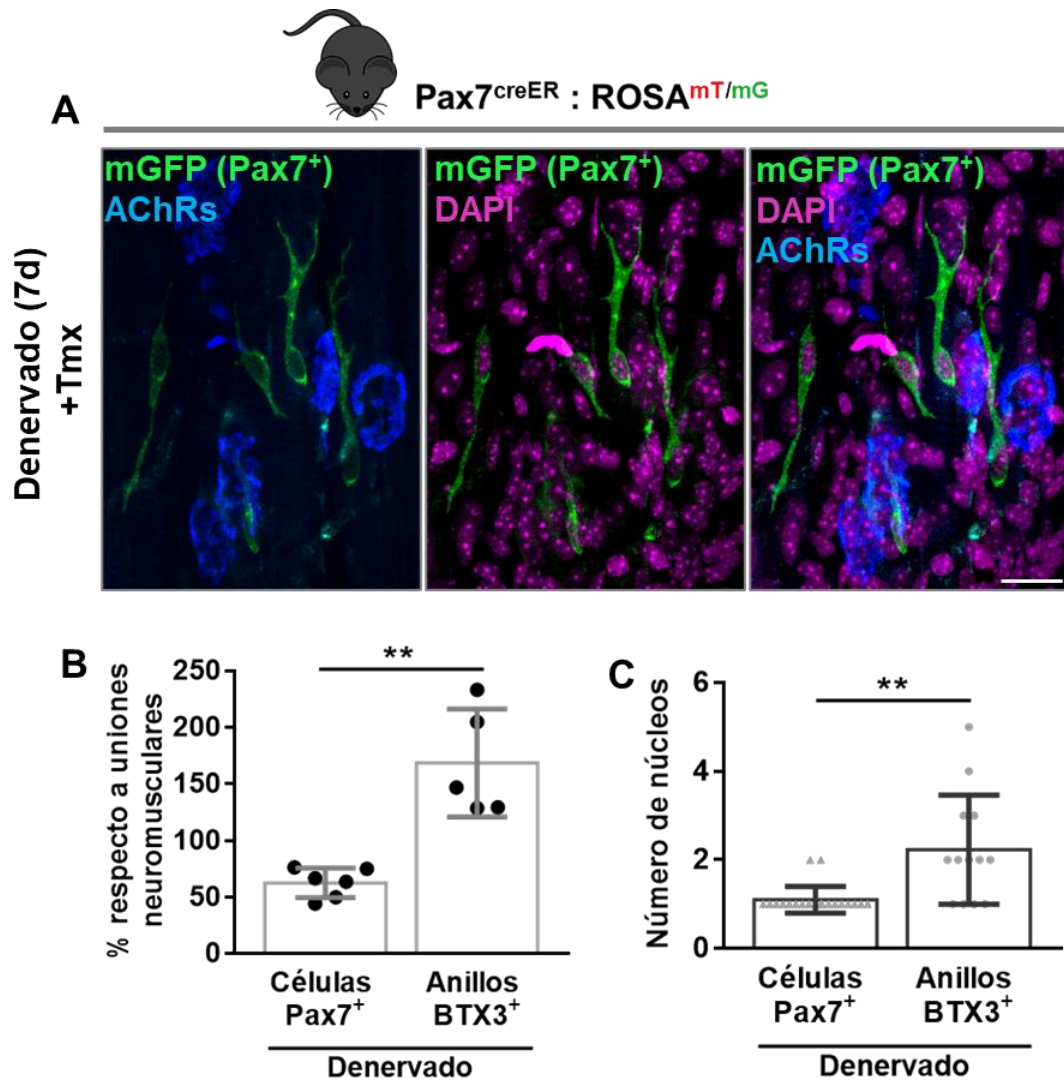


Figura 25: Análisis de la distribución de mionúcleos y células satélite en uniones neuromusculares denervadas

(A) Imágenes adquiridas por microscopía confocal de músculos procedentes del ratón Pax7^{CreER} : ROSA^{mT/mG} que fueron denervados por 7 días y procesados para la visualización de células satélite (positivas para GFP, verde) como también AChRs (azul). Los músculos fueron posteriormente fijados y los núcleos fueron marcados con DAPI (pseudocolor magenta). (B) La abundancia de células satélite activas (positivas para Pax7) fue cuantificada respecto al total de uniones neuromusculares por campo. Estos valores fueron comparados con la abundancia de las estructuras positivas para BTX3. (C) El número de núcleos contenidos en las células positivas para GFP fue cuantificado y comparado posteriormente con el número de núcleos que se encontraron en las estructuras positivas para BTX3. Los gráficos representan el promedio ± SD para cada condición. **p < 0,01 al realizar test-t. (N=3).

5. Las estructuras de AChRs intracelulares corresponden a focos de degradación del dominio postsináptico.

Hasta este punto, los datos han descartado la posibilidad de que las estructuras tipo-anillo positivas para BTX-3 provengan de la contribución de mionúcleos subsinápticos o de las células satélite (Figura 23-25). Considerando que tras la denervación, los AChRs que se encuentran en la superficie postsináptica son removidos con una tasa acelerada (Akaaboune et al., 1999; Levitt and Salpeter, 1981; Salpeter et al., 1986) y degradados posteriormente en los compartimentos lisosomales (Bruneau et al., 2005; Kumari et al., 2008; Wild et al., 2016), una posibilidad interesante es que las estructuras positivas para BTX-3 tipo-anillo correspondan a AChRs que se encuentran en vías de degradación proteica. Para abordar esta idea, en músculos denervados el análisis de dinámica de subpoblaciones de AChRs (BTX-1, BTX-2 y BTX-3) fue complementado con la inmunotinción de la proteína de membrana asociada a lisosoma-1 (LAMP1), un marcador lisosomal (Wild et al., 2016). Dada la limitación de utilizar tres colores en los fluoróforos para la visualización de las muestras mediante microscopía confocal, en este experimento los marcajes de BTX-1 y BTX-3 se realizaron con 488Alexa-BTX (Figura 26A).

Los resultados mostraron que la denervación a corto plazo indujo la aparición de estructuras tipo anillo positivas para BTX-3 en distintas regiones de la fibra muscular (Figura 26B, BTX-3 en verde). Por su parte, al analizar la distribución del patrón de tinción de LAMP1 en distintos planos z, se observó que los anillos positivos para BTX-3 también fueron positivos para la detección de LAMP1 (Figura 26C), cuyo tamaño y localización fueron similares a los anillos de AChR intracelulares tanto en las regiones sinápticas (Figura 26C, flechas amarillas en panel inferior) como en las regiones no-sinápticas (Figura 26C, asteriscos amarillos en panel superior). Mas aún, al cuantificar el número de anillos que exhibían estructuras positivas para LAMP1 o positivas para BTX-3, se observó que ambos grupos presentaron en promedio 1 anillo (LAMP1: $1 \pm 0,03$ vs BTX-3: $1,08 \pm 0,03$. $p > 0,05$ test-t. Figura 26D). Finalmente, el porcentaje de co-localización entre las estructuras que fueron tanto positi-

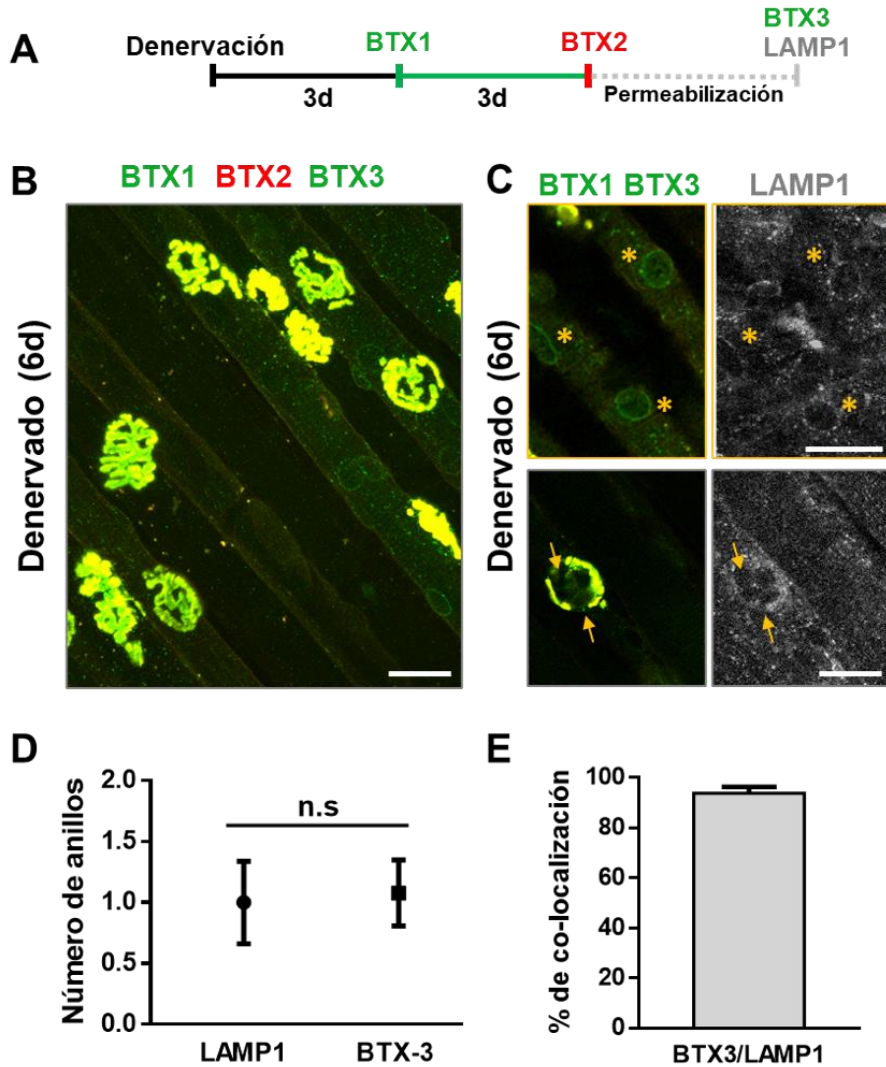


Figura 26: Análisis de la distribución de estructuras positivas para BTX-3 y estructuras LAMP1⁺ en uniones neuromusculares denervadas.

(A) Diagrama representando la aproximación experimental para detectar las tres subpoblaciones de AChRs en conjunto con la inmunotinción para LAMP1. (B) Análisis de microscopía confocal utilizando la intensidad de proyección máxima del conjunto de planos z revela la localización de BTX-1, BTX-2 y BTX-3 en el músculo LAL denervado por 6 días. (C) Se muestra un plano z obtenido mediante microscopía confocal para representar la distribución del marcaje de BTX-1 y BTX-3 (verde), en conjunto con LAMP1 (gris). (D) Se calculó el número de anillos que exhibían las estructuras positivas para BTX-3 y positivas para LAMP1, respectivamente, como también (E) el porcentaje de co-localización entre las estructuras BTX-3 y LAMP1. Los gráficos representan el promedio \pm SEM para cada condición. (N=2). $p > 0,05$ al realizar test-t en (D).

vas para BTX-3 como para LAMP1 fue de $93,82 \pm 2,50$ %. De esta forma, podemos concluir que la denervación induce la aparición de agregados en forma de anillos de una subpoblación intracelular del AChR que se encuentra en vías de degradación.

Capítulo III. Fzd9 es requerido para la estabilidad de los AChRs *in vivo*.

1. Fzd9 se localiza en el dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular madura.

La distribución y localización de Fzd9 en la sinapsis neuromuscular madura fue evaluada por medio de análisis de inmunohistoquímica en el músculo LAL, donde además se tiñeron los AChRs de superficie como también los AChRs intracelulares para localizar las regiones sinápticas en este tejido. La visualización por microscopía confocal mostró que en los planos donde están concentrados los AChRs, también existió un marcaje positivo para Fzd9 (Figura 27A y 27B, panel superior). A su vez, la distribución de Fzd9 se caracterizó por presentar un patrón punteado y por co-localizar parcialmente con los AChRs en distintas regiones del dominio postsináptico (Figura 27B, panel inferior), evidenciándose además regiones positivas para Fzd9 pero negativas para los AChRs (Figura 27A y 27B, columna derecha) a través de la fibra muscular. Además, se observó que la marca para Fzd9 no co-distribuyó con la población de AChRs de superficie o aquellos intracelulares (Figura 27B). Estos resultados sugieren que en la fibra muscular, Fzd9 se encuentra altamente concentrado en los dominios postsinápticos de la unión neuromuscular.

2. La estabilidad de los AChRs es dependiente de los niveles de Fzd9 en la sinapsis neuromuscular madura.

Una vez establecidos los parámetros para detectar y determinar el recambio de los AChRs sobre el dominio postsináptico, se procedió a analizar el rol de Fzd9 sobre la estabilidad de los AChRs. En estos ensayos, los niveles de Fzd9 fueron modulados en el músculo LAL mediante la electroporación de plásmidos que codifican ya sea para Fzd9-HA (Aviles et al., 2014), o para un sgARN dirigido contra Fzd9 de ratón (CRISPR-Fzd9), plásmido diseñado para, mediante el sistema CRISPR/Cas9, disminuir los niveles de expresión del receptor (Adli, 2018). Inicialmente, se compro-

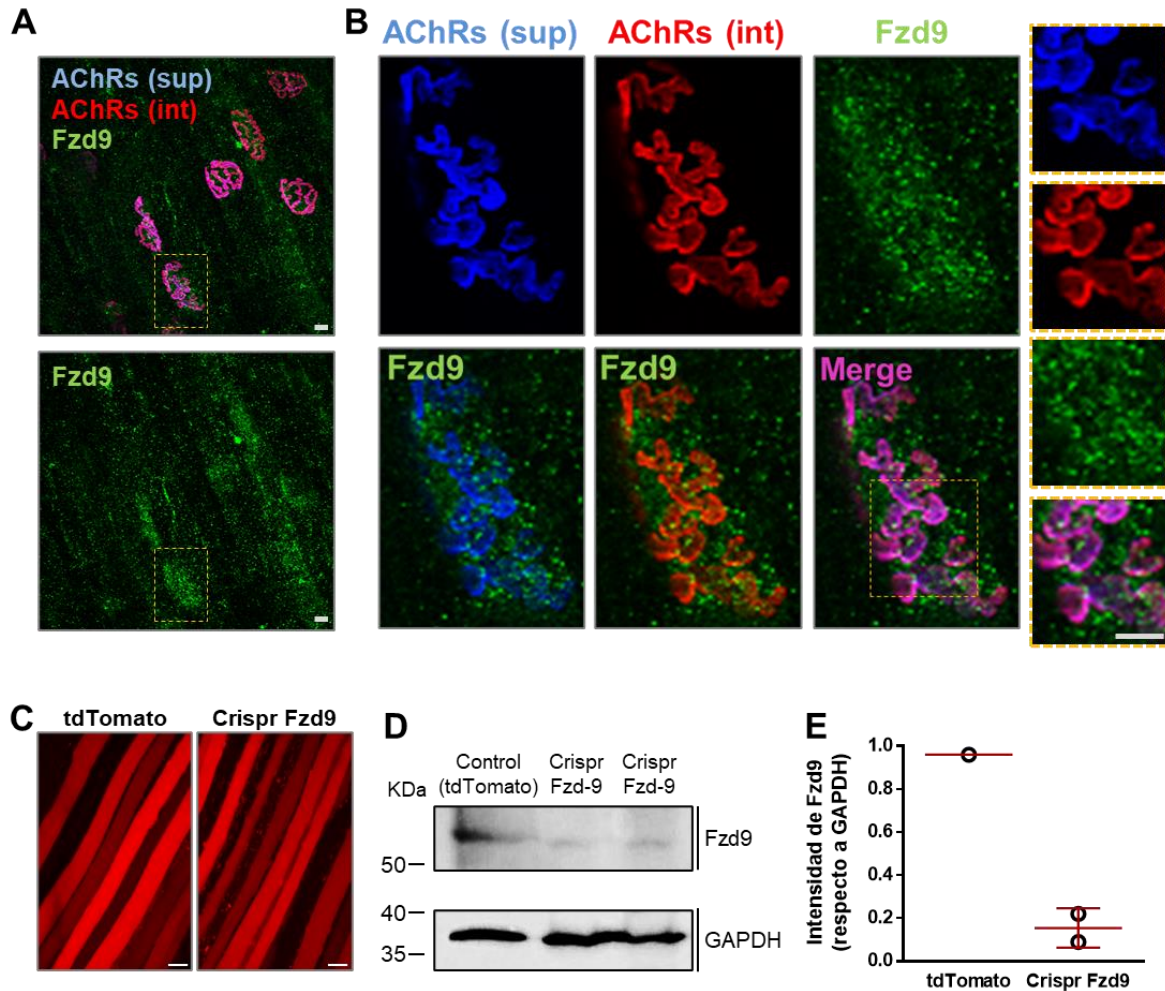


Figura 27: Análisis de la localización de Fzd9 y su silenciamiento en el músculo esquelético adulto.

(A) Se realizaron análisis de inmunohistoquímica en el músculo LAL de ratones adultos, utilizando un anticuerpo contra Fzd9 (verde) en conjunto con el marcaje de los AChRs de superficie (azul) y los AChRs intracelulares (rojo). Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal. (B) Magnificación de la región demarcada en amarillo en (A) para visualizar en detalle la distribución de Fzd9 y los AChRs. Barra: 10 μ m (C) El silenciamiento de Fzd9 se llevó a cabo mediante el sistema CRISPR/Cas9 *in vivo*. Los músculos LAL fueron electroporados con el constructo CRISPR-Fzd9 y (D) 10 días después se realizaron extractos proteicos para evaluar los niveles de Fzd9 mediante Western blot. (E) Cuantificación de la intensidad de banda para Fzd9 respecto al control de carga GAPDH en los músculos electroporados con CRISPR-Fzd9 o con tdTomato como control. El gráfico muestra el promedio \pm SD para los carriles analizados en (D).

bó la eficiencia de silenciamiento del constructo CRISPR-Fzd9, donde se electroporó dicho constructo *in vivo* (Ojeda et al., 2020) y luego de 10 días, los músculos fueron colectados, homogenizados y los niveles de Fzd9 evaluados mediante Western blot. Como control se utilizó la electroporación con un constructo que codifica para la proteína fluorescente roja (tdTomato). Se determinó una electroporación eficaz en este músculo dada la alta proporción de fibras con fluorescencia roja al visualizar por microscopía de epifluorescencia previo a la homogenización del tejido (Figura 27C). Los análisis de Western blot revelaron que la banda entre 60 y 65 kDa correspondiente a Fzd9 disminuyó su abundancia en los músculos electroporados con el constructo CRISPR-Fzd9 en comparación con los músculos electroporados con el constructo que codifica para tdTomato (Figura 27D). Los análisis cuantitativos indicaron un grado de silenciamiento de Fzd9 sobre el 80% (Figura 27E), lo que corrobora que el constructo CRISPR-Fzd9 es una herramienta eficaz para disminuir los niveles de Fzd9 en el músculo esquelético adulto.

A continuación, se analizó la función de Fzd9 sobre la estabilidad postsináptica. Los AChRs pre-existentes fueron inicialmente teñidos con BTX-1. Al día siguiente, los niveles de Fzd9 en el músculo fueron incrementados o silenciados a través de la electroporación de los constructos mencionados (Figura 28). Finalmente, 7 días luego de la electroporación, los AChRs nuevos fueron teñidos con BTX-2 en los músculos previamente disecados y fijados (Figura 28A). La visualización a través de microscopía confocal mostró que en la condición control (tdTomato) no se alteró el recambio entre los AChRs (Figura 28B), evidenciado por la abundancia y distribución similares entre la señal de BTX-1 y BTX-2 (Figura 28B, columna izquierda). De manera interesante, nuestros resultados muestran que la expresión de Fzd9 afecta significativamente la estabilidad del dominio postsináptico. Por una parte, la sobreexpresión de Fzd9 generó una disminución en el recambio de los AChRs, evidenciado por un incremento significativo entre la proporción de la señal de BTX-1 respecto a la de BTX-2 sobre los AChRs residentes en las fibras electroporadas (Figura 28B, columna central). Los análisis cuantitativos indicaron que la relación BTX-2/BTX-1 fue ~20% menor en com-

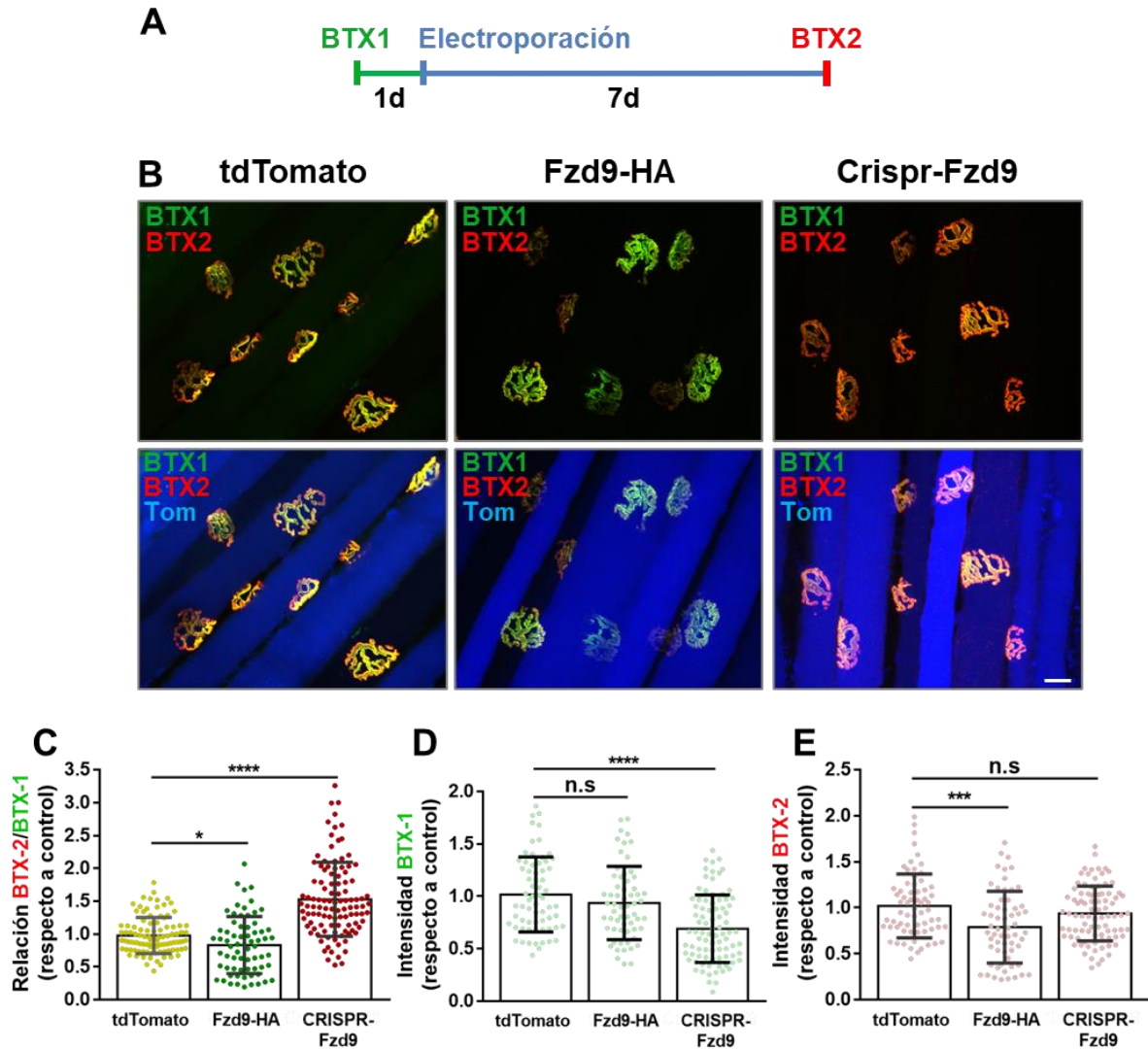


Figura 28: Análisis de la estabilidad de los AChRs al modificar los niveles de Fzd9 en el músculo.

(A) Los AChRs pre-existent fueron teñidos con BTX-1 y al día siguiente, el músculo LAL fue electroporado con constructos que codifican para Fzd9-HA, CRISPR-Fzd9 o tdTomato. Luego de 7 días, los músculos fueron colectados y teñidos con BTX-2. (B) Imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran la señal respectiva para BTX-1 (verde), BTX-2 (roja) o junto con las fibras electroporadas (azul). Barra: 20 μ m. (C) La relación de intensidad de fluorescencia promedio entre BTX-1 y BTX-2, (D) intensidad de BTX-1 o (E) intensidad de BTX-2 fue calculada respecto al grupo tdTomato (control) y graficada como el promedio \pm SD de tres experimentos independientes. Se analizaron entre 60-80 sinapsis por condición * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ al realizar test-t.

paración al grupo electroporado con tdTomato (* $p < 0,01$; test-t. Figura 28C). Por otra parte, la disminución de los niveles de Fzd9 conllevó al efecto inverso, es decir, a un incremento marcado en el grado de recambio de los AChRs, evidenciado por una tinción mayoritariamente roja en los AChRs presentes en las fibras electroporadas (Figura 28B, columna derecha). Consistentemente, la relación BTX-2/BTX-1 obtenida al disminuir los niveles de Fzd9 superó en un 50% el valor observado para el grupo control (**** $p < 0,0001$; test-t. Figura 28C). Al analizar la posible modulación de Fzd9 sobre distintas poblaciones de AChR de superficie, se determinó que la sobreexpresión de Fzd9 disminuyó en un ~20% la abundancia de los AChRs nuevos (Figura 28E, *** $p < 0,001$), sin alterar los AChRs pre-existentes (Figura 28D). Por su parte, el silenciamiento de Fzd9 no impactó en los AChRs nuevos (Figura 28E), pero sí promovió la remoción de los AChRs pre-existentes, evidenciado por la disminución significativa en la intensidad de BTX-1 al comparar con el grupo control (Figura 28D, **** $p < 0,0001$). En conjunto, estos datos indican que la estabilidad de los AChRs es dependiente de los niveles de Fzd9 y sugieren que la ausencia de Fzd9 disminuye la vida media de los AChRs en la superficie, mientras que los niveles incrementados de Fzd9 inhiben la síntesis o maquinaria de inserción de AChRs nuevos hacia los dominios postsinápticos en la unión neuromuscular madura.

3. Fzd9 se encuentra basalmente acoplado a la subunidad $G\alpha_o$ en el músculo esquelético adulto.

Desde el descubrimiento que indica que los receptores Frizzled presentan siete dominios transmembrana, su función no solo ha sido asociada en mediar la transducción de los ligandos Wnt hacia las posibles vías canónicas y no canónicas, sino que además se ha revelado que exhiben actividad de receptor acoplado a proteína G, GPCR (Schulte and Wright, 2018). De hecho, se ha descrito en sinapsis del sistema nervioso central que Fzd9 se encuentra formando un complejo junto a las subunidades $G\alpha_o$ y $G\beta\text{-}\gamma$, cuya interacción es reducida por la activación de $G\alpha_o$ mediada por Wnt-5a (Ramirez et al., 2016). Considerando que Fzd9 ha sido descrito como un receptor

postsináptico (Ramirez et al., 2016) y que además ejerce respuestas asociadas a proteína G, se evaluó si Fzd9 posee propiedades de GPCR en la sinapsis neuromuscular. Para esclarecer esta interrogante se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación, dirigidos específicamente hacia la subunidad $G\alpha_o$ en extractos obtenidos desde el músculo diafragma. De esta forma, una eventual interacción de $G\alpha_o$ con Fzd9 (Figura 29A) podría ser identificada a través análisis de inmunoprecipitación. Los resultados mostraron que en las fracciones inmunoprecipitadas con $G\alpha_o$ se observó una banda inmunorreactiva de ~65 kDa al utilizar un anticuerpo contra Fzd9 (Figura 29B; carril 3 y 4), mientras que la presencia de esta banda no fue observada en las fracciones que fueron sometidas al ensayo de precipitación en ausencia del anticuerpo contra $G\alpha_o$ (Figura 29B, carril 5 y 6). Estos resultados revelan que la precipitación de Fzd9 fue específica para la subunidad $G\alpha_o$.

En su conjunto, estos resultados demuestran que Fzd9 se localiza en la región sináptica de la unión neuromuscular y es requerido para mantener la estabilidad de los AChRs, posiblemente actuando como un GPCR a través de la subunidad $G\alpha_o$.

4. Los niveles y localización sináptica de Fzd9 son regulados por la denervación de la unión neuromuscular.

Considerando que el la expresión del transcrito de Fzd9 es dependiente del estado de inervación del músculo esquelético (Magnusson et al., 2005) y que el cambio en los niveles de Fzd9 alteró la estabilidad postsináptica (Figura 28), se evaluó el comportamiento de Fzd9 endógeno frente a un evento de inestabilidad postsináptica, como la denervación. Con este fin, los músculos LAL se sometieron a denervación por la resección de 4-5 mm de la rama del nervio facial que inerva a una hemi-región del músculo LAL, aproximación que evita la reinervación de la unión neuromuscular y permite así un daño sostenido en el largo plazo (Ojeda et al., 2020). Los músculos denervados se colectaron luego de 3, 15 o 30 días post daño. De manera interesante, los análisis de Western blot indicaron que los niveles de Fzd9 fueron regulados diferencialmente durante el transcurso de la dener-

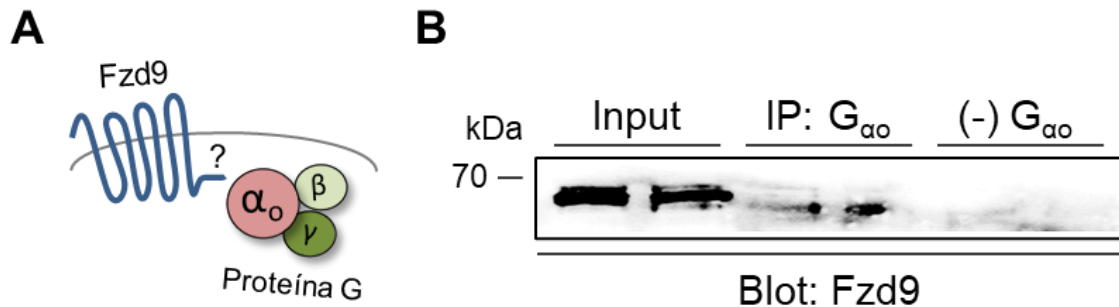


Figura 29: Análisis de interacción entre Fzd9 y la subunidad $G\alpha_o$

(A) Esquema representando a Fzd9 como un potencial receptor con función de receptor acoplado a proteína G y su interacción con la subunidad $G\alpha_o$ del complejo heterotrimérico de proteína G. (B) Se obtuvieron extractos proteicos desde el músculo diafragma des ratones adultos, donde el homogenado se incubó inicialmente con un anticuerpo contra la subunidad $G\alpha_o$ y luego con una combinación de proteína A/G acoplados a agarosa para realizar la co-inmunoprecipitación. Posteriormente, los extractos proteicos fueron eluidos y analizados por Western blot utilizando un anticuerpo contra Fzd9. Los dos primeros carriles (de izquierda a derecha) corresponden a la fracción de proteína total (input) previo a la incubación con el anticuerpo contra la subunidad $G\alpha_o$. El tercer y cuarto carril corresponden a la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo contra la subunidad $G\alpha_o$, mientras que el quinto y sexto carril corresponden al control negativo, donde las fracciones se incubaron solamente con proteína A/G acoplada a agarosa. Experimento realizado 2 veces de forma independiente.

vación (Figura 30A), observándose a los 3 días luego del daño una banda de ~50% menor abundancia en comparación al músculo contralateral (Figura 30A y 30B), mientras que al transcurrir 30 días luego del daño, se observó un incremento en los niveles de Fzd9 (Figura 30A y 30B). Por su parte, la localización de Fzd9 evaluada por inmunofluorescencia mostró que la denervación alteró la distribución de Fzd9 en el músculo esquelético (Figura 30C), donde se observó una pérdida en la localización sináptica de Fzd9 tanto a los 14 como a los 30 días luego del daño (Figura 30C, recuadro amarillo). Consistentemente, a los 30 días se observó un incremento en la inmunotinción de Fzd9 la que, a diferencia del grupo control, se distribuyó a través de toda la fibra muscular (Figura 30C). En conjunto, estos datos sugieren que tanto el posicionamiento sináptico como los niveles de Fzd9 son requeridos para mantener la estabilidad del dominio postsináptico.

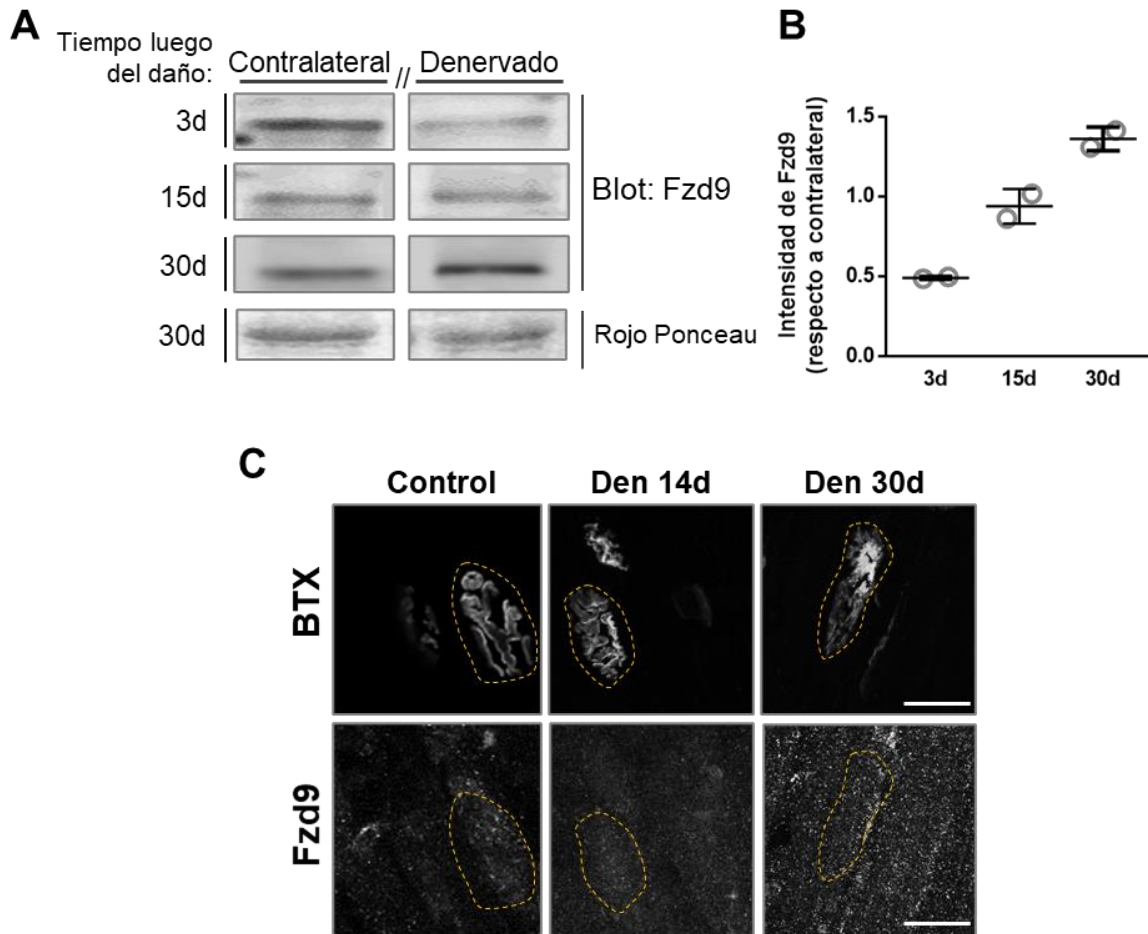


Figura 30: Análisis de los niveles y localización de Fzd9 luego de la denervación del músculo esquelético adulto.

(A) Se realizaron análisis de Western blot utilizando extractos proteicos obtenidos desde el músculo LAL de ratones adultos denervados por 3, 15 o 30 días, utilizando un anticuerpo contra Fzd9 tanto para los carriles con músculos denervados (columna derecha) como los músculos contralaterales sin daño (columna izquierda). Se muestran las bandas de rojo ponceau como control de carga en la condición 30 días. (B) La intensidad de la banda de Fzd9 en el músculo denervado fue cuantificada respecto al músculo contralateral para cada tiempo de denervación. El gráfico muestra el promedio \pm SD de dos experimentos independientes por condición para los datos obtenidos a partir de (A). (C) Se realizaron análisis de inmunohistoquímica en el músculo LAL denervado o control, utilizando un anticuerpo contra Fzd9 en conjunto con el marcaje de los AChRs (BTX). Las muestras fueron visualizadas mediante microscopía confocal. La región en amarillo demarca la región sináptica de los músculos analizados. Se visualizaron 20 sinapsis por condición. Barra: 25 μ m.

Capítulo IV: Litio, un inhibidor de la quinasa GSK3- β , regula diferencialmente la estabilidad de los AChRs *in vivo*.

1. Litio inhibe el recambio de los AChRs en uniones neuromusculares inervadas.

Distinta evidencia vincula la activación de la vía Wnt canónica con la desorganización de la unión neuromuscular en etapas adultas (Aviles et al., 2014; Kurimoto et al., 2015; Magnusson et al., 2005; Mella et al., 2019; Messeant et al., 2015; Shen et al., 2018; Svensson et al., 2008; Zhao et al., 2017). Sin embargo, los mecanismos celulares que subyacen a este efecto específicamente sobre los AChRs no han sido aún resueltos. Dado que existen variadas combinaciones entre ligandos Wnt y receptores Fzd que pueden gatillar la activación de la vía Wnt/ β -catenina, una alternativa es activar esta vía de manera farmacológica mediante la inhibición de la quinasa GSK3- β a través de LiCl, impidiendo tanto la fosforilación como la consecuente degradación de β -catenina, lo que resulta en la activación de la vía. (Abu-Baker et al., 2013; Gideons et al., 2017; Klein and Melton, 1996; Stambolic et al., 1996). Al ser la unión neuromuscular una sinapsis excitatoria, en conjunto a que la maquinaria postsináptica se ve afectada por la activación de la vía Wnt/ β -catenina, se analizó el efecto que presenta litio específicamente sobre la estabilidad de los AChRs.

Se inyectó de manera subcutánea una solución de LiCl 50 mM sobre el músculo LAL diariamente durante 10 días. Al tercer día, se realizó el primer marcaje con BTX-1 para efectuar el ensayo de doble BTX (Figura 31A). Al día 10 de tratamiento (donde se alcanzó un tiempo de recambio de 7 días), los músculos fueron disecados, fijados y los AChRs “nuevos” fueron teñidos con BTX-2. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal muestran que los dominios postsinápticos del grupo con tratamiento control (NaCl) presentaron una coloración comparable entre la tinción verde y roja (Figura 31B), indicando una tasa de recambio similar al esperado a los 7 días. Por otra parte, en el grupo tratado con LiCl, se observó que los AChRs exhibieron una tinción preferentemente verde (Figura 31B). Análisis subsecuentes de la relación en la intensidad de fluorescencia de BTX-2 y BTX-1 indican que litio indujo una disminución de 47,5% en el recambio

de los AChRs en comparación al grupo tratado con NaCl (Figura 31C). En una primera noción, estos resultados abarcan dos posibilidades respecto al efecto de litio sobre el recambio de los AChRs: que exista un incremento en la subpoblación de AChRs “pre-existentes” o que disminuya la proporción de AChRs “nuevos” (o ambas opciones). Por lo tanto, se analizó la contribución de cada subpoblación de AChRs en el componente postsináptico a través de la comparación entre las intensidades de fluorescencia de BTX-1 o de BTX-2 (Figura 31D y 31E, respectivamente). Los resultados indican que el tratamiento con LiCl conllevó a un incremento en la proporción de los AChRs pre-existentes, dado por la mayor intensidad de fluorescencia promedio observada respecto al control ($53,86 \pm 2,99$ vs $36,83 \pm 2,23$ vs U.A., respectivamente) (Figura 31D). Por otra parte, se observó que la subpoblación de AChRs nuevos disminuyó en un ~30% en los dominios postsinápticos de animales tratados con LiCl respecto al grupo control (Figura 31E). Finalmente, para evaluar la posibilidad de que el tratamiento con LiCl resultara en un incremento en el número de AChRs de superficie en las estructuras postsinápticas, se determinó la densidad de los AChRs como la sumatoria de las señales de fluorescencia de BTX-1 y BTX-2 (Figura 31F). Se obtuvo que el tratamiento con LiCl o NaCl no resultó en diferencias en la tinción total de BTXs (Figura 31F), alcanzándose valores de $86,63 \pm 4,28$ y $90,46 \pm 4,16$ U.A. ($p > 0,05$), respectivamente. Estos resultados revelan que el tratamiento con litio ejerce un efecto inhibitorio sobre el recambio, pero no sobre la densidad, de los AChRs en uniones neuromusculares normalmente inervadas.

2. Litio no altera la organización morfológica del dominio postsináptico de la unión neuromuscular madura.

El recambio de los AChRs está severamente comprometido en situaciones patológicas tales como la denervación de la sinapsis neuromuscular como también en patologías asociadas al músculo

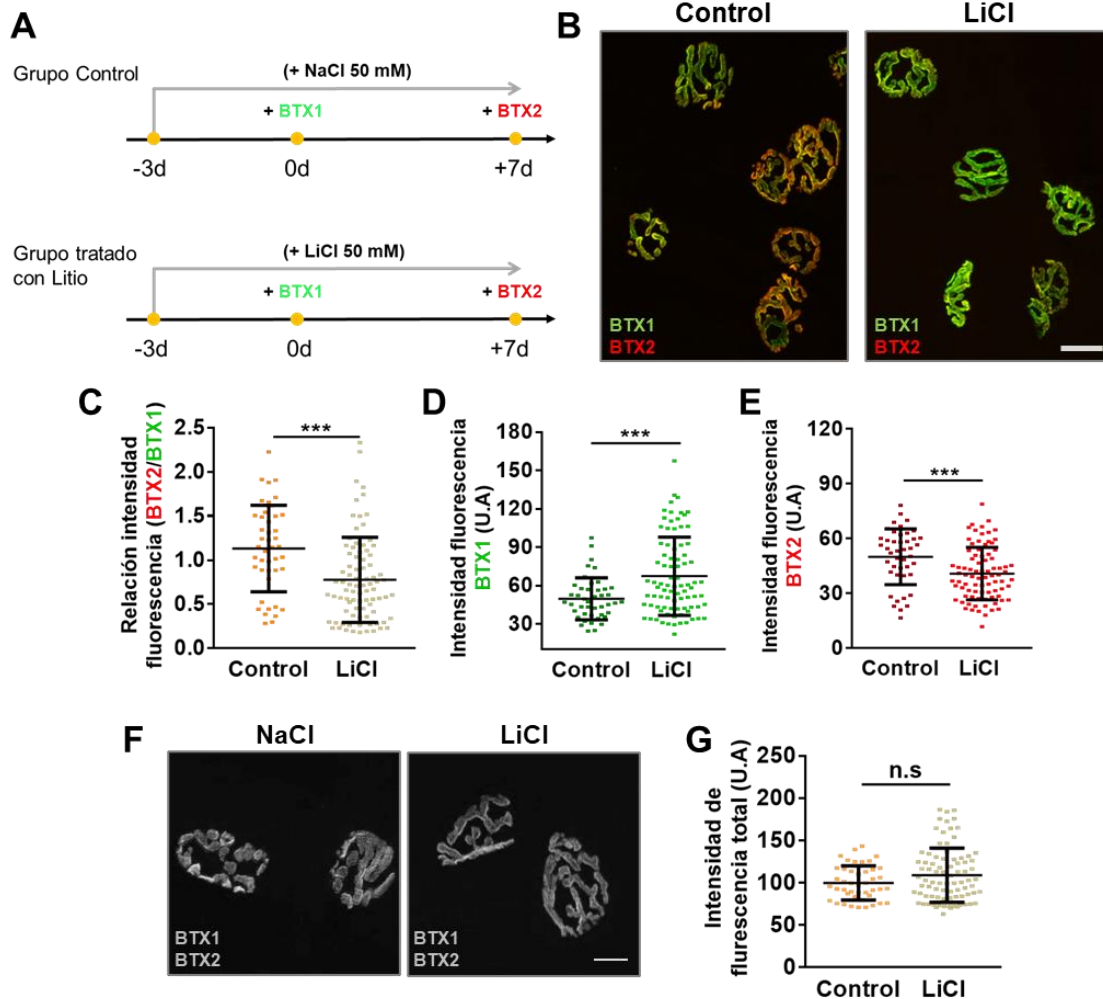


Figura 31: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares maduras.

(A) Esquema representa la metodología para analizar el efecto de litio sobre el recambio de los AChRs. Se realizó una inyección de LiCl o NaCl subcutánea por 10 días. Al tercer día de este tratamiento, se inició el análisis del recambio de AChRs con la inyección de BTX-1 (verde) *in vivo*. Posterior al tiempo de recambio (7 días), los AChR “nuevos” fueron teñidos con BTX-2 (rojo). (B) Adquisición de imágenes mediante microscopía confocal para la señal de BTX-1 y BTX-2 en cada dominio postsináptico. (C) Cuantificación en la relación de intensidad de BTX-2 sobre BTX-1 en cada pretzel. Se determinó la abundancia de cada subpoblación de AChRs mediante la medición de intensidad de fluorescencia promedio para (D) BTX-1 y (E) BTX-2. (F) Imagen de microscopía confocal exhibiendo la sumatoria de la señal BTX-1 y BTX-2 en gris. (G) La densidad de los AChRs en la superficie fue calculada y graficada como el promedio \pm SD (N=3). *** $p < 0,001$ obtenido al realizar el análisis estadístico de t-student. Barra: 20 μ m

esquelético, ambas también relacionadas a cambios importantes en la morfología postsináptica (Strack et al., 2015). Para evaluar si el efecto de litio sobre el recambio de los AChRs también afectó la organización global de las distintas subpoblaciones de AChRs en las sinapsis neuromusculares, se realizó un análisis morfométrico sistemático del dominio postsináptico en los grupos previamente tratados con LiCl o NaCl. Los resultados muestran que el tratamiento con LiCl no arrojó diferencias en el perímetro, área y diámetro de la placa motora, perímetro y área de los agregados del AChRs, ni en la compactación de los AChRs, definida como el área de la placa motora que ocupan los AChRs (Figura 32 A-F). Respecto a la placa motora, el diámetro abarcó valores cercanos a 30 μm , el perímetro a 90 μm y el área a 500 μm^2 respectivamente para cada subpoblación de AChRs (Figura 32A-C). A su vez, las mediciones de los parámetros correspondientes a los agregados del AChRs exhibió valores promedio de $\sim 300 \mu\text{m}^2$ de área (Figura 32D), mientras que el perímetro presentó valores cercanos a los 250 μm (Figura 32E). Finalmente, la compactación de los AChRs mostró un grado cercano al 60% (Figura 32F), lo que es característico de las morfologías tipo-pretzel observadas en etapas adultas (Jones et al., 2016). Por otra parte, para analizar en detalle si litio ejerce un efecto en la organización presináptica, las zonas activas del axón motor fueron teñidas junto a los AChRs pre-existentes mediante anti-piccolo y 488-BTX (BTX1), respectivamente, y las sinapsis neuromusculares fueron visualizadas mediante Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM). Tal como se ha reportado, piccolo se distribuyó en un patrón punteado de manera intercalada entre las estrías enriquecidas con AChRs dentro del dominio postsináptico (Figura 33) (Chen et al., 2012; York and Zheng, 2017). Respecto al efecto de litio, se observó que las uniones neuromusculares tanto de los ratones tratados con NaCl o con LiCl exhibieron una distribución y densidad similar en las *punctas* de piccolo, revelando que el tratamiento con litio no altera significativamente la organización presináptica (Figura 33). Estos resultados sugieren que la disminución del recambio de los AChRs inducida por litio (Figura 31) no fue debida a un incremento en el número o distribución de los AChRs en los aparatos postsinápticos maduros (Figura 31G y 32), lo que abre la posibilidad de que litio genere una alteración en el tráfico de los AChRs.

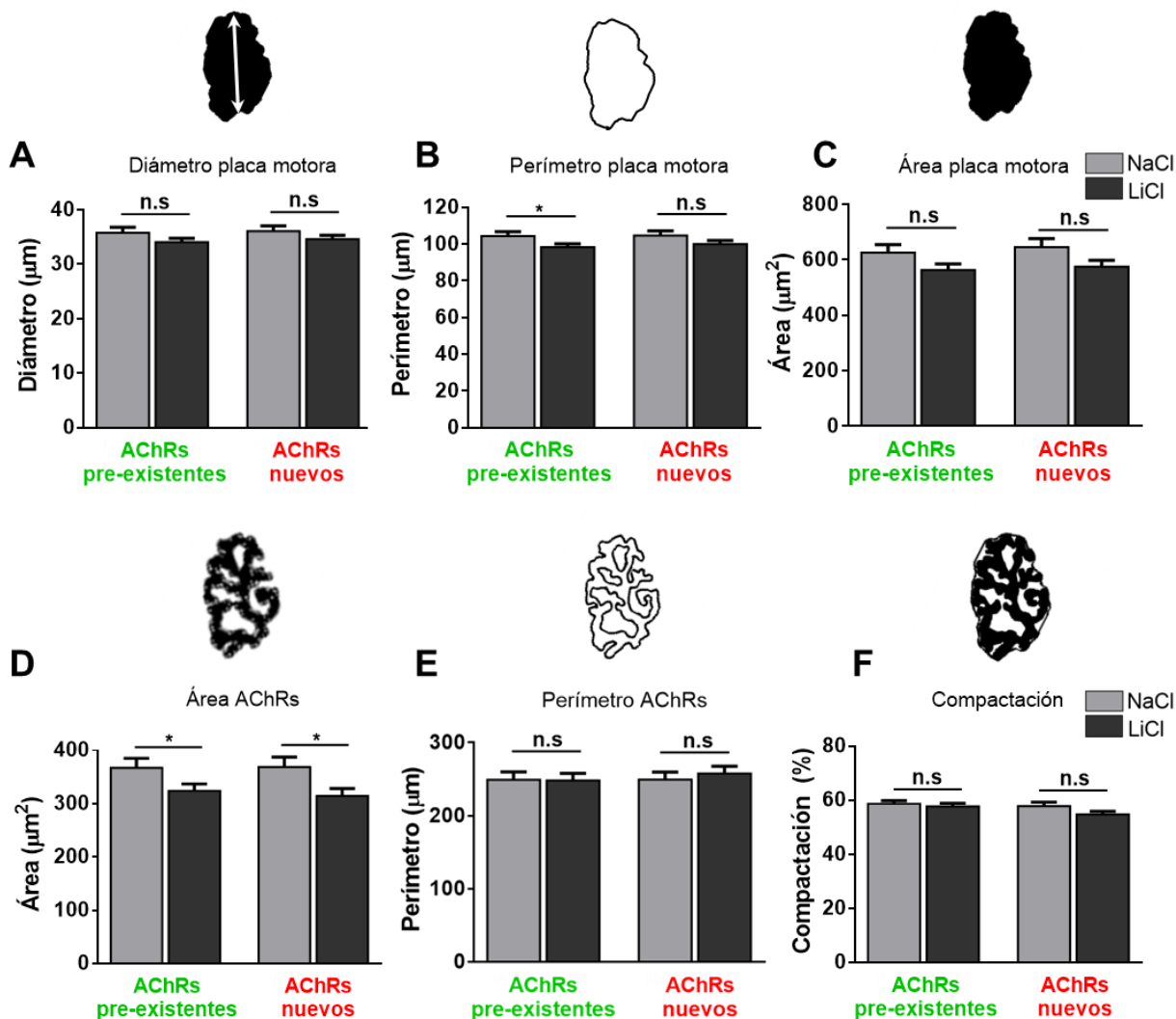


Figura 32: Análisis del efecto de litio sobre la distribución de los AChRs en uniones neuromusculares maduras.

Músculos LAL de animales tratados con NaCl o LiCl durante 10 días fueron sometidos al ensayo de doble BTX y analizados por microscopía confocal. La distribución de los AChRs se determinó midiendo el (A) diámetro (B) perímetro y (C) área de la placa motora, como también el (D) área, (E) perímetro y la (F) compactación de los agregados del AChR. Sobre cada gráfico se esquematiza el parámetro a ser evaluado. En el eje X, las letras en color verde indica el análisis para los AChRs pre-existent, mientras que la letra roja representa el análisis de los AChRs nuevos. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente. * $p < 0,05$; n.s: $p > 0,05$ al realizar test-t entre la condición NaCl y LiCl dentro de cada subpoblación de AChRs.

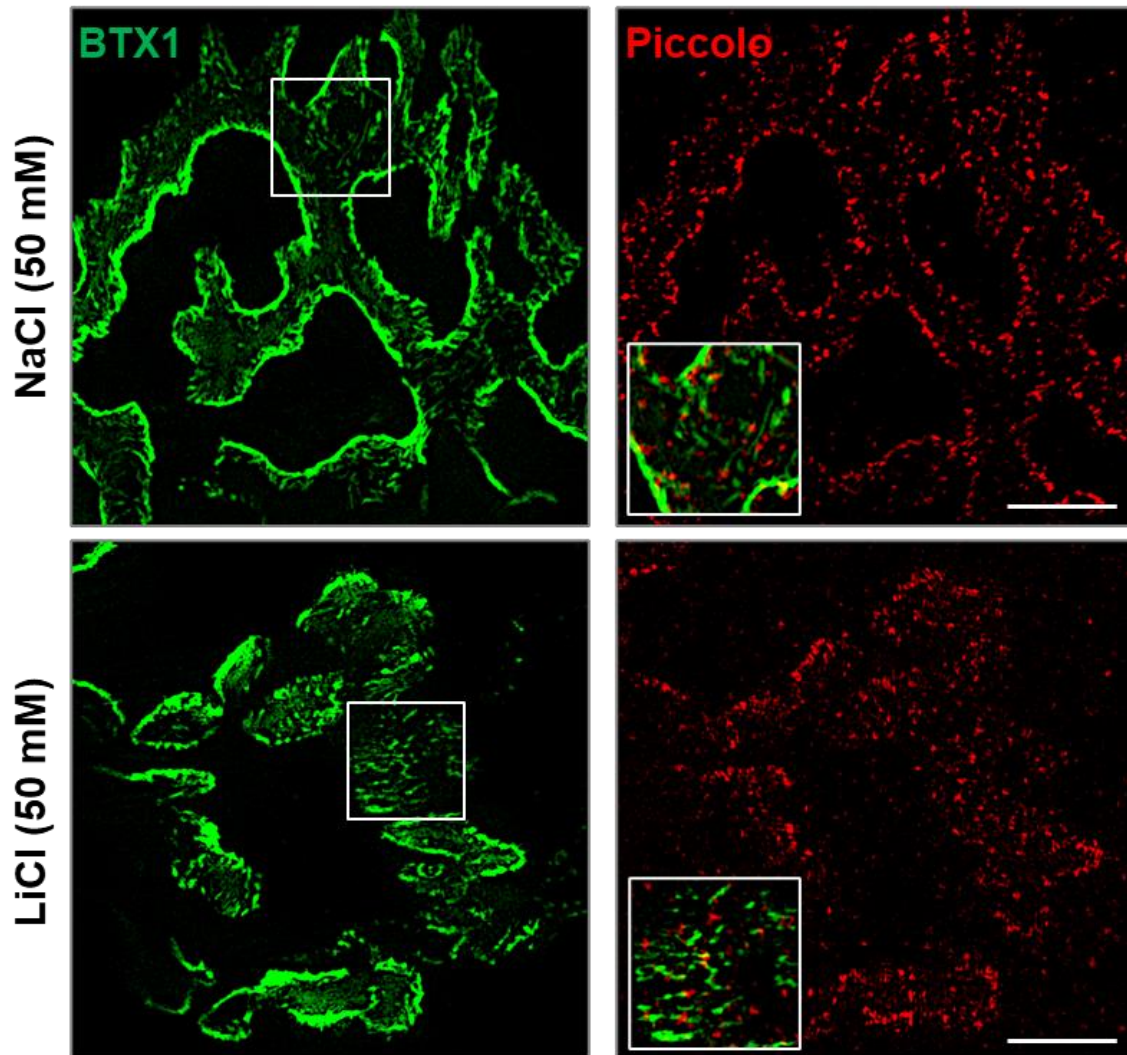


Figura 33: Litio no altera significativamente la organización del dominio pre- y postsináptico.

Agregados del AChR pre-existentes en uniones neuromusculares del músculo LAL fueron teñidos *in vivo* con 488Alexa-BTX (BTX1, verde) en animales tratados con NaCl o LiCl. Luego de 7 días, los músculos fueron disecados, fijados y procesados para inmunofluorescencia con anti-piccolo (rojo). La aposición entre el componente pre- y postsináptico de la unión neuromuscular fue analizada mediante Microscopía de Iluminación Estructural (SIM). En la columna derecha, se muestra la magnificación y superposición del cuadrado blanco para cada condición. Barra = 5 μ m.

3. Litio inhibe la internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.

Para evaluar en forma directa si litio regula la internalización de los AChRs se utilizaron células CHO-K1/A5, un modelo heterólogo que expresa el AChR muscular maduro (que contiene el pentámero de subunidades $\alpha_2\beta\delta\epsilon$). Este modelo ha facilitado la descripción de diversos factores que alteran tanto la internalización como la estabilidad de los AChRs en la superficie celular (Baier et al., 2010; Kumari et al., 2008; Roccamo et al., 1999). Para evaluar el efecto de litio sobre la internalización de AChRs, células CHO-K1/A5 fueron incubadas durante 16 horas con concentraciones crecientes de LiCl (0, 20 y 50 mM). Posteriormente, los AChRs de superficie fueron marcados con BTX-1 (555-BTX, pseudocolor verde) a 4 °C. Después de retornar las células a 37 °C para inducir la internalización de los AChRs por 1 hora (Figura 34A), los AChR de superficie fueron marcados con BTX-2 (488-BTX, pseudocolor rojo) antes de fijar las células. Los análisis por microscopía de epifluorescencia (realizados con los mismos parámetros de adquisición) mostraron que el tratamiento con 20 o 50 mM de LiCl generó un incremento gradual en la abundancia de los AChRs localizados en la superficie de las células al compararlo con la situación control (Figura 34A, panel izquierdo). A su vez, si bien no se observó de forma evidente cambios en la intensidad de fluorescencia para la tinción de BTX-2 (Figura 34A, panel del medio), la superposición de los canales verde y rojo mostró que a medida que incrementa la concentración de LiCl, el patrón de coloración inicial mayoritariamente rojo en las células (0 mM) adquirió una coloración amarilla (20 mM) hasta observarse una coloración principalmente verde en las células tratadas con LiCl 50 mM (Figura 34A, panel derecho). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia para BTX-1 mostró un incremento en la señal de BTX-1 desde $42,75 \pm 2,93$ (LiCl 0 mM) hasta $55,66 \pm 2,65$ o $56,32 \pm 3,26$ U.A (**p < 0,01) tras el tratamiento con 20 o 50 mM de LiCl, respectivamente (Figura 34B). Por su parte, la incorporación de AChRs nuevos disminuyó en un ~15% al utilizar una concentración de LiCl 50 mM (Figura 34C). Finalmente, el análisis en la relación de intensidades de fluorescencia BTX-1/BTX-2

en la superficie indicó que LiCl generó incrementos de ~30% y ~40% en tratamientos con 20 y 50 mM, respectivamente (Figura 34D).

Para determinar si el incremento en los AChRs marcados inicialmente en la superficie (BTX-1) fue debido a que estos permanecieron retenidos por un mayor tiempo en la superficie o a causa de un incremento en el número total de receptores ante el tratamiento con litio, se determinó la densidad de AChRs en la superficie de células CHO-K1/A5 (Figura 35A). Con este fin, las células se incubaron por 16 horas con 0, 20 o 50 mM de LiCl; posterior a una incubación a 4°C en ausencia de BTX por 1 hora, finalmente los AChRs de superficie fueron marcados con 488-BTX. Las imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia no mostraron una diferencia aparente entre la abundancia de AChRs de superficie entre las células sometidas a las distintas condiciones (Figura 35B). Más aun, la cuantificación en la intensidad de fluorescencia de 488-BTX en la superficie indicó que, independiente de la concentración de LiCl con las que fueron tratadas las células, los valores en la señal de 488-BTX fueron similares ($p > 0,05$) (Figura 35C). En su conjunto, estos resultados revelan que en lugar de afectar la densidad de AChRs de superficie, litio inhibe su internalización. Además, la disminución en la remoción de los AChRs desde la superficie celular mediada por litio conlleva a la reducción en el recambio de estos receptores.

4. Litio incrementa el recambio de los AChRs en la unión neuromuscular luego del daño.

Considerando que el tratamiento con litio indujo una inhibición en el recambio de los AChRs producto de la disminución en su internalización, una posible interpretación es que litio incremente la estabilidad de los AChRs en uniones neuromusculares normalmente inervadas. Una conjetura interesante que emerge de estos resultados es que la incubación con litio disminuya la tasa de recambio acelerada producto del daño en la unión neuromuscular. Para evaluar esta idea, los animales se trataron diariamente con una inyección subcutánea de LiCl 50 mM sobre el músculo LAL durante

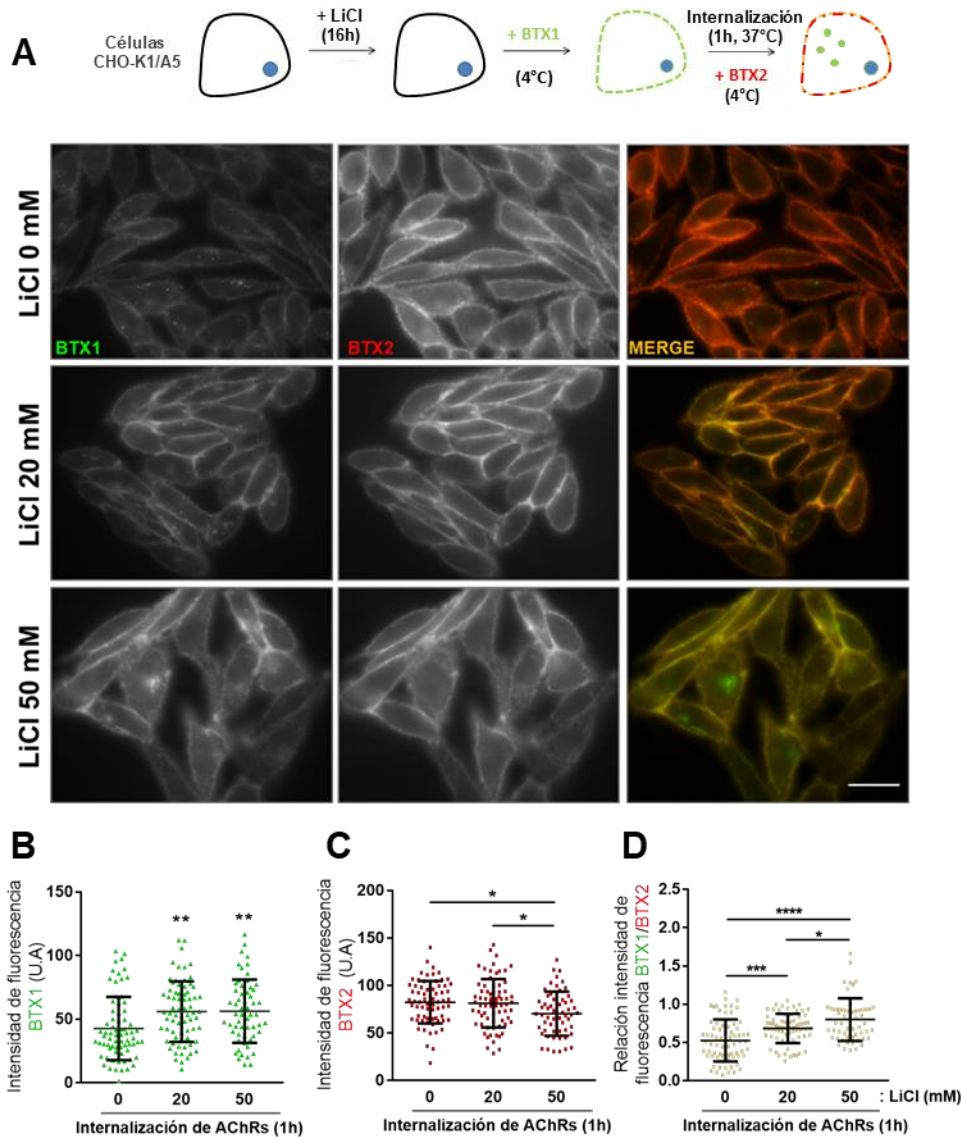


Figura 34: Análisis del efecto de litio sobre la internalización de los AChRs en células CHO-K1/A5.

(A) Diagrama de la aproximación experimental. Inicialmente, las células fueron tratadas con 0, 20 o 50 mM de LiCl por 16 horas y luego se incubaron en hielo con BTX-1 (verde) durante 1 hora. Los AChRs se internalizaron a 37°C y los receptores nuevos fueron marcados con BTX-2 (rojo). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. La intensidad de fluorescencia promedio en la superficie para (B) BTX-1 o (C) BTX-2, junto a (D) la relación en la señal BTX-1/BTX-2 fue determinada. Los gráficos representan el promedio \pm SD de dos experimentos independientes. Un total de 70 células fueron analizadas por condición. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA de una vía seguido del post-test Tukey).

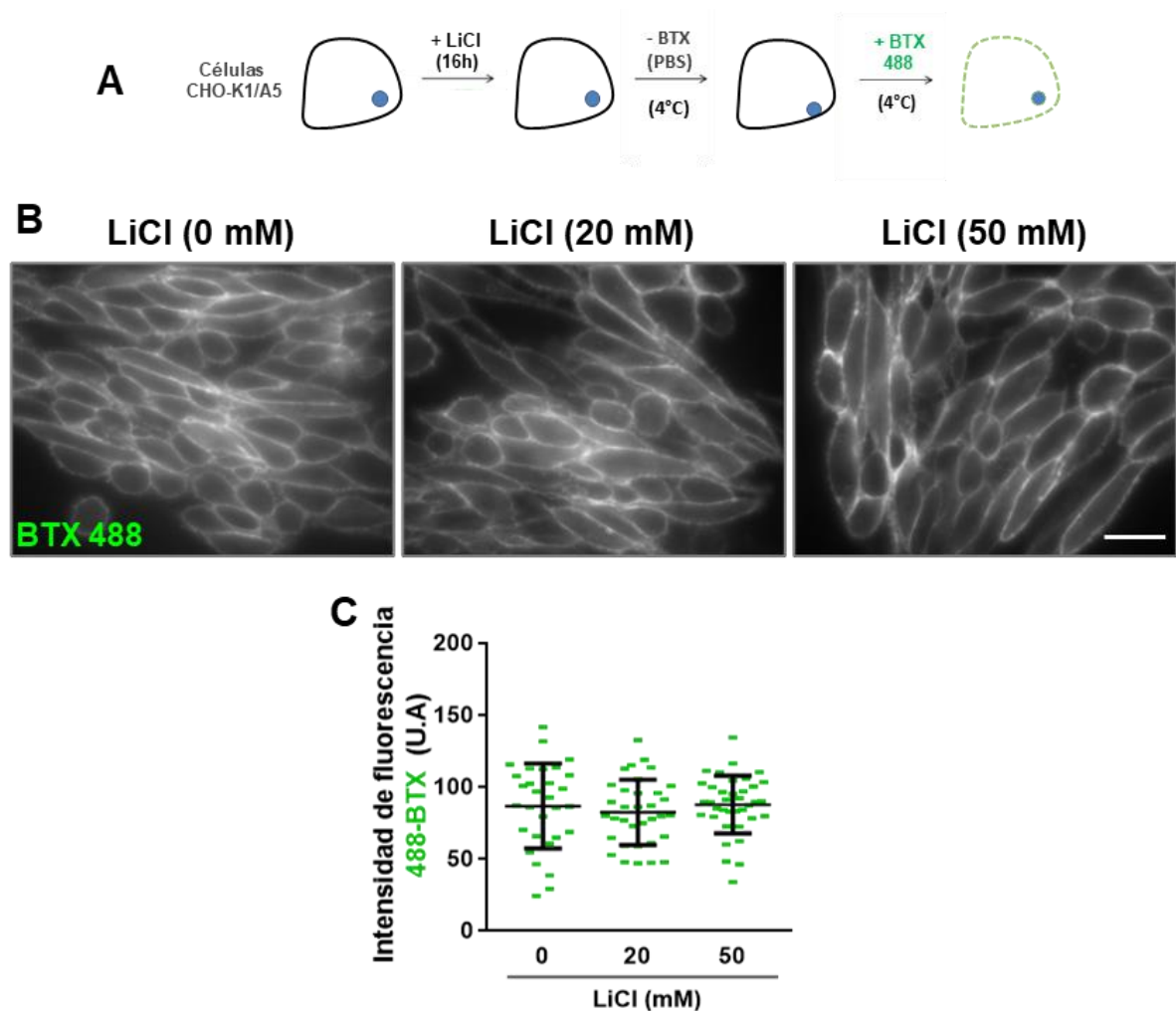


Figura 35: Análisis del efecto de litio sobre la densidad de los AChRs en células CHO-K1/A5.

(A) Diagrama de la aproximación experimental. Inicialmente, las células CHO-K1/A5 fueron tratadas con 0, 20 ó 50 mM de LiCl por 16 horas y luego se incubaron en hielo con PBS (- BTX) durante 1 hora. Los AChRs que se localizaron en la superficie celular fueron marcados con 488-BTX (verde). (B) Las imágenes fueron adquiridas por microscopía de epifluorescencia. (C) La intensidad de fluorescencia promedio de los AChRs en la superficie de las células fue determinada mediante Image J. Los gráficos representan el promedio \pm SD de dos experimentos independientes. $p > 0,05$ al realizar ANOVA de una vía seguido del post-test Tukey.

8 días. Al segundo día de este tratamiento, se realizó la denervación del músculo a través de la resección de un segmento del nervio facial. Para el análisis de recambio, los AChRs pre-existentes fueron incubados con BTX-1 y, transcurridos 3 días desde la denervación, los AChRs nuevos fueron marcados el mismo día de la última administración de LiCl con BTX-2 (Figura 36A). De manera interesante, se observó que la denervación indujo un incremento pronunciado en el recambio de AChRs tanto en el grupo tratado con NaCl como en el tratado con LiCl en comparación con el músculo contralateral (Figura 36B, comparar fila superior vs fila inferior). Por su parte, el tratamiento con litio generó un aumento en el grado de recambio de los AChRs en los músculos denervados en comparación al grupo tratado con NaCl, tal como se observa por el preferente marcaje rojo en los dominios postsinápticos del grupo denervado tratado con LiCl frente a la tinción de color amarillo observada en el grupo denervado control (Figura 36B). Los análisis cuantitativos mostraron que el grado de incorporación de nuevos AChRs de superficie respecto a los AChRs pre-existentes (BTX-2/BTX-1) fue 1,6 veces mayor en el grupo tratado con LiCl respecto al grupo control (Figura 36C). Estos resultados indican que el tratamiento con litio acentúa la tasa de recambio de los AChRs generada por la denervación.

Con el fin de estudiar si el incremento en el recambio de los AChRs mediado por litio se debió a una incorporación exacerbada de nuevos AChRs o a un incremento en la remoción y consecuente degradación de los AChRs pre-existentes, se comparó la abundancia de ambas subpoblaciones de AChRs. Se observó que el tratamiento con LiCl resultó en un aumento en la cantidad de AChRs pre-existentes ($35,27 \pm 1,92$ U.A) respecto al grupo control ($29,79 \pm 1,32$ U.A; $*p < 0,05$, test-t) (Figura 36D), similar a una condición sin daño en las uniones neuromusculares. A su vez, el tratamiento con LiCl generó el aumento en la incorporación de nuevos AChRs, donde la intensidad de fluorescencia para BTX-2 fue 1,7 veces mayor que frente al tratamiento con NaCl (Figura 36E). Estos resultados apoyan la idea de que la inhibición en la internalización de los AChRs pre-existentes generada por litio (Figura 36D) junto al incremento en la incorporación de AChRs nue-

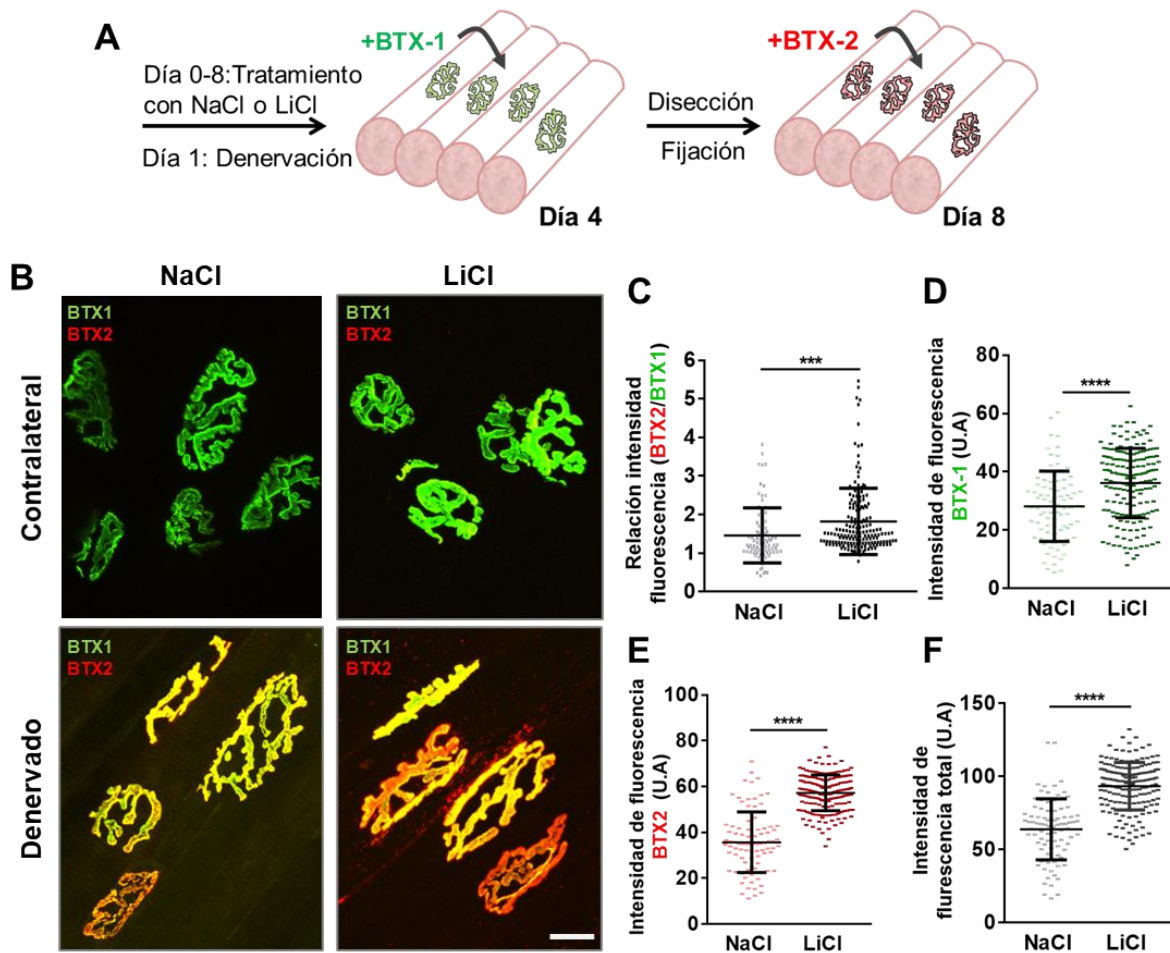


Figura 36: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares denervadas.

(A) Esquema representando la aproximación experimental, donde se administró subcutáneamente 50 mM de LiCl o NaCl por 8 días. Al segundo día de este tratamiento, se marcó *in vivo* con BTX-1 (verde). Transcurridos 3 días desde el 1° marcaje, el músculo LAL fue denervado y los AChR “nuevos” fueron teñidos con BTX-2 (rojo) 4 días luego de la denervación, tiempo en que también culminó el tratamiento. (B) Adquisición de imágenes mediante microscopía confocal para la señal de BTX-1 y BTX-2 en cada dominio postsináptico. (C) Cuantificación en la relación de intensidad de fluorescencia BTX-2/ BTX-1. Se determinó la abundancia de cada subpoblación de AChRs midiendo intensidad de fluorescencia para (D) BTX-1 y (E) BTX-2, (F) o la densidad de los AChRs de superficie. Los datos fueron graficados como el promedio \pm SD (N=3). *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$, obtenidos al realizar el análisis estadístico de t-student. Barra: 20 μ m.

vos nuevos podría afectar la densidad de AChRs que están presentes en la superficie de los dominios postsinápticos denervados. Al cuantificar la sumatoria de intensidades de fluorescencia de BTX-1 y BTX-2 se observó que el tratamiento con litio indujo un incremento significativo en la densidad de AChRs que se presentaron en la superficie (Figura 36F) (****p < 0,0001; test-t). Estos resultados sugieren que además de inhibir la internalización de los AChRs, el tratamiento con litio resultó en un incremento en la incorporación de AChRs de superficie. De esta forma, litio aumentaría la disponibilidad de los AChRs en los dominios postsinápticos luego del daño en la unión neuromuscular.

5. Litio induce la aparición de micro-agregados del AChR y reduce la estabilidad de los agregados ectópicos del AChR en uniones neuromusculares denervadas.

En conjunto a cambios en la estabilidad postsináptica, la denervación de la fibra muscular también se caracteriza por la aparición de agregados ectópicos del AChRs (Fumagalli et al., 1990; Levitt and Salpeter, 1981). Dado que el tratamiento con litio resultó en un incremento en la disponibilidad de AChRs en las regiones sinápticas de uniones neuromusculares denervadas (Figura 36), se procedió a evaluar si litio ejerce un efecto sobre la formación y estabilidad de los agregados ectópicos de AChRs. Para ello, músculos denervados tratados con LiCl o con NaCl, cuyo recambio de AChRs fue determinado a través del ensayo de doble BTX, fueron observados mediante microscopía confocal. Se observó que la denervación generó la aparición de agregados ectópicos del AChR, los cuales presentaron un menor tamaño en comparación a los aparatos postsinápticos maduros de morfología tipo pretzel. Los agregados ectópicos exhibieron principalmente morfologías tipo placa y ovaladas (Figura 37C, panel superior). Notablemente, el tratamiento con LiCl generó la aparición de microagregados del AChR, definidos como una acumulación de AChRs que forman pequeñas *puncta* y que se distribuyen cercanamente entre sí (Figura 37C, panel inferior). Estos microagregados se distribuyeron específicamente en las regiones no sinápticas, abarcando distintas áreas

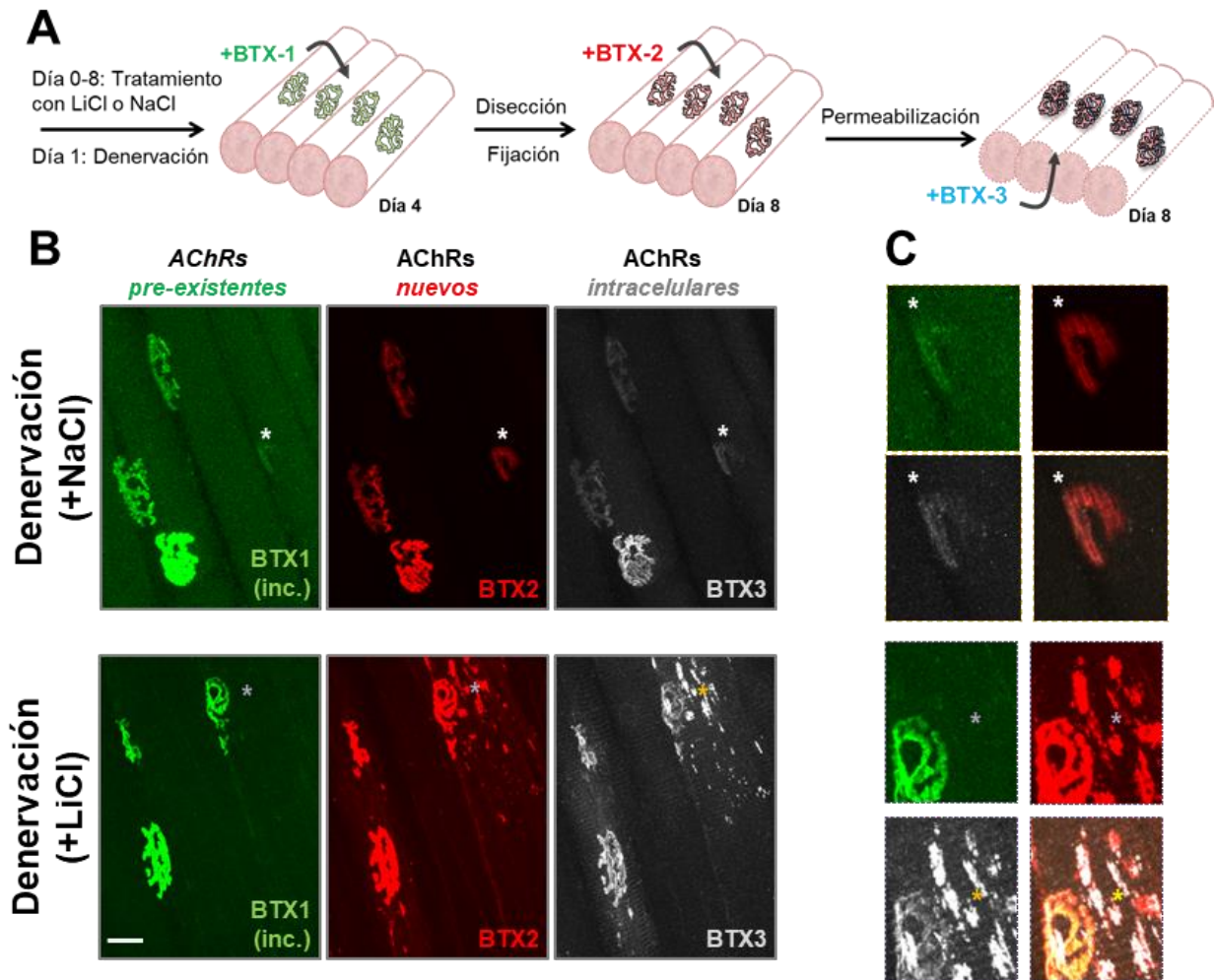


Figura 37: Análisis del efecto de litio sobre el recambio y densidad de los AChRs en uniones neuromusculares luego de la denervación.

(A) Esquema representando la aproximación experimental, donde se administró subcutáneamente 50 mM de LiCl o NaCl por 8 días. Al segundo día de este tratamiento, se incubó *in vivo* con BTX-1 (verde) y transcurridos 3 días desde el primer marcaje, el músculo LAL fue denervado. Los “nuevos” AChR fueron teñidos con BTX-2 (rojo) 4 días post-denervación, tiempo en que también culminó el tratamiento. Adicionalmente, se incorporó un tercer marcaje para la subpoblación de AChRs intracelulares (BTX-3, blanco). (B) Visualización mediante microscopía confocal revelando AChRs en regiones sinápticas y no-sinápticas para ambas condiciones. El asterisco indica la presencia de agregados ectópicos del AChRs, los cuales fueron magnificados y mostrados en detalle en (C). Barra: 20 μ m. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. BTX-1 (inc.) indica la ganancia digital para corroborar la ausencia de la tinción de BTX-1 frente al tratamiento con LiCl.

de la fibra muscular (Figura 37B, panel inferior), como también presentaron un menor tamaño respecto a los agregados ectópicos del AChRs (acumulación de AChRs con morfología tipo placa, tipo-C o tipo-O), obtenidos tras la denervación de músculos con tratamiento control (NaCl) (Figura 37C). Respecto a la estabilidad de los agregados ectópicos, el tratamiento con LiCl resultó en una tinción exclusiva para BTX-2 (Figura 37B, asterisco en panel inferior). Esta observación contrasta con el marcaje obtenido en la situación control, ya que aun cuando los agregados ectópicos del AChR presentaron un marcaje para BTX-2, un evidente remanente fue también observado para el marcaje con BTX-1 (Figura 37B, asterisco en panel superior). Estos resultados revelan que el tratamiento con litio desestabiliza a los AChRs no-sinápticos.

Para establecer si el mecanismo que genera los microagregados de AChRs inducidos por litio es consecuencia de una estabilidad reducida (i.e. un reducido marcaje de BTX-1) o de la incorporación de AChRs provenientes desde el compartimento intracelular, se incorporó un tercer marcaje, donde los AChRs intracelulares fueron teñidos con 647-BTX (BTX-3) luego de la permeabilización del tejido (Figura 38A). Los análisis mostraron que la marca de BTX-3 se distribuyó tanto en agregados del AChR sinápticos como ectópicos luego del daño al nervio en el grupo control (Figura 38B y C), incluyendo a las microestructuras inducidas por LiCl (Figura 38C). Análisis en detalle sobre la distribución de estos microagregados mostraron un mayor grado de co-localización con los AChRs intracelulares (Figura 38B, color magenta) que con los agregados ectópicos (Figura 38B, color azul), sugiriendo que los microagregados inducidos por litio corresponden a AChRs que surgen desde el interior de la fibra muscular. Medidas del volumen de dichas estructuras indicaron que, en su gran mayoría, estos microagregados abarcaron un valor $\leq 5 \mu\text{m}^3$, distante a los $1.500 \mu\text{m}^3$ que exhibe una estructura tipo-pretzel (Figura 38C).

Finalmente, para confirmar que los agregados ectópicos y los microagregados de AChRs se localizan en regiones no-sinápticas, se utilizó un anticuerpo dirigido contra la proteína S100 β , el que

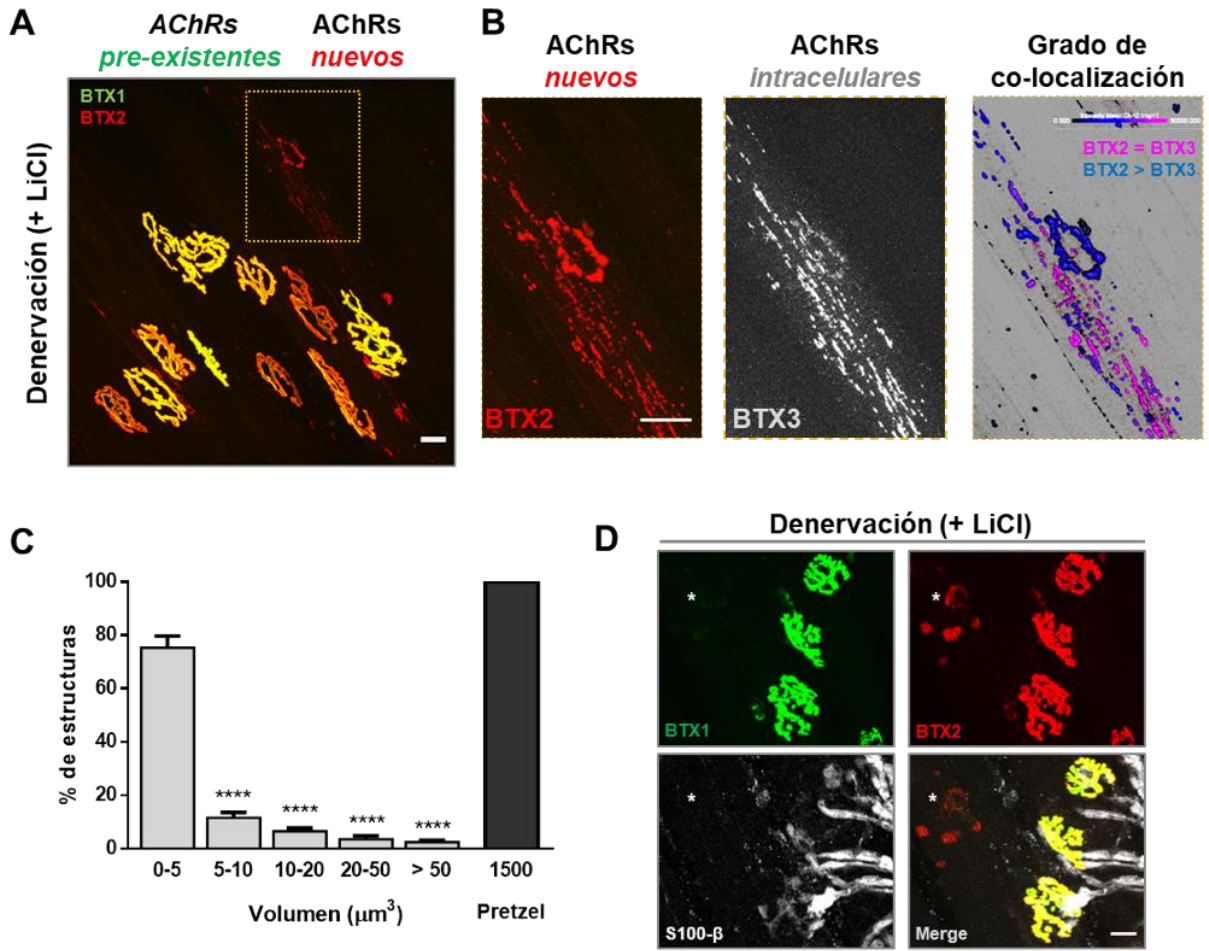


Figura 38: Caracterización de los microagregados de AChR no-sinápticos inducidos por litio.

(A) Visualización a través de microscopía confocal de músculos LAL denervados tratados con LiCl 50 mM y sometidos al ensayo de doble BTX. El cuadrado amarillo del panel A fue magnificado y representado en (B). Análisis de la contribución de BTXs en las microestructuras de AChR. Se evaluó la localización de BTX-2 y BTX-3 usando el programa Imaris® y la magnitud de su co-localización fue denotada de color magenta a azul, dependiendo si existía o no co-localización respectivamente. (C) Análisis del volumen promedio de los microagregados del AChR. Los datos fueron representados como el promedio \pm SEM del porcentaje de estructuras exhibiendo distintos rangos de volumen (0-5; 5-10; 10-20; 20-50 y $> 50 \mu\text{m}^3$ respectivamente). (D) Inmunofluorescencia en músculo LAL para la detección de las células de Schwann mielínicas y peri-sinápticas (blanco) a través del anticuerpo S100 β en conjunto al marcaje de BTX-1 (verde) y BTX-2 (rojo). ****p < 0,0001 al comparar cada rango de volumen contra el rango $0-5 \mu\text{m}^3$. (N=3). Barra: 20 μm .

revela a las células de Schwann mielínicas y peri-sinápticas, donde estas últimas, a diferencia del axón motor, se ubican en la vecindad de uniones neuromusculares denervadas (Reynolds and Woolf, 1992). Se observó que las células de Schwann peri-sinápticas contactaron exclusivamente los dominios postsinápticos con morfología tipo pretzel. Sin embargo, ninguno de los agregados ectópicos de AChRs presentaron un contacto con los procesos de estas células (Figura 38D, asterisco blanco). Estos resultados confirman que el tratamiento con litio resulta en la formación de microestructuras de AChRs en uniones neuromusculares denervadas, las que se localizan en regiones no-sinápticas del sarcolema.

6. Litio altera la distribución de la subunidad- γ del AChR y de β -catenina en el dominio postsináptico de uniones neuromusculares denervadas.

Como primer indicio para abordar un potencial mecanismo mediante el cual litio altera el tráfico y recambio de los AChRs, se analizaron los niveles y la distribución de proteínas que participan en la estabilidad de la sinapsis neuromuscular. Inicialmente, se consideró la subunidad γ del AChR, ya que las uniones neuromusculares denervadas re-expresan esta subunidad fetal que en el desarrollo postnatal es normalmente reemplazada por la subunidad adulta ϵ (Witzemann et al., 1987). Tomando en cuenta que los pentámeros fetales de AChRs exhiben un recambio acelerado en comparación a los AChRs adultos (Salpeter et al., 1986), se estudió el efecto de litio sobre los niveles y localización de la subunidad- γ . Los análisis de Western blot indicaron que los extractos de músculos sin daño presentaron niveles indetectables de la subunidad- γ del AChR (Figura 39A, contralateral). Aun cuando la denervación indujo un incremento en la banda inmunopositiva de ~ 60 kDa, la abundancia de la subunidad- γ no fue alterada significativamente por el tratamiento con litio (Figura 39A, denervado). La visualización por microscopía confocal indicó que la subunidad- γ de los AChRs se localizó en la placa motora de músculos denervados tratados con NaCl y teñidas con BTX-1 y BTX-2 (Figura 39B, asteriscos amarillos), sugiriendo que la subunidad- γ se somete al recambio de

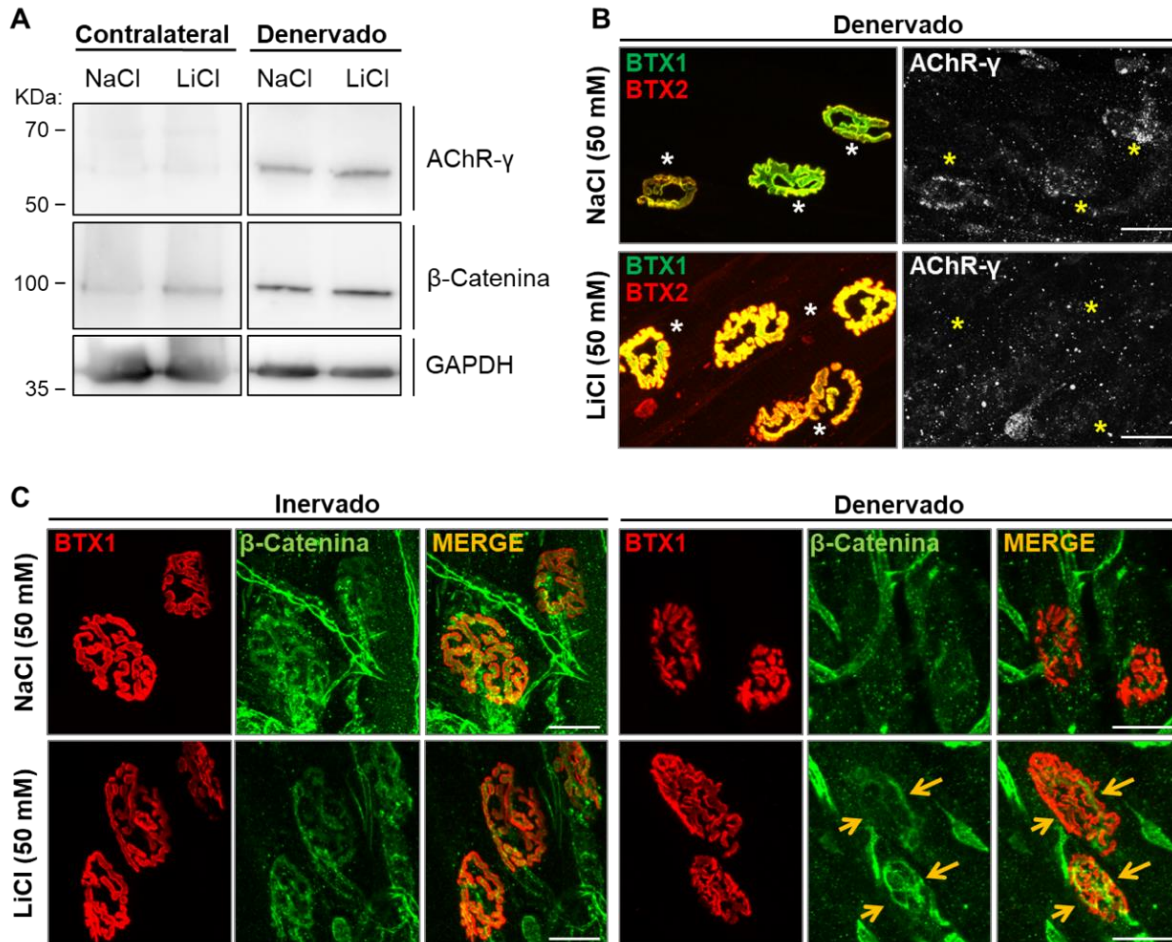


Figura 39: Litio altera la localización postsináptica de β -catenina y de la subunidad- γ de los AChRs en sinapsis neuromusculares denervadas.

(A) Western blots realizados a extractos de músculos colectados 8 días luego de ser tratados diariamente con NaCl o LiCl 50 mM, los cuales fueron además denervados al día 2 del tratamiento. GAPDH fue utilizado como control de carga en ambas condiciones experimentales. La región contralateral se utilizó como músculo control sin daño. Parte de los músculos colectados fueron también fijados y sometidos a inmunofluorescencia ya sea utilizando anticuerpos contra (B) la subunidad- γ de los AChRs (gris) o (C) β -catenina (verde), en conjunto con la tinción de los AChRs. Las muestras fueron posteriormente visualizadas mediante microscopía confocal. En (B), los asteriscos amarillos indican las regiones sinápticas, mientras que en (C), las flechas amarillas revelan los focos positivos para β -catenina. Se realizaron dos experimentos de forma independiente y se visualizaron 25 sinapsis por condición. Barra: 20 μ m.

AChRs luego de la denervación. Sin embargo, en músculos denervados y tratados con LiCl, la localización de esta subunidad en la placa motora fue indetectable en las regiones sinápticas (Figura 39B, asteriscos amarillos). Dicha pérdida en el marcaje no fue debido a la ausencia de AChRs, ya que en contraste se obtuvo una tinción evidente de los AChRs en las regiones postsinápticas con BTX-1 y BTX-2 (Figura 39B, asteriscos blancos). Estos análisis indican que los niveles de la subunidad- γ dependen del estado de inervación de la fibra muscular, mientras que su integración a la placa motora es inhibida por el tratamiento con litio.

La actividad de la quinasa GSK3 β es inhibida por litio, lo que conlleva a la acumulación citosólica de β -catenina, un mediador central de las interacciones célula-célula y de la vía Wnt canónica (Gordon and Nusse, 2006; Stambolic et al., 1996). Basado en esta evidencia, se analizó la acumulación y distribución de β -catenina en la sinapsis neuromuscular de animales tratados con litio. Los análisis de Western blot mostraron que en músculos sin denervar, el tratamiento con LiCl generó la acumulación de una banda inmunorreactiva de ~100 kDa correspondiente a β -catenina, cuya abundancia exhibió un mayor grado que la banda detectada en el tratamiento control (Figura 39A, contralateral). Por otra parte, la denervación del músculo LAL conllevó a un incremento marcado en los niveles de β -catenina, cuya abundancia no fue mayormente alterada por litio (Figura 39A, denervado). La visualización de la marca inmunofluorescente por microscopía confocal mostró que β -catenina se distribuyó tanto en los axones motores como dentro de la placa motora en músculos no denervados tratados con NaCl, un patrón que no fue modificado significativamente por el tratamiento con LiCl (Figura 39C, panel izquierdo). De manera interesante, la denervación disminuyó de manera considerable la presencia de β -catenina en la región postsináptica de los animales tratados con NaCl (Figura 39C, panel derecho), mientras que las fibras musculares de animales denervados tratados con LiCl retuvieron la tinción de β -catenina en algunos focos específicos dentro de la región sináptica (Figura 39C, flechas amarillas).

En conjunto, estos resultados indican que la denervación de la fibra muscular incrementa los niveles basales de β -catenina, mientras que el tratamiento con litio modificó localmente la distribución de esta proteína en la región de la sinapsis neuromuscular.

VIII. DISCUSIÓN

1. Una pérdida en la estabilidad de los AChRs precede a la desorganización morfológica del dominio postsináptico de la sinapsis neuromuscular.

Uno de los hallazgos más relevantes de esta tesis fue la caracterización del orden de eventos que subyacen a la desestabilización postsináptica luego de la denervación. En este contexto, se identificó que previo a algún cambio morfológico inducido por el daño, los AChRs ubicados en la región postsináptica reducen significativamente su estabilidad, donde posteriormente se generan dos compartimentos con estabilidad diferenciada. Si bien se ha estudiado el tiempo de vida media, reciclaje y recambio de los AChRs luego del daño a la unión neuromuscular (Akaaboune et al., 1999; Bruneau and Akaaboune, 2006; Fumagalli et al., 1990; Shyng and Salpeter, 1989; Strack et al., 2011), el posicionamiento y caracterización de las distintas subpoblaciones no ha sido abordado en detalle. Inicialmente, se determinó que en el músculo tibial anterior, la denervación aceleró la tasa de recambio de los AChRs, observándose una incorporación preferencial de los AChRs nuevos hacia la periferia (Strack et al., 2011). Sin embargo, aun cuando se analizó el efecto de la denervación a largo plazo (15 días post-daño) en el recambio de AChRs, los dominios postsinápticos de este músculo no fueron morfológicamente alterados, por lo que nuestro modelo de estudio, el músculo LAL, no solo exhibe una ventaja experimental respecto a su accesibilidad, sino que también a los efectos detectables en un corto plazo en comparación a músculos de la extremidad (Ojeda et al., 2020). Dentro de estos efectos destacó la presencia de un compartimento central del dominio postsináptico que careció de recambio de receptores. En efecto, este compartimento no fue accesible al marcaje con la lectina de *Vicia Villosa*, la que ha sido utilizada para marcar AChRs previo a su desensamble (Martinez-Pena et al., 2015). Este resultado sugiere que la denervación a largo plazo conlleva a la pérdida de componentes y organización de la matriz extracelular del espacio sináptico, tales como integrinas, acetilcolinesterasa, colágeno, etc. (Shi et al., 2012). En este contexto, aun cuando los dominios postsinápticos pueden ser reinervados luego del daño a esta sinapsis, se ha demostrado que

existe un periodo de tiempo crítico para recuperar funcionalmente la unión neuromuscular (Sakuma et al., 2016). Así, la compartimentalización de AChRs que observamos podría revelar los efectos generados por la denervación en el largo plazo que impiden una correcta regeneración sináptica. Mas aún, la llegada del axón motor durante la reinervación no estabilizó de forma inmediata a los AChRs sinápticos, pero sí a los extrasinápticos. Si bien se ha reportado que el neurotransmisor acetilcolina tiene un efecto desagregante sobre los AChRs no sinápticos (Lin et al., 2005), la estabilización observada luego de la reinervación podría ocurrir debido al reinicio de la contracción muscular (Akaaboune et al., 1999).

En cuanto al tráfico de los AChRs, una vez internalizados estos pueden ser reciclados de vuelta a la membrana (Bruneau et al., 2005), o pueden ser degradados por una vía dependiente de lisosomas (Kumari et al., 2008; Wild et al., 2016), los cuales serán eventualmente reemplazados por AChRs sintetizados *de novo* (Bruneau et al., 2005). De esta forma, en la superficie del dominio postsináptico existe un número constante de AChRs para mantener una correcta transmisión sináptica (Sanes and Lichtman, 1999). Sin embargo, en situaciones donde la sinapsis se ve negativamente comprometida, tales como en la denervación, o en algunos tipos de patologías musculares, la estabilidad de los AChRs disminuye (Martínez-Pena and Akaaboune, 2021), observándose una disminución en el tiempo de vida media de los AChRs pre-existentes en la superficie, como también en los reciclados (Bruneau and Akaaboune, 2006). Dicha inestabilidad postsináptica conlleva a un incremento en el recambio y a una pérdida en el *pool* de AChRs que reciclarán de vuelta a la membrana (Bruneau and Akaaboune, 2006; Strack et al., 2015). De esta forma, la falta de recuperación en la estabilidad de los AChRs sinápticos observada en el corto y mediano plazo luego de la reinervación podría explicarse debido a que el flujo basal de autofagia o endocitosis que promueve la internalización y degradación de AChRs se encuentra exacerbado (Khan et al., 2014; Wild et al., 2016). En este contexto, la formación de vesículas internalizadas que contienen AChRs se incrementa 8 veces luego de la denervación, efecto que se potencia tras el tratamiento con

cloroquina, un inhibidor del flujo endosomal/autolisosomal (Wild et al., 2016). Considerando que las vesículas que contienen AChRs internalizados serán destinadas a degradación, y no al reciclaje hacia la membrana, es posible que la maquinaria postsináptica incremente la síntesis *de novo* de los AChRs para contrarrestar la pérdida de los AChRs reciclados generada por la denervación, lo que resultará en un persistente aumento del recambio de receptores en los primeros 21 días posteriores al aplastamiento del nervio.

Sumado a los cambios en su estabilidad, también se observaron cambios drásticos en la morfología de los agregados de AChRs, los que exhibieron un patrón de fragmentación luego de 30 días del daño por aplastamiento al nervio. De forma interesante, la fragmentación de la unión neuromuscular no solo ha sido descrita en eventos relacionados a la denervación, sino que también en modelos de patologías musculares y motoras (Slater, 2019; Valdez et al., 2010; van der Pijl et al., 2016). Sin perjuicio de ello, también se ha observado una distribución fragmentada de AChRs en sinapsis neuromusculares sanas de otras especies, incluyendo humanos, donde se ha propuesto que la fragmentación podría aparecer en ratones envejecidos no como un mecanismo de deterioro, sino más bien como un mecanismo adaptativo para promover una transmisión sináptica eficaz (Robbins, 1992; Slater, 2019). Por su parte, es relevante considerar que previo a la aparición de la fragmentación de la unión neuromuscular, el recambio de los AChRs se recuperó a niveles basales, lo que daría cuenta de que en términos de estabilidad, esta adaptación morfológica no sería consecuencia de una alteración negativa en la postsinapsis. Mas aún, los análisis del número de fragmentos de agregados del AChR en relación con la tasa de recambio no siguieron una correlación, lo que muestra que la alteración morfológica no necesariamente es un indicio de una pérdida de componentes postsinápticos (Strack et al., 2011; van der Pijl et al., 2016). Por otra parte, aunque la reinervación ocurrió en periodos de tiempo cortos en relación con otros músculos (Magill et al., 2007), nuestras observaciones muestran que la proporción de uniones neuromusculares poli-inervadas permaneció significativamente incrementada hasta 3 meses luego del aplastamiento del nervio. Estos resultados

son consistentes con experimentos que muestran que algunos músculos faciales mantienen un porcentaje importante de uniones neuromusculares poli-inervadas luego de la reinervación (Grosheva et al., 2018). Además, durante el desarrollo de la unión neuromuscular, los agregados de AChR que exhiben una morfología tipo placa se encuentran poli-inervados, mientras que luego de la maduración, los agregados tipo-pretzel se encuentran mono-inervados (Balice-Gordon and Lichtman, 1990). En nuestros experimentos, luego de la reinervación, las estructuras poli-inervadas exhiben una morfología de pretzel, mientras que luego de 2 semanas, las estructuras poli-inervadas se encuentran mayoritariamente fragmentadas. En este contexto, la transmisión neuromuscular en sinapsis fragmentadas de ratones envejecidos presentan una mayor amplitud en la corriente de placa motora (Willadt et al., 2016), similar a lo observado en experimentos complementarios a este trabajo (Francisca Bermedo-García, tesis doctoral; Bermedo-García *et al.*, 2022). En base a estos antecedentes, es posible plantear que la poli-inervación lleva a la fragmentación postsináptica, posiblemente como un mecanismo adaptativo para mantener y/o mejorar la función de la sinapsis neuromuscular.

La denervación no solo generó un efecto en los AChRs sinápticos, sino que también promovió la aparición de agregados ectópicos a lo largo de la fibra muscular (Frank et al., 1976; Levitt and Salpeter, 1981). De forma destacable, nuestra aproximación de utilizar dos fluoróforos distintos para determinar las subpoblaciones de AChRs pre-existentes y nuevos permitió identificar claramente la presencia de agregados de AChRs ectópicos, los cuales se marcaron (en nuestros tiempos de análisis) solamente con BTX-2 en distintas regiones de la fibra muscular. Dado que el marcaje exclusivo de BTX-2 pudo haberse originado a partir de la aparición de AChRs luego del primer marcaje con BTX-1 o debido a una reducida estabilidad de los AChRs, la reducción en la ventana del tiempo de análisis permitió identificar que estas estructuras ectópicas presentaron un recambio acelerado, tal como se ha descrito en sistemas aneurales (Kummer et al., 2004), o mediante otras aproximaciones experimentales (Frank et al., 1976; Salpeter et al., 1986). De hecho, contrario a

lo que se ha reportado en sistemas aneurales *in vitro* (Brenner and Akaaboune, 2014), se identificó que los AChRs presentes en las estructuras aneurales del músculo LAL son capaces de reciclar. Más aún, en los músculos denervados, se observó que el reciclaje de los AChRs se concentró en el centro de las estructuras postsinápticas, tanto en los AChRs de la región sináptica como ectópica, sugiriendo que independiente de la morfología que presente el dominio postsináptico, la compartimentalización del tráfico de los AChRs reciclados no varía. Si bien se ha descrito que la tasa de reciclaje de los AChRs disminuye luego de la denervación (Bruneau and Akaaboune, 2006), nuestros hallazgos indicaron que las estructuras postsinápticas denervadas exhibían un incremento en el reciclaje de los AChRs. Esta discrepancia puede deberse a diferencias en los tiempos de denervación y marcaje entre los fluoróforos utilizados, como también a propiedades intrínsecas en los músculos utilizados (esternomastoideo versus LAL). Sin embargo, ambas investigaciones indican que la vida media de los AChRs reciclados disminuye significativamente como resultado de la denervación (Bruneau and Akaaboune, 2006).

2. Dinámica morfológica de la subpoblación de AChRs intracelulares.

Considerando que los AChRs pre-existentes y nuevos exhibían un posicionamiento diferencial en la membrana de la fibra muscular luego de la denervación, se elucidó la contribución de la subpoblación intracelular de AChRs frente a este evento. De esta forma, la adición del marcaje de sinapsis neuromusculares con BTX acoplada a un tercer fluoróforo permitió identificar una subpoblación de AChRs dinámica, que fue inducida por la denervación. Dicha subpoblación de receptores intracelulares exhibía una morfología de anillos agrupados, patrón completamente distinto a los AChRs que se localizan en la superficie de la postsinapsis. La diferenciación postsináptica se caracteriza por el incremento en la expresión de distintas proteínas postsinápticas, incluyendo los AChRs, específicamente en los pocos mionúcleos localizados en posición subyacente a la unión neuromuscular, conocidos como núcleos subsinápticos (Grady et al., 2005; Mejat et al., 2003).

Considerando la morfología y tamaño de los AChRs intracelulares, inicialmente se evaluó si estos AChRs pudieran estar topológicamente relacionados con los núcleos subsinápticos. Sin embargo, nuestros análisis indicaron que en promedio cada anillo de AChRs era ocupado por ~2 núcleos, patrón que no coincide con la tinción de proteínas enriquecidas en los núcleos subsinápticos, como Syne-1, la que se co-distribuye con un patrón similar a cada núcleo subsináptico (Apel et al., 2000; Grady et al., 2005). Otra posibilidad que se evaluó se basó en que parte de los eventos celulares que subyacen a la prevención del desensamblaje postsináptico podrían estar mediados por un cuarto tipo celular presente en el nicho de la sinapsis neuromuscular, las células satélite (Liu et al., 2017; Liu et al., 2015). Las células satélite del músculo son células madres que normalmente residen en un estado quiescente a lo largo de la fibra muscular y que se localizan entre la miofibra y su lámina basal (Mauro, 1961). En respuesta al daño muscular, estas células se dividen para generar precursores miogénicos que formarán nuevas fibras musculares, o bien, se fusionarán a fibras ya existentes y así, participan en la regeneración del músculo esquelético (Yin et al., 2013). Interesantemente, ratones transgénicos donde es posible eliminar la población de células satélite, exhiben una alteración negativa en la unión neuromuscular, atrofia muscular y pérdida de la fuerza (Liu et al., 2015). Además, la depleción de las células satélite resultó en una reinervación ineficiente y una pérdida en la morfología postsináptica luego del daño al nervio (Liu et al., 2015). De forma destacable, se demostró que sólo la población de células satélite que se encuentra en la vecindad de la unión neuromuscular se activa, lo que resulta en su fusión a las fibras musculares luego del daño al nervio, demostrando así que la denervación de la unión neuromuscular genera una activación local de células satélite (Liu et al., 2015). En base a estos antecedentes, intentamos determinar si los AChRs intracelulares se relacionaban con las células satélite localizadas en la vecindad de la unión neuromuscular. Sin embargo, aun cuando nuestras observaciones en un animal transgénico que expresa GFP bajo el promotor de Pax7 mostraron una clara activación de las células satélite luego de la denervación en regiones cercanas a la unión neuromuscular (Liu et al., 2015), la localización de estas células no se correlacionó espacialmente con los AChRs intracelulares. Por lo tanto, si los

AChRs intracelulares observados no correspondían a fuentes de síntesis (ya sea por los núcleos subsinápticos o por las células satélite), una tercera posibilidad que se evaluó en esta tesis fue que el patrón observado pudiera corresponder a AChRs en vías de degradación. A este respecto, se ha descrito que una vez internalizados, los AChRs serán procesados para degradación en los compartimentos lisosomales, los cuales son detectables con la proteína LAMP1 (Kumari et al., 2008). De forma interesante, observamos que los anillos de AChRs intracelulares coincidieron sobre un 95% con los anillos decorados por LAMP1 en las uniones neuromusculares denervadas, sugiriendo que dicha población de AChRs van en tráfico hacia la degradación. Se ha descrito que distintas vías y moléculas participan en la internalización de los AChRs en la unión neuromuscular, incluyendo la proteína reguladora de autofagia SH3 GLB1, la ubiquitin-ligasa MuRF1, Rac1 y Src (Khan et al., 2014; Kumari et al., 2008; Rudolf and Straka, 2019; Wild et al., 2016). Además, el mediador de endocitosis Rab5 co-localiza e interacciona con los AChRs internalizados (Wild et al., 2016). De manera destacable, la distribución de Rab5 y SH3GLB1 también se observa en un patrón de anillos y subyace a las estructuras tipo pretzel (Wild et al., 2016), apoyando la idea de que los anillos de AChRs intracelulares observados se encuentran en vías de degradación (Figura 40B).

Es importante destacar que solamente fue posible observar la aparición de estructuras en anillo de AChRs intracelulares utilizando una ventana de tiempo de 3 días o menos entre BTX-1 y BTX-2. Considerando que los ensayos reportados donde se utilizan las dos BTXs incluyen tiempos de 10 días (Haddix et al., 2018; Roder et al., 2010), nuestros hallazgos utilizando ventanas de tiempo cortas y un tercer marcaje de BTX, permitieron identificar la aparición temprana de un posible marcador de degeneración de la unión neuromuscular, la que sería interesante evaluar en condiciones patológicas donde la unión neuromuscular se encuentra comprometida, tales como en ELA en etapas pre-sintomáticas, o en distintos tipos de miastenias.

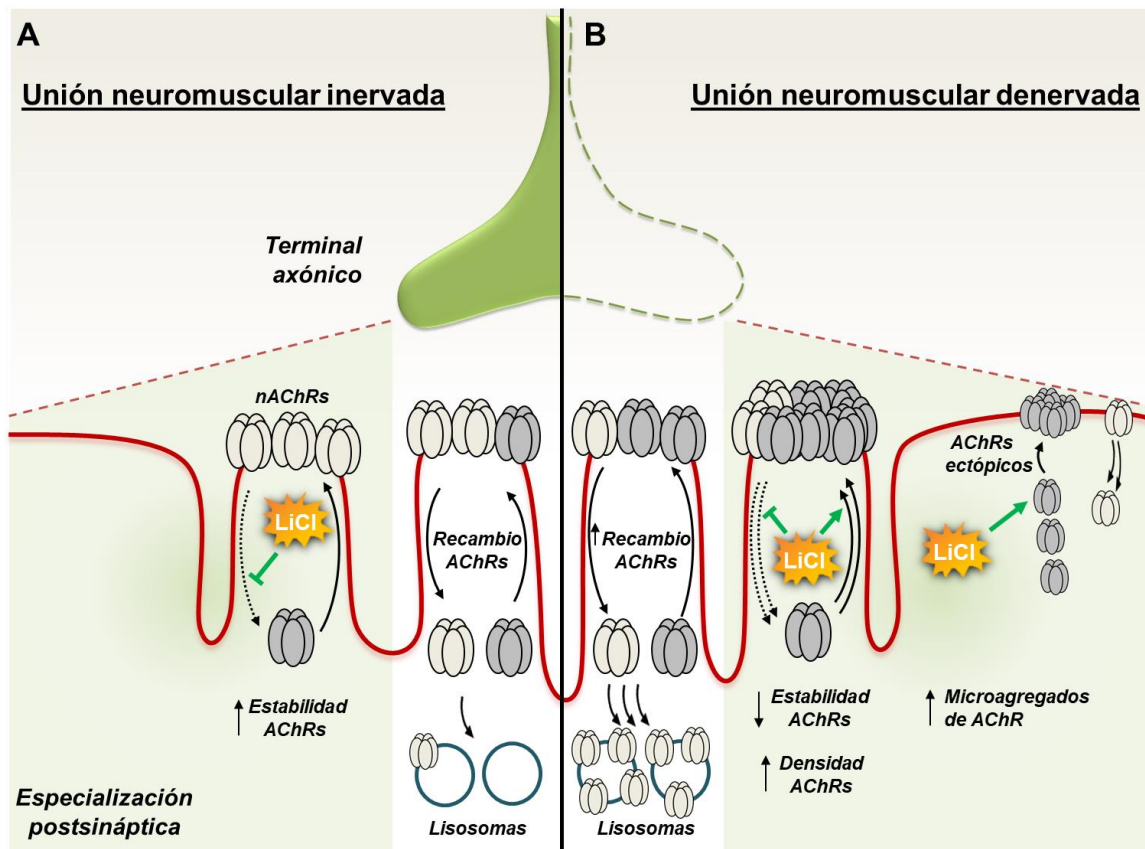


Figura 40: Regulación del tráfico de AChRs en sinapsis inervadas y denervadas.

(A) En una condición basal, los AChRs pre-existentes son internalizados y reemplazados por AChRs nuevos. Esta internalización es inhibida por el tratamiento con litio, lo que resulta en un aumento en la estabilidad de los AChRs y en una baja tasa de degradación. (B) Por otra parte, previo a la desorganización morfológica, la denervación induce la pérdida en la estabilidad de los AChRs, manifestándose un incremento en el recambio entre los AChRs pre-existentes con los nuevos. Estos AChRs nuevos se incorporarán en compartimentos distintos a los que se ubican los AChRs pre-existentes, evidenciándose un cambio en el posicionamiento de los AChRs en la estructura postsináptica denervada. Mas aún, los AChRs internalizados en lugar de ser reciclados, son degradados en estructuras lisosomales, las que exhiben una morfología de anillo y se encuentran yuxtapuestas a los dominios postsinápticos. En las regiones no sinápticas, los agregados del AChR que llegan a la superficie de la fibra muscular adquieren una morfología simple tipo placa o tipo-O, la que exhibe menor estabilidad en comparación a los AChRs localizados en la región sináptica. El recambio acelerado, como la incorporación de AChRs nuevos fue incrementado aún más frente al tratamiento con litio, donde también se observó un incremento en la disponibilidad de AChRs como también la formación de microagregados del AChR en las regiones no sinápticas.

3. Fzd9 en la regulación de la estabilidad de los AChRs.

La organización y estabilidad postsináptica son requeridas para la transmisión sináptica eficiente en la unión neuromuscular. En este contexto, las moléculas y vías de señalización que promueven este proceso podrían ser utilizadas como efectores en condiciones donde la conexión motoneurona—músculo estén negativamente afectadas. De esta forma, los hallazgos obtenidos en el desarrollo de esta tesis permiten identificar a la vía de señalización Wnt, y en específico, a su receptor Fzd9, como un modulador positivo de la estabilidad postsináptica de los AChRs localizados en la membrana de la fibra muscular. Al respecto, Fzd9 se encuentra en la postsinapsis de la unión neuromuscular *in vivo*, donde co-localiza parcialmente con los AChRs en etapas embrionarias (Aviles et al., 2014), patrón que se mantuvo durante las etapas adultas. De forma interesante, los niveles endógenos de Fzd9 tanto en sinapsis centrales como en el músculo incrementan gradualmente desde el nacimiento hasta el establecimiento de una estructura postsináptica madura y estable [(Aviles et al., 2014; Varela-Nallar et al., 2012) y tesis Doctoral Dr. Jorge Ojeda], lo que aporta a la idea de que este receptor participa en la estabilidad postsináptica. En este contexto, la sobreexpresión de Fzd9 *in vivo* incrementó la estabilidad de los AChRs, mientras que su silenciamiento disminuyó la estabilidad postsináptica en las uniones neuromusculares inervadas. Estos resultados son consistentes con la observación que muestra que al disminuir la estabilidad postsináptica (por ejemplo, mediante la denervación), Fzd9 y otros genes de la vía Wnt disminuyen su expresión en el músculo esquelético (Magnusson et al., 2005). En forma similar, se observó una pérdida en la inmunotinción para Fzd9 en las regiones sinápticas del músculo LAL denervado, consistente a los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio (tesis Doctoral Dr. Jorge Ojeda). Por otra parte, Fzd9 también se ha detectado en el dominio postsináptico de neuronas hipocampales, donde es requerido para la formación de espinas dendríticas (Ramirez et al., 2016). Mas aún, el silenciamiento de Fzd9 disminuye la densidad de estas estructuras, revelando que Fzd9 es una proteína importante para el ensamblaje de dominios postsinápticos neuronales. En este contexto, la ausencia del gen de Fzd9 se manifiesta en desórdenes

cognitivos, como el Síndrome de Williams (Francke, 1999), caracterizado por fenotipos de comportamiento de personalidad extrovertida e hiperactividad, donde se ha observado que en cerebros de estos pacientes obtenidos postmortem, las neuronas piramidales de la capa cortical V/VI exhiben una mayor longitud y número de espinas dendríticas (Chailangkarn et al., 2016). En neuronas hipocampales, Fzd9 actúa como receptor del ligando Wnt5a para promover la formación de espinas dendríticas a través de la vía no canónica Wnt/Ca²⁺, cuyo efecto río abajo incluye el incremento de calcio intracelular y una posterior activación de la proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina tipo II, CaMKII (Cuitino et al., 2010; Ramirez et al., 2016). De manera interesante, distintas isoformas de CAMKII se concentran en la unión neuromuscular *in vivo* y su actividad promueve el reciclaje de los AChRs internalizados hacia la superficie postsináptica (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2010). De esta forma, el mantenimiento de una alta densidad de receptores postsinápticos es dependiente del incremento intracelular de calcio y de la actividad de CAMKII (Cuitino et al., 2010; Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2010; Ramirez et al., 2016).

El incremento de calcio intracelular también puede activar otros efectores, como la proteína quinasa C, PKC (Huang, 1989). Esta quinasa se expresa en el músculo esquelético, donde predominan dos isoformas: *i*) la convencional, *c*PKC α , *c*PKC β (Nakano et al., 1992), la cual requiere de diacilglicerol (DAG), fosfolípidos y el incremento de calcio intracelular para su activación (Rosse et al., 2010) y *ii*) la nueva, *n*PKC θ (Ohno et al., 1991; Perkins et al., 2001), cuya activación es dependiente de DAG, fosfolípidos, pero independiente de calcio (Mellor and Parker, 1998). Al contrario de la PKA, se ha reportado que la actividad de PKC ejerce un efecto negativo sobre la estabilidad de los AChRs en la unión neuromuscular de ratones adultos, donde el tiempo de vida media de los AChRs en la membrana postsináptica disminuye, como también el reciclaje de los AChRs internalizados (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013). Sin embargo, en neuronas hipocampales se ha observado que la actividad de Fzd9 como GPCR genera un incremento en la formación de espinas dendríticas a través de la activación de JNK y de la PKC β II (Ramirez et al.,

2016), isoforma que predomina en la unión neuromuscular (Lanuza et al., 2014). Cabe destacar que el estudio realizado por el grupo de Akaaboune (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013) utilizó inhibidores y activadores de PKC inespecíficos, lo cual pudo impactar en todas las isoformas de PKC del músculo esquelético, terminal axónico, o células de Schwann terminales (Besalduch et al., 2010), enmascarando así una posible función específica de la isoforma PKC β II en el dominio postsináptico de la unión neuromuscular. De forma interesante, el mantenimiento de la actividad contráctil de la fibra muscular evita la pérdida de AChRs en uniones neuromusculares denervadas (Akaaboune et al., 1999) y, a su vez, incrementa los niveles de PKC β II en la membrana de la fibra muscular (Besalduch et al., 2010). Con estos hallazgos, es interesante plantear que si bien PKC ha sido descrito como un efector que desestabiliza a los AChRs durante las etapas de maduración o adultas de la unión neuromuscular (García et al., 2019; Martínez-Pena y Valenzuela et al., 2013), es probable que la isoforma PKC β II participe en el incremento de la estabilidad postsináptica como un efector regulado por Fzd9.

4. Fzd9 como un GPCR en la sinapsis neuromuscular.

Si bien los receptores Fzd pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), definidos como receptores de membrana que exhiben dentro de su estructura un extremo N-terminal extracelular, 7 hélices transmembrana y un dominio C-terminal intracelular donde interactúa con complejos heterotriméricos de proteína G (Schulte and Wright, 2018), su señalización hacia los distintos efectores ha sido ampliamente considerada independiente de proteína G (Egger-Adam and Katanaev, 2008). Sin embargo, diferentes evidencias sustentan que los receptores Fzd pueden señalizar y funcionar como GPCRs. Por ejemplo, mediante análisis bioinformáticos se predijo la interacción de diferentes subfamilias de proteína G con los receptores Fzd, encontrándose que 5 receptores Fzd (incluyendo a Fzd9) podrían interactuar con proteínas G de la subfamilia inhibitoria G_{i/o} (Wang et al., 2006). En este contexto, Ramírez y colaboradores describieron que en neuronas

hipocampales, Fzd9 se acopla a la subunidad $G\alpha_o$, mediando los efectos postsinápticos de Wnt5a a través de las señalizaciones no canónicas Wnt/ Ca^{2+} y Wnt/JNK (Ramirez et al., 2016). De forma interesante, $G\alpha_o$ se encuentra altamente concentrado en la unión neuromuscular de *Drosophila*, donde actúa río abajo de la señal de Wnt/Fzd2 (Luchtenborg et al., 2014). Además, el silenciamiento de $G\alpha_o$ conllevó a la pérdida morfológica de la sinapsis neuromuscular, como también a una disminución en la amplitud del potencial de placa excitatorio (Luchtenborg et al., 2014), sugiriendo que la señal Wnt/Fzd sería requerida a través de $G\alpha_o$ para el mantenimiento del dominio postsináptico. De manera importante, nuestros ensayos de co-inmunoprecipitación en músculos de ratón validaron que Fzd9 interacciona con la subunidad $G\alpha_o$ en condiciones basales, sugiriendo una función de este receptor como GPCR en la unión neuromuscular de vertebrados. En este escenario, la actividad de Fzd9 como GPCR podría regular moléculas implicadas en el tráfico y estabilidad de los AChRs, tales como la proteína quinasa A (PKA) o la proteína quinasa C (PKC) (Garcia et al., 2019; Li et al., 2001; Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013; Nimnual et al., 1998). La PKA es un heterotetrámero que posee dos subunidades reguladoras y dos catalíticas, y su actividad es dependiente de los niveles de AMP cíclico (Taylor et al., 2004). Al respecto, se ha descrito que PKA ejerce un efecto positivo sobre el tiempo de vida media de los AChRs en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013). Por ejemplo, se ha observado que en músculos denervados, el tratamiento con AMP cíclico o la activación directa de PKA previene la degradación acelerada de los AChRs (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013; Shyng et al., 1991), mientras que su inhibición incrementa la tasa de degradación de estos receptores, observándose dominios postsinápticos con una menor densidad de AChRs (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013). A su vez, en músculos de ratones *mdx*, modelo de distrofia muscular de Duchenne (Torres and Duchen, 1987), tanto la actividad de PKA como los niveles de AMP cíclico se encuentran reducidos (Reynolds et al., 2008; Roder et al., 2012). De manera coincidente, en ratones *mdx* el tiempo de vida media de los AChRs de superficie se encuentra reducido, comparable a los AChRs de músculos denervados (Xu and Salpeter, 1997), lo

que sugiere que la señalización a través de AMPc/PKA es requerida para promover la estabilidad postsináptica (Rudolf et al., 2013).

Si bien existe una amplia variedad de sustratos para las PKAs, la restricción intracelular de su señalización depende de su unión a las proteínas de anclaje a PKA, denominadas AKAPs (Langeberg and Scott, 2015). En este contexto, se ha descrito que la subunidad reguladora de PKA, RI α , en conjunto con la miosina Va ejercen un efecto local mediante mecanismos aún desconocidos para el mantenimiento de la vida media los AChRs en los dominios subsinápticos, dependiente de la función de AKAP (Roder et al., 2010). Mas aún, se ha observado que la interacción de un tipo de AKAP tanto con la quinasa GSK3 β como con PKA fue requerida para promover la estabilización de β -catenina y la subsecuente activación de la vía Wnt/ β -catenina (Dema et al., 2016). De forma interesante, se observó que en la unión neuromuscular de vertebrados, la proteína de anclaje AKAP correspondía a la proteína de asociación a los AChRs, rapsina (Choi et al., 2012). De hecho, en células musculares se ha demostrado que rapsina se encuentra en un complejo con β -catenina. Esta interacción es necesaria para la agregación de los AChRs *in vitro* a través de un mecanismo que no requiere de la actividad transcripcional de β -catenina, sino que requiere de la unión de β -catenina al citoesqueleto mediada por α -catenina (Zhang et al., 2007). Por lo tanto, rapsina no solo participaría en el correcto posicionamiento de los AChRs en la región subsináptica, sino que también como un efector clave en el posicionamiento de proteínas que estabilizan el dominio postsináptico, como la PKA y posiblemente, β -catenina (Choi et al., 2012).

5. Fzd9 como regulador de la vía Wnt canónica en la sinapsis neuromuscular.

¿Cómo se podría relacionar el rol de Fzd9 sobre los efectores antes descritos para promover la estabilidad de los AChRs? Se ha reportado que la subunidad G α_o (que interacciona con Fzd9) regula positivamente a la vía Wnt/ β -catenina (Liu et al., 2005) y también potencia la actividad de la adenilato

ciclasa para elevar los niveles de AMP cíclico (Muntean et al., 2021). A partir de estos hallazgos, es posible sugerir una cascada de señalización local en los dominios subsinápticos gatillados por Fzd9. En este modelo, Fzd9 a través de $G\alpha_o$ podría estimular la actividad de PKA localizada en la región postsináptica y promover así un incremento en el tiempo de vida media de los AChRs en la superficie de la fibra muscular (Choi et al., 2012; Roder et al., 2010). Por otra parte, se ha descrito que la sobreexpresión de Fzd9 en células musculares conlleva a un incremento en los niveles de β -catenina (Aviles et al., 2014). Así, altos niveles de β -catenina promovidos por Fzd9 podrían aumentar la asociación de los AChRs de la superficie con los componentes del citoesqueleto requeridos para la diferenciación y estabilidad postsináptica (Grady et al., 2005; Oury et al., 2019; Phillips et al., 1993; Roder et al., 2010). De esta forma, Fzd9 incrementaría la estabilidad de los AChRs al estimular localmente tanto la actividad de PKA, como la interacción de los AChRs con el citoesqueleto a través de β -catenina (Figura 41A).

Además de una señalización local, Fzd9 podría regular la estabilidad de los AChRs a través de cambios en la expresión de proteínas postsinápticas. Por ejemplo, la disminución en la incorporación de AChRs nuevos gatillada por la sobreexpresión de Fzd9 podría ser consecuencia de una activación de la vía Wnt canónica, la que se ha relacionado con la inhibición de la agregación de los AChRs (Wang et al., 2008). El incremento de Fzd9 genera aumentos en los niveles de β -catenina así como en la actividad transcripcional de un gen reportero dependiente de β -catenina (Aviles et al., 2014), indicando que la vía Wnt canónica se activa frente a la sobreexpresión de Fzd9. De manera interesante, la expresión del mRNA y los niveles proteicos de la proteína postsináptica rapsina son reprimidos frente a la activación de la vía Wnt canónica (Wang et al., 2008). Debido a que rapsina es el mediador que escolta a los AChRs en su ruta de síntesis hacia la membrana postsináptica (Marchand et al., 2002), la disminución en la abundancia de rapsina (inducida por la sobreexpresión de Fzd9) resultaría en un menor tráfico de la subpoblación de AChRs nuevos hacia la superficie (Figura 41B).

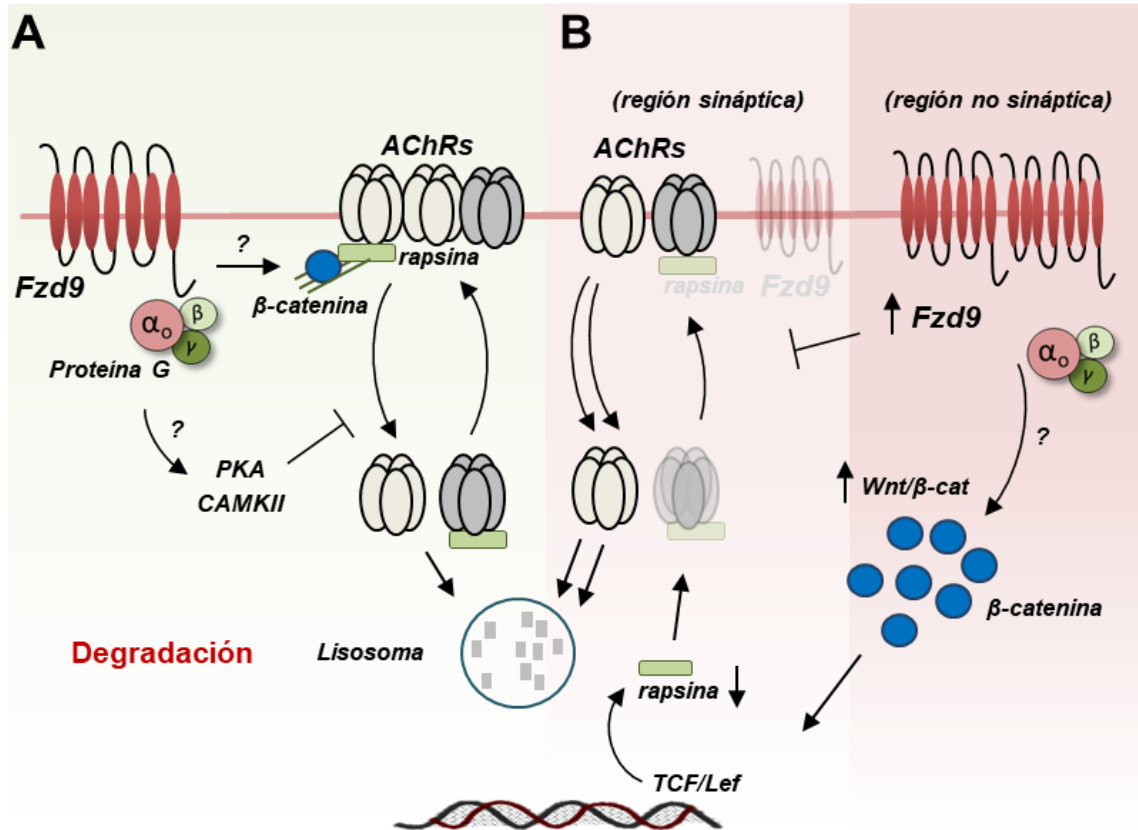


Figura 41: Posible rol de Fzd9 en el mantenimiento del dominio postsináptico de la unión neuromuscular.

(A) En este modelo, Fzd9 es requerido para la estabilización de los AChRs en la superficie de la membrana postsináptica en uniones neuromusculares inervadas. Los mecanismos gatillados por Fzd9 podría incluir una función GPCR, donde la subunidad $G\alpha_o$ aumente los niveles de AMPc, activando a la PKA, o incremente los niveles de Ca^{2+} intracelular para activar a CAMKII o PKC β II, todos estos efectores ubicados en las regiones sinápticas para promover la estabilidad de los AChRs. Fzd9 también podría señalar de forma local para incrementar la interacción de β -catenina con rapsina, la cual es requerida para mantener la organización de los AChRs. (B) Por otra parte, la denervación de los dominios postsinápticos genera la pérdida en la organización postsináptica, lo que reduce el tiempo de vida media de los AChRs, promoviendo su degradación acelerada. En este contexto, Fz9 se localiza de forma extra sináptica a través de la fibra muscular e incrementa sus niveles, lo que puede resultar en la activación de la vía Wnt canónica, disminuyendo los niveles de rapsina e inhibiendo el tráfico de AChRs nuevos hacia la membrana postsináptica. Si el incremento de la vía Wnt canónica se debe a la unión de un ligando, como Wnt3a, o es activada por la subunidad $G\alpha_o$, se desconoce.

En esta misma línea, la denervación de la fibra muscular causa la activación de la vía Wnt canónica (Kurimoto et al., 2015; Magnusson et al., 2005). Si bien se ha detectado que Wnt3a, activador de la vía Wnt canónica, incrementa concomitante al tiempo de denervación (Kurimoto et al., 2015), el receptor Fzd que transduce a través de Wnt3a se desconoce. Nuestros hallazgos en tiempos cortos luego de la denervación indicaron que los niveles de Fzd9 disminuyen, lo que podría recapitular el efecto desestabilizante observado al silenciar Fzd9 mediante Crispr-Cas9 en sinapsis inervadas. Contrariamente, en tiempos de denervación prolongados, si bien existe la posibilidad de que el incremento en los niveles de Fzd9 se relacione con una activación de la vía Wnt canónica y pérdida de la organización postsináptica mediada por la inhibición de rapsina (Kurimoto et al., 2015; Wang et al., 2008), existe también la posibilidad de que la fibra muscular denervada incremente los niveles de Fzd9 para promover la estabilidad de los AChRs, lo que generaría la resiliencia de la maquinaria postsináptica observada luego de la denervación (Magill et al., 2007; Sakuma et al., 2016). Sin embargo, dado que la denervación interrumpe la organización de los componentes postsinápticos y de la fibra muscular *per se* (Mole et al., 2020; Rudolf et al., 2014; Wild et al., 2016; Xu and Salpeter, 1997), es probable que independiente de que Fzd9 se encuentre altamente expresado en la fibra muscular denervada, la pérdida de su distribución de la región sináptica finalmente resulte en la desorganización y colapso de los AChRs (Figura 41B).

6. Rol dual de litio sobre la estabilidad de los AChRs.

Aun cuando litio ha sido ampliamente utilizado como droga estabilizadora para el tratamiento del trastorno bipolar a través de la regulación de los niveles y actividad de receptores postsinápticos (Alda, 2015; Gideons et al., 2017), el rol que litio ejerce sobre la estabilidad de estos receptores es desconocido. De forma interesante, observamos inicialmente que litio promovió la estabilidad postsináptica en sinapsis neuromusculares inervadas, sin alterar la densidad de los AChRs. Aunque estudios previos han reportado que el tratamiento con litio reduce el número de AChRs en el músculo

esquelético (Pestronk and Drachman, 1980, 1987), existen algunas diferencias importantes en la aproximación experimental que podrían llevar a esta discrepancia tales como: una dosis de litio mayor (400 mM intraperitoneal dos veces al día) en comparación a nuestra estrategia (50 mM subcutáneo una vez al día), el uso de [¹²⁵I]-BTX para el marcaje y cuantificación de los AChRs, y finalmente que los análisis fueron realizados en el músculo soleo, el cual exhibe mayoritariamente fibras de tipo lentas, las que pueden tener diferencias sobre el recambio de los AChRs (aún no descritas) en comparación al músculo LAL, cuya composición de fibras es mayoritariamente del tipo rápida (Angaut-Petit et al., 1987). A pesar de estas diferencias, estudios posteriores realizados por los mismos autores en cultivos de miotubos indicaron que la tasa de inserción de los AChRs nuevos hacia la superficie celular resultó significativamente disminuida frente al tratamiento con litio (Pestronk and Drachman, 1987), tal como muestran nuestros análisis *in vivo* en uniones neuromusculares inervadas.

¿Cuáles podrían ser los mecanismos involucrados en el efecto de litio sobre la estabilidad de los AChRs en la membrana de la fibra muscular? Distinta evidencia obtenida en células CHO-K1/A5, que expresan el pentámero de AChRs tipo muscular adulto (Roccamo et al., 1999), han permitido discernir diferentes factores que controlan la internalización y estabilidad de los AChRs de superficie (Baier et al., 2010; Borroni and Barrantes, 2011; Kumari et al., 2008). A partir de estos estudios se ha determinado que la endocitosis de los AChRs conlleva un proceso de dos pasos: primero, estos receptores son removidos y secuestrados desde la proximidad de la membrana plasmática, y posteriormente, los AChRs van en tráfico hacia endosomas tempranos/tardíos, donde son posteriormente degradados por un mecanismo dependiente de lisosomas (Kumari et al., 2008). Aun cuando este mecanismo requiere la polimerización de actina y la actividad GTPasa de Rac1, se observó que este proceso es independiente de las vías clásicas de internalización mediadas por clatrina, caveolina o dinamina (Kumari et al., 2008). Por otra parte, ensayos en cultivos de miotubos han mostrado que litio ingresa a las células musculares a través de canales catiónicos, y este ion afecta

el tráfico de los AChRs de una forma similar a la invasión y a las vías dependiente de calcio, probablemente a través de una vía dependiente de inositol (Pestronk and Drachman, 1987). De manera interesante, experimentos *in vitro* donde la agregación de los AChRs en la superficie de microtubos fue estimulada con agrina, evidenciaron que litio promueve la dispersión de los AChRs a través de un mecanismo subsecuente a la fosforilación de la subunidad β del AChR, probablemente dependiente de la inhibición de la quinasa GSK-3 β , con una consecuente disrupción del citoesqueleto (Sharma and Wallace, 2003).

Consistente con las observaciones en uniones neuromusculares invadidas, el tratamiento con litio no ejerció un efecto significativo sobre la densidad de AChRs de superficie en células CHO-K1/A5, pero sí inhibió la internalización y el recambio de estos receptores. Este resultado abre la posibilidad de que litio regule efectores cruciales de la internalización de los AChRs. A este respecto, se ha descrito que litio previene la localización de Rac1 en los lamelipodios de queratinocitos (Koivisto et al., 2004) y disminuye la actividad GTPasa de Rac1 en monocitos primarios (Rom et al., 2012). En consecuencia, la inhibición en la función de Rac1 desorganizó la distribución de actina y disminuyó tanto la formación de lamelipodios como la migración celular (Koivisto et al., 2004; Rom et al., 2012). De esta forma, es posible sugerir que litio inhibe la internalización de los AChRs mediante una señalización local que altera el andamiaje de actina dependiente de Rac1, cuya organización es requerida para una correcta endocitosis. Otro posible mecanismo emerge desde estudios electrofisiológicos utilizando la unión neuromuscular del cangrejo de río, donde se mostró que el reemplazo de iones sodio por litio en la solución externa del electrodo resultó en la disminución de la liberación del neurotransmisor y consecuente inhibición de la excitabilidad del terminal presináptico (Ortiz and Junge, 1978). Este mecanismo resulta en la inestabilidad de los AChR derivada del bloqueo de la actividad pre o postsináptica (Akaaboune et al., 1999). Sin embargo, nuestros análisis resolutivos mediante microscopía de súper resolución indicaron que litio no alteró significativamente la organización de las zonas activas en la maquinaria presináptica. Comparado a

las uniones neuromusculares inervadas, litio generó un efecto completamente opuesto frente a la denervación, donde la estabilidad de los AChRs se redujo significativamente producto de la inhibición en la internalización de los AChRs y de una incorporación incrementada de los AChRs nuevos hacia la superficie postsináptica. Esta reducida estabilidad en los AChRs podría explicar el efecto desagregante que litio ejerce sobre los AChRs en cultivos primarios musculares (Mella et al., 2019). De esta forma, la combinación de estos efectos conllevó al establecimiento de dominios postsinápticos con una mayor densidad de AChRs, efecto que no se ha analizado en la subpoblación de AChRs reciclados denervados (Bruneau and Akaaboune, 2006). En este contexto, la idea de que litio impacta en la maquinaria postsináptica muscular mediante el incremento en la disponibilidad de AChRs también fue corroborada por la observación de que la mayoría de AChRs intracelulares ya se habían incorporado en la sinapsis neuromuscular al momento de la tinción de AChRs inicial (BTX-1) en los músculos denervados previamente tratados con litio, lo que podría explicar el incremento en la población de AChRs observados en tiempos de denervación similares a nuestra aproximación (Frank et al., 1976; Salpeter et al., 1986).

Respecto a cambios en moléculas utilizadas como marcador de denervación, se observó en músculos denervados la re-expresión de la subunidad fetal γ del AChR, consistente con los estudios previamente descritos (Goldman and Staple, 1989; Tsay and Schmidt, 1989; Witzemann et al., 1987), donde el tratamiento con litio no modificó significativamente sus niveles. En este aspecto, aunque las uniones neuromusculares denervadas y tratadas con litio exhiben una estabilidad de los AChRs reducida tal como en las uniones neuromusculares fetales, estas últimas poseen una menor conductancia y permeabilidad a calcio (Bouzat et al., 1994; Missias et al., 1997; Villarroel and Sakmann, 1996). Nuestros hallazgos sugieren que el efecto de litio en la unión neuromuscular no involucra a la subunidad γ y apoya la idea de que litio incrementa la disponibilidad y densidad de los AChRs para mejorar la transmisión sináptica una vez ocurrida la reinervación. Consistentemente, litio promovió la formación de agregados del AChR en las regiones no sinápticas, cuya colocalización con

los AChRs intracelulares sugiere que estos se encuentran *en route* hacia la superficie de la fibra muscular (Figura 40B).

En conjunto, nuestros datos revelan que litio causó un efecto dual sobre la estabilidad de los AChRs *in vivo*, lo cual aporta nuevas perspectivas sobre los mecanismos que regulan el uso de litio como agente terapéutico en los desórdenes neuropsiquiátricos. Además, aun cuando litio ha sido utilizado para el tratamiento de distintos tipos de distrofias musculares, dado su efecto en incrementar la fuerza muscular (Abu-Baker et al., 2013; Jones et al., 2012), su potencial efecto sobre la sinapsis neuromuscular en un contexto terapéutico no ha sido del todo elucidado. En este punto, evidencia relevante ha sido obtenida en ratones mutantes que expresan una forma truncada de MuSK que carece de su dominio rico en cisteína de unión a ligando (CRD). Estos ratones mutantes presentaron una organización y función postsináptica aberrante, la que se correlacionó con la exclusión de β -catenina desde la región de la placa motora (Messeant et al., 2015). De manera interesante, el tratamiento con litio rescató tanto las alteraciones de la unión neuromuscular como la localización de β -catenina en la región sináptica (Messeant et al., 2015). En este trabajo descubrimos que las uniones neuromusculares presentes en los músculos denervados tratados con litio preservaron la tinción de β -catenina dentro de la región de la placa motora. La redistribución de β -catenina dependiente de litio no fue similar a la estructura tipo pretzel que presenta la unión neuromuscular madura de la condición control, sino que se localizó en focos específicos dentro de la placa motora. Esta observación abre la posibilidad de que litio genere un incremento de los niveles de β -catenina en otro tipo celular residente en el nicho de la unión neuromuscular, los cuales se activan luego de la denervación (Liu et al., 2015; Proietti et al., 2021; Reynolds and Woolf, 1992). De esta forma, considerando la alta prevalencia de las enfermedades neuromusculares que tienen la unión neuromuscular como un blanco primario, nuestros estudios también revelan un potencial uso de litio como tratamiento complementario para regular la estabilidad de los AChRs en patologías asociadas al sistema muscular o motor, siempre

considerando la precaución de que durante las ventanas de tiempo que cursen con un grado de denervación avanzado, litio podría generar resultados negativos.

Por lo tanto, nuestros resultados mostraron que Fzd9 es requerido para la estabilidad postsináptica en uniones neuromusculares inervadas. Este efecto permitiría un potencial uso de este efector sobre la intervención en situaciones donde esta sinapsis esté negativamente comprometida. Sin embargo, considerando el efecto desestabilizador y desagregante de litio en ausencia del axón motor (Mella et al., 2019; Pestronk and Drachman, 1980), surge la interrogante del efecto que ejerce Fzd9 en una situación de daño a la sinapsis neuromuscular. A su vez, el estudio de la dinámica de AChRs en la desorganización morfológica inducida por denervación, permitiría identificar las ventanas de tiempo permisibles para el mantenimiento de esta sinapsis, dirigidas por ejemplo hacia el recambio y estabilidad de los AChRs (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2013; Roder et al., 2010; Roder et al., 2012), como también hacia componentes celulares que yacen en la vecindad de la unión neuromuscular para su eventual regeneración (Kang et al., 2019; Liu et al., 2017; Liu et al., 2015; Love and Thompson, 1999). Finalmente, la identificación del patrón de anillos en los AChRs intracelulares podría surgir como un marcador en etapas pre-sintomáticas de patologías asociadas al sistema locomotor o neuromusculares (Cantor et al., 2018; Oury et al., 2021), indicando de forma temprana el inicio de una degradación incrementada de AChRs como signo de la degeneración de la sinapsis neuromuscular.

IX. CONCLUSIONES

En base a los hallazgos obtenidos en esta tesis, es posible concluir que:

1. La denervación crónica induce la desorganización del aparato postsináptico, siendo la pérdida en la estabilidad de los AChRs un evento que antecede el colapso y pérdida en la morfología de la postsinapsis. Mas aún, previo a restaurar la estabilidad postsináptica, la reinervación de los aparatos postsinápticos resulta en cambios morfológicos de los agregados del AChR.
2. La denervación genera la aparición de compartimentos dentro de la estructura postsináptica, donde la subpoblación de AChRs pre-existentes y nuevos se localizarán de forma diferencial.
3. La subpoblación de AChRs intracelulares adquiere con la denervación un patrón diferencial respecto a las subpoblaciones de AChR pre-existentes y nuevos. Esta distribución está relacionada a las vías de degradación del AChRs una vez que ocurre su internalización.
4. Fzd9 se localiza en el dominio postsináptico de la unión neuromuscular, donde es requerido para el mantenimiento en la estabilidad de los AChRs.
5. Litio causa un efecto diferencial en la estabilidad del dominio postsináptico. Por un lado, estabilizando a los AChRs en uniones neuromusculares inervadas, mientras que en sinapsis denervadas, litio induce una pérdida en la estabilidad postsináptica y un incremento en la disponibilidad de AChRs en la superficie de la fibra muscular.

X. REFERENCIAS

- Abu-Baker, A., Laganier, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Brais, B., Neri, C., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2013). Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Death Dis* 4, e821.
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications* 9, 1911.
- Akaaboune, M., Culican, S.M., Turney, S.G., and Lichtman, J.W. (1999). Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Science* 286, 503-507.
- Alda, M. (2015). Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics. *Mol Psychiatry* 20, 661-670.
- Andreose, J.S., Xu, R., Lomo, T., Salpeter, M.M., and Fumagalli, G. (1993). Degradation of two AChR populations at rat neuromuscular junctions: regulation in vivo by electrical stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13, 3433-3438.
- Angaut-Petit, D., Molgo, J., Connold, A.L., and Faille, L. (1987). The levator auris longus muscle of the mouse: a convenient preparation for studies of short- and long-term presynaptic effects of drugs or toxins. *Neuroscience letters* 82, 83-88.
- Aoki, K., and Taketo, M.M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of cell science* 120, 3327-3335.
- Apel, E.D., Lewis, R.M., Grady, R.M., and Sanes, J.R. (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *The Journal of biological chemistry* 275, 31986-31995.
- Arbour, D., Vande Velde, C., and Robitaille, R. (2017). New perspectives on amyotrophic lateral sclerosis: the role of glial cells at the neuromuscular junction. *The Journal of physiology* 595, 647-661.
- Aviles, E.C., Pinto, C., Hanna, P., Ojeda, J., Perez, V., De Ferrari, G.V., Zamorano, P., Albistur, M., Sandoval, D., and Henriquez, J.P. (2014). Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 110.
- Badawi, Y., and Nishimune, H. (2020). Impairment Mechanisms and Intervention Approaches for Aged Human Neuromuscular Junctions. *Frontiers in molecular neuroscience* 13, 568426.
- Baier, C.J., Gallegos, C.E., Levi, V., and Barrantes, F.J. (2010). Cholesterol modulation of nicotinic acetylcholine receptor surface mobility. *Eur Biophys J* 39, 213-227.
- Balice-Gordon, R.J., Breedlove, S.M., Bernstein, S., and Lichtman, J.W. (1990). Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10, 2660-2671.

Balice-Gordon, R.J., and Lichtman, J.W. (1990). In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *10*, 894-908.

Barik, A., Lu, Y., Sathyamurthy, A., Bowman, A., Shen, C., Li, L., Xiong, W.C., and Mei, L. (2014a). LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *34*, 13892-13905.

Barik, A., Zhang, B., Sohal, G.S., Xiong, W.C., and Mei, L. (2014b). Crosstalk between Agrin and Wnt signaling pathways in development of vertebrate neuromuscular junction. *Developmental neurobiology* *74*, 828-838.

Belotti, E., and Schaeffer, L. (2020). Regulation of Gene expression at the neuromuscular Junction. *Neuroscience letters* *735*, 135163.

Besalduch, N., Tomas, M., Santafe, M.M., Garcia, N., Tomas, J., and Lanuza, M.A. (2010). Synaptic activity-related classical protein kinase C isoform localization in the adult rat neuromuscular synapse. *J Comp Neurol* *518*, 211-228.

Borroni, V., and Barrantes, F.J. (2011). Cholesterol modulates the rate and mechanism of acetylcholine receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* *286*, 17122-17132.

Bouzat, C., Bren, N., and Sine, S.M. (1994). Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron* *13*, 1395-1402.

Bowen, D.C., Park, J.S., Bodine, S., Stark, J.L., Valenzuela, D.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M., Glass, D.J., and DiStefano, P.S. (1998). Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction. *Developmental biology* *199*, 309-319.

Brenner, H.R., and Akaaboune, M. (2014). Recycling of acetylcholine receptors at ectopic postsynaptic clusters induced by exogenous agrin in living rats. *Developmental biology* *394*, 122-128.

Brenner, H.R., Witzemann, V., and Sakmann, B. (1990). Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. *Nature* *344*, 544-547.

Bruneau, E., Sutter, D., Hume, R.I., and Akaaboune, M. (2005). Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *25*, 9949-9959.

Bruneau, E.G., and Akaaboune, M. (2006). The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo. *Development* *133*, 4485-4493.

Buchthal, F., and Kuhl, V. (1979). Nerve conduction, tactile sensibility, and the electromyogram after suture or compression of peripheral nerve: a longitudinal study in man. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *42*, 436-451.

Burden, S. (1977). Development of the neuromuscular junction in the chick embryo: the number, distribution, and stability of acetylcholine receptors. *Developmental biology* *57*, 317-329.

Burden, S.J., Huijbers, M.G., and Remedio, L. (2018). Fundamental Molecules and Mechanisms for Forming and Maintaining Neuromuscular Synapses. *International journal of molecular sciences* 19.

Burden, S.J., Yumoto, N., and Zhang, W. (2013). The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a009167.

Caldwell, J.H. (2000). Clustering of sodium channels at the neuromuscular junction. *Microscopy research and technique* 49, 84-89.

Cantor, S., Zhang, W., Delestree, N., Remedio, L., Mentis, G.Z., and Burden, S.J. (2018). Preserving neuromuscular synapses in ALS by stimulating MuSK with a therapeutic agonist antibody. *eLife* 7.

Chailangkarn, T., Trujillo, C.A., Freitas, B.C., Hrvoj-Mihic, B., Herai, R.H., Yu, D.X., Brown, T.T., Marchetto, M.C., Bardy, C., McHenry, L., *et al.* (2016). A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. *Nature* 536, 338-343.

Chan, J.P., Clune, J., Shah, S.B., Ward, S.R., Kocsis, J.D., Mozaffar, T., Steward, O., and Gupta, R. (2020). Examination of the human motor endplate after brachial plexus injury with two-photon microscopy. *Muscle & nerve* 61, 390-395.

Chen, F., Qian, L., Yang, Z.H., Huang, Y., Ngo, S.T., Ruan, N.J., Wang, J., Schneider, C., Noakes, P.G., Ding, Y.Q., *et al.* (2007). Rapsyn interaction with calpain stabilizes AChR clusters at the neuromuscular junction. *Neuron* 55, 247-260.

Chen, J., Mizushige, T., and Nishimune, H. (2012). Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. *J Comp Neurol* 520, 434-452.

Chen, P.J., Martinez-Pena, Y.V.I., Aittaleb, M., and Akaaboune, M. (2016). AChRs Are Essential for the Targeting of Rapsyn to the Postsynaptic Membrane of NMJs in Living Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36, 5680-5685.

Choi, K.R., Berrera, M., Reischl, M., Strack, S., Albrizio, M., Roder, I.V., Wagner, A., Petersen, Y., Hafner, M., Zaccolo, M., *et al.* (2012). Rapsyn mediates subsynaptic anchoring of PKA type I and stabilisation of acetylcholine receptor in vivo. *Journal of cell science* 125, 714-723.

Cuitino, L., Godoy, J.A., Farias, G.G., Couve, A., Bonansco, C., Fuenzalida, M., and Inestrosa, N.C. (2010). Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 8411-8420.

de Oliveira, G.P., Maximino, J.R., Maschietto, M., Zanoteli, E., Puga, R.D., Lima, L., Carraro, D.M., and Chadi, G. (2014). Early gene expression changes in skeletal muscle from SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis animal model. *Cellular and molecular neurobiology* 34, 451-462.

DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., *et al.* (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.

Dema, A., Schroter, M.F., Perets, E., Skroblin, P., Moutty, M.C., Deak, V.A., Birchmeier, W., and Klusmann, E. (2016). The A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Glycogen Synthase Kinase 3beta Interaction Protein (GSKIP) Regulates beta-Catenin through Its Interactions with Both Protein Kinase A (PKA) and GSK3beta. *The Journal of biological chemistry* 291, 19618-19630.

- Dobrowolny, G., Bernardini, C., Martini, M., Baranzini, M., Barba, M., and Musaro, A. (2015). Muscle Expression of SOD1(G93A) Modulates microRNA and mRNA Transcription Pattern Associated with the Myelination Process in the Spinal Cord of Transgenic Mice. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 463.
- Drachman, D.B., Adams, R.N., Stanley, E.F., and Pestronk, A. (1980). Mechanisms of acetylcholine receptor loss in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 43, 601-610.
- Egger-Adam, D., and Katanaev, V.L. (2008). Trimeric G protein-dependent signaling by Frizzled receptors in animal development. *Front Biosci* 13, 4740-4755.
- Eguchi, T., Tezuka, T., Miyoshi, S., and Yamanashi, Y. (2016). Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology. *Genes Cells* 21, 670-676.
- Faroni, A., Mobasser, S.A., Kingham, P.J., and Reid, A.J. (2015). Peripheral nerve regeneration: experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev* 82-83, 160-167.
- Fatt, P., and Katz, B. (1952). The electric activity of the motor end-plate. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140, 183-186.
- Fischbach, G.D., and Rosen, K.M. (1997). ARIA: a neuromuscular junction neuregulin. *Annual review of neuroscience* 20, 429-458.
- Francke, U. (1999). Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Human molecular genetics* 8, 1947-1954.
- Frank, E., Gautvik, K., and Sommerschild, H. (1976). Persistence of junctional acetylcholine receptors following denervation. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 40, 275-281.
- Fu, S.Y., and Gordon, T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 14, 67-116.
- Fumagalli, G., Balbi, S., Cangiano, A., and Lomo, T. (1990). Regulation of turnover and number of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron* 4, 563-569.
- Garcia, N., Balana, C., Lanuza, M.A., Tomas, M., Cilleros-Mane, V., Just-Borras, L., and Tomas, J. (2019). Opposed Actions of PKA Isozymes (RI and RII) and PKC Isoforms (cPKCbetaI and nPKCepsilon) in Neuromuscular Developmental Synapse Elimination. *Cells* 8.
- Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G.C., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377, 232-236.
- Gideons, E.S., Lin, P.Y., Mahgoub, M., Kavalali, E.T., and Monteggia, L.M. (2017). Chronic lithium treatment elicits its antimanic effects via BDNF-TrkB dependent synaptic downscaling. *eLife* 6.
- Goldman, D., and Staple, J. (1989). Spatial and temporal expression of acetylcholine receptor RNAs in innervated and denervated rat soleus muscle. *Neuron* 3, 219-228.
- Gordon, M.D., and Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 281, 22429-22433.

- Grady, R.M., Starr, D.A., Ackerman, G.L., Sanes, J.R., and Han, M. (2005). Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 4359-4364.
- Grosheva, M., Rink, S., Jansen, R., Bendella, H., Pavlov, S.P., Sarikcioglu, L., Angelov, D.N., and Dunlop, S.A. (2018). Early and continued manual stimulation is required for long-term recovery after facial nerve injury. *Muscle & nerve* *57*, 100-106.
- Gu, Y., and Hall, Z.W. (1988). Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* *1*, 117-125.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., *et al.* (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* *264*, 1772-1775.
- Haddix, S.G., Lee, Y.I., Kornegay, J.N., and Thompson, W.J. (2018). Cycles of myofiber degeneration and regeneration lead to remodeling of the neuromuscular junction in two mammalian models of Duchenne muscular dystrophy. *PloS one* *13*, e0205926.
- Hallock, P.T., Xu, C.F., Park, T.J., Neubert, T.A., Curran, T., and Burden, S.J. (2010). Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L. *Genes & development* *24*, 2451-2461.
- Hartzell, H.C., and Fambrough, D.M. (1973). Acetylcholine receptor production and incorporation into membranes of developing muscle fibers. *Developmental biology* *30*, 153-165.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* *131*, 1663-1677.
- Henriquez, J.P., and Salinas, P.C. (2012). Dual roles for Wnt signalling during the formation of the vertebrate neuromuscular junction. *Acta physiologica* *204*, 128-136.
- Henriquez, J.P., Webb, A., Bence, M., Bildsoe, H., Sahores, M., Hughes, S.M., and Salinas, P.C. (2008). Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 18812-18817.
- Heuser, J.E., and Salpeter, S.R. (1979). Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. *The Journal of cell biology* *82*, 150-173.
- Hoke, A. (2006). Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol* *2*, 448-454.
- Huang, C.F., Flucher, B.E., Schmidt, M.M., Stroud, S.K., and Schmidt, J. (1994). Depolarization-transcription signals in skeletal muscle use calcium flux through L channels, but bypass the sarcoplasmic reticulum. *Neuron* *13*, 167-177.
- Huang, K.P. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in neurosciences* *12*, 425-432.

Huebner, E.A., and Strittmatter, S.M. (2009). Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. *Results and problems in cell differentiation* 48, 339-351.

Huijbers, M.G., Vergoossen, D.L., Fillie-Grijpma, Y.E., van Es, I.E., Koning, M.T., Slot, L.M., Veelken, H., Plomp, J.J., van der Maarel, S.M., and Verschuuren, J.J. (2019). MuSK myasthenia gravis monoclonal antibodies: Valency dictates pathogenicity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 6, e547.

Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1976). L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of physiology* 262, 215-236.

Jing, L., Lefebvre, J.L., Gordon, L.R., and Granato, M. (2009). Wnt signals organize synaptic prepattern and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor. *Neuron* 61, 721-733.

Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N.A., and Timchenko, L.T. (2012). GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 122, 4461-4472.

Jones, R.A., Reich, C.D., Dissanayake, K.N., Kristmundsdottir, F., Findlater, G.S., Ribchester, R.R., Simmen, M.W., and Gillingwater, T.H. (2016). NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure-function relationships at the neuromuscular junction. *Open biology* 6.

Kang, H., Tian, L., and Thompson, W.J. (2019). Schwann cell guidance of nerve growth between synaptic sites explains changes in the pattern of muscle innervation and remodeling of synaptic sites following peripheral nerve injuries. *J Comp Neurol* 527, 1388-1400.

Katz, B. (1958). Microphysiology of the neuromuscular junction; the chemo-receptor function of the motor end-plate. *Bull Johns Hopkins Hosp* 102, 296-312.

Ketterer, C., Zeiger, U., Budak, M.T., Rubinstein, N.A., and Khurana, T.S. (2010). Identification of the neuromuscular junction transcriptome of extraocular muscle by laser capture microdissection. *Investigative ophthalmology & visual science* 51, 4589-4599.

Khan, M.M., Strack, S., Wild, F., Hanashima, A., Gasch, A., Brohm, K., Reischl, M., Carnio, S., Labeit, D., Sandri, M., *et al.* (2014). Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. *Autophagy* 10, 123-136.

Kim, N., and Burden, S.J. (2008). MuSK controls where motor axons grow and form synapses. *Nature neuroscience* 11, 19-27.

Kim, N., Stiegler, A.L., Cameron, T.O., Hallock, P.T., Gomez, A.M., Huang, J.H., Hubbard, S.R., Dustin, M.L., and Burden, S.J. (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135, 334-342.

Klein, P.S., and Melton, D.A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8455-8459.

Koivisto, L., Hakkinen, L., Matsumoto, K., McCulloch, C.A., Yamada, K.M., and Larjava, H. (2004). Glycogen synthase kinase-3 regulates cytoskeleton and translocation of Rac1 in long cellular extensions of human keratinocytes. *Experimental cell research* 293, 68-80.

Koles, K., and Budnik, V. (2012). Wnt signaling in neuromuscular junction development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4.

Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K.E., Ehler, E., Henriquez, J.P., Hughes, S.M., and Salinas, P.C. (2002). WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* 35, 1043-1056.

Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., and Moon, R.T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in genetics : TIG* 16, 279-283.

Kumari, S., Borroni, V., Chaudhry, A., Chanda, B., Massol, R., Mayor, S., and Barrantes, F.J. (2008). Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *The Journal of cell biology* 181, 1179-1193.

Kummer, T.T., Misgeld, T., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2004). Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. *The Journal of cell biology* 164, 1077-1087.

Kurimoto, S., Jung, J., Tapadia, M., Lengfeld, J., Agalliu, D., Waterman, M., Mozaffar, T., and Gupta, R. (2015). Activation of the Wnt/beta-catenin signaling cascade after traumatic nerve injury. *Neuroscience* 294, 101-108.

Langeberg, L.K., and Scott, J.D. (2015). Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 232-244.

Lanuza, M.A., Garcia, N., Santafe, M., Gonzalez, C.M., Alonso, I., Nelson, P.G., and Tomas, J. (2002). Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C. *Journal of neuroscience research* 67, 607-617.

Lanuza, M.A., Santafe, M.M., Garcia, N., Besalduch, N., Tomas, M., Obis, T., Priego, M., Nelson, P.G., and Tomas, J. (2014). Protein kinase C isoforms at the neuromuscular junction: localization and specific roles in neurotransmission and development. *Journal of anatomy* 224, 61-73.

Lee, C.W., Han, J., Bamburg, J.R., Han, L., Lynn, R., and Zheng, J.Q. (2009). Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking. *Nature neuroscience* 12, 848-856.

Levitt, T.A., and Salpeter, M.M. (1981). Denervated endplates have a dual population of junctional acetylcholine receptors. *Nature* 291, 239-241.

Li, L., Cao, Y., Wu, H., Ye, X., Zhu, Z., Xing, G., Shen, C., Barik, A., Zhang, B., Xie, X., *et al.* (2016). Enzymatic Activity of the Scaffold Protein Rapsyn for Synapse Formation. *Neuron* 92, 1007-1019.

Li, L., Xiong, W.C., and Mei, L. (2018). Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annual review of physiology* 80, 159-188.

Li, M.X., Jia, M., Jiang, H., Dunlap, V., and Nelson, P.G. (2001). Opposing actions of protein kinase A and C mediate Hebbian synaptic plasticity. *Nature neuroscience* 4, 871-872.

Li, X.M., Dong, X.P., Luo, S.W., Zhang, B., Lee, D.H., Ting, A.K., Neiswender, H., Kim, C.H., Carpenter-Hyland, E., Gao, T.M., *et al.* (2008). Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin. *Nature neuroscience* 11, 262-268.

- Lin, S., Landmann, L., Ruegg, M.A., and Brenner, H.R. (2008). The role of nerve- versus muscle-derived factors in mammalian neuromuscular junction formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 3333-3340.
- Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, B., Pfaff, S.L., Sanes, J.R., and Lee, K.F. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410, 1057-1064.
- Lin, W., Dominguez, B., Yang, J., Aryal, P., Brandon, E.P., Gage, F.H., and Lee, K.F. (2005). Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron* 46, 569-579.
- Linnoila, J., Wang, Y., Yao, Y., and Wang, Z.Z. (2008). A mammalian homolog of *Drosophila* tumorous imaginal discs, Tid1, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction. *Neuron* 60, 625-641.
- Liu, W., Klose, A., Forman, S., Paris, N.D., Wei-LaPierre, L., Cortes-Lopez, M., Tan, A., Flaherty, M., Miura, P., Dirksen, R.T., *et al.* (2017). Loss of adult skeletal muscle stem cells drives age-related neuromuscular junction degeneration. *eLife* 6.
- Liu, W., Wei-LaPierre, L., Klose, A., Dirksen, R.T., and Chakkalakal, J.V. (2015). Inducible depletion of adult skeletal muscle stem cells impairs the regeneration of neuromuscular junctions. *eLife* 4.
- Liu, X., Rubin, J.S., and Kimmel, A.R. (2005). Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Current biology : CB* 15, 1989-1997.
- Liu, Y., Sugiura, Y., Wu, F., Mi, W., Taketo, M.M., Cannon, S., Carroll, T., and Lin, W. (2012). beta-Catenin stabilization in skeletal muscles, but not in motor neurons, leads to aberrant motor innervation of the muscle during neuromuscular development in mice. *Developmental biology* 366, 255-267.
- Love, F.M., and Thompson, W.J. (1999). Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 10390-10396.
- Lucas, F.R., and Salinas, P.C. (1997). WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Developmental biology* 192, 31-44.
- Luchtenborg, A.M., Solis, G.P., Egger-Adam, D., Koval, A., Lin, C., Blanchard, M.G., Kellenberger, S., and Katanaev, V.L. (2014). Heterotrimeric Go protein links Wnt-Frizzled signaling with ankyrins to regulate the neuronal microtubule cytoskeleton. *Development* 141, 3399-3409.
- Luo, Z.G., Wang, Q., Zhou, J.Z., Wang, J., Luo, Z., Liu, M., He, X., Wynshaw-Boris, A., Xiong, W.C., Lu, B., *et al.* (2002). Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron* 35, 489-505.
- Ma, C.H., Omura, T., Cobos, E.J., Latremoliere, A., Ghasemlou, N., Brenner, G.J., van Veen, E., Barrett, L., Sawada, T., Gao, F., *et al.* (2011). Accelerating axonal growth promotes motor recovery after peripheral nerve injury in mice. *J Clin Invest* 121, 4332-4347.

- Magill, C.K., Tong, A., Kawamura, D., Hayashi, A., Hunter, D.A., Parsadanian, A., Mackinnon, S.E., and Myckatyn, T.M. (2007). Reinnervation of the tibialis anterior following sciatic nerve crush injury: a confocal microscopic study in transgenic mice. *Experimental neurology* 207, 64-74.
- Magnusson, C., Svensson, A., Christerson, U., and Tagerud, S. (2005). Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *The European journal of neuroscience* 21, 577-580.
- Marchand, S., Devillers-Thiery, A., Pons, S., Changeux, J.P., and Cartaud, J. (2002). Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 8891-8901.
- Marques, M.J., Conchello, J.A., and Lichtman, J.W. (2000). From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 3663-3675.
- Martinez-Martinez, P., Phernambucq, M., Steinbusch, L., Schaeffer, L., Berrih-Aknin, S., Duimel, H., Frederik, P., Molenaar, P., De Baets, M.H., and Losen, M. (2009). Silencing rapsyn in vivo decreases acetylcholine receptors and augments sodium channels and secondary postsynaptic membrane folding. *Neurobiology of disease* 35, 14-23.
- Martinez-Pena y Valenzuela, I., Mouslim, C., and Akaaboune, M. (2010). Calcium/calmodulin kinase II-dependent acetylcholine receptor cycling at the mammalian neuromuscular junction in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 12455-12465.
- Martinez-Pena y Valenzuela, I., Pires-Oliveira, M., and Akaaboune, M. (2013). PKC and PKA regulate AChR dynamics at the neuromuscular junction of living mice. *PloS one* 8, e81311.
- Martinez-Pena, Y.V.I., Aittaleb, M., Chen, P.J., and Akaaboune, M. (2015). The knockdown of alphakap alters the postsynaptic apparatus of neuromuscular junctions in living mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 5118-5127.
- Martinez-Pena, Y.V.I., and Akaaboune, M. (2021). The Metabolic Stability of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at the Neuromuscular Junction. *Cells* 10.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493-495.
- McEwen, D.G., and Peifer, M. (2000). Wnt signaling: Moving in a new direction. *Current biology : CB* 10, R562-564.
- McIntire, S.L., Jorgensen, E., Kaplan, J., and Horvitz, H.R. (1993). The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 364, 337-341.
- Mejat, A., Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., and Schaeffer, L. (2003). Synapse-specific gene expression at the neuromuscular junction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 998, 53-65.
- Mella, J., Perez, V., Zelada, D., Moreno, N., Ionescu, A., Perlson, E., and Henriquez, J.P. (2019). Efficient gene transfer into primary muscle cells to analyze nerve-independent postsynaptic organization in vitro. *Neuromuscul Disord* 29, 533-542.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical journal* 332 (Pt 2), 281-292.

Menorca, R.M., Fussell, T.S., and Elfar, J.C. (2013). Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand clinics* 29, 317-330.

Merlie, J.P., Isenberg, K.E., Russell, S.D., and Sanes, J.R. (1984). Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. *The Journal of cell biology* 99, 332-335.

Merlie, J.P., and Lindstrom, J. (1983). Assembly in vivo of mouse muscle acetylcholine receptor: identification of an alpha subunit species that may be an assembly intermediate. *Cell* 34, 747-757.

Messeant, J., Dobbertin, A., Girard, E., Delers, P., Manuel, M., Mangione, F., Schmitt, A., Le Denmat, D., Molgo, J., Zytnicki, D., *et al.* (2015). MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 4926-4941.

Mihailovska, E., Raith, M., Valencia, R.G., Fischer, I., Al Banchaabouchi, M., Herbst, R., and Wiche, G. (2014). Neuromuscular synapse integrity requires linkage of acetylcholine receptors to postsynaptic intermediate filament networks via rapsyn-plectin 1f complexes. *Molecular biology of the cell* 25, 4130-4149.

Millar, N.S., and Harkness, P.C. (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Molecular membrane biology* 25, 279-292.

Misgeld, T., Kummer, T.T., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2005). Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11088-11093.

Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406-411.

Missias, A.C., Mudd, J., Cunningham, J.M., Steinbach, J.H., Merlie, J.P., and Sanes, J.R. (1997). Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit. *Development* 124, 5075-5086.

Miyoshi, S., Tezuka, T., Arimura, S., Tomono, T., Okada, T., and Yamanashi, Y. (2017). DOK7 gene therapy enhances motor activity and life span in ALS model mice. *EMBO Mol Med* 9, 880-889.

Mole, A.J., Bell, S., Thomson, A.K., Dissanayake, K.N., Ribchester, R.R., and Murray, L.M. (2020). Synaptic withdrawal following nerve injury is influenced by postnatal maturity, muscle-specific properties, and the presence of underlying pathology in mice. *Journal of anatomy* 237, 263-274.

Moseley, J.B., Bartolini, F., Okada, K., Wen, Y., Gundersen, G.G., and Goode, B.L. (2007). Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin. *The Journal of biological chemistry* 282, 12661-12668.

Muntean, B.S., Masuho, I., Dao, M., Sutton, L.P., Zucca, S., Iwamoto, H., Patil, D.N., Wang, D., Birnbaumer, L., Blakely, R.D., *et al.* (2021). Galphao is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell reports* 34, 108718.

Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625-3637.

- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593-605.
- Nakano, S., Shimohama, S., Saitoh, T., Akiguchi, I., and Kimura, J. (1992). Localization of protein kinase C in human skeletal muscle. *Muscle & nerve* 15, 496-499.
- Nimnual, A.S., Chang, W., Chang, N.S., Ross, A.F., Gelman, M.S., and Prives, J.M. (1998). Identification of phosphorylation sites on AChR delta-subunit associated with dispersal of AChR clusters on the surface of muscle cells. *Biochemistry* 37, 14823-14832.
- Noakes, P.G., Phillips, W.D., Hanley, T.A., Sanes, J.R., and Merlie, J.P. (1993). 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Developmental biology* 155, 275-280.
- Ohno, S., Akita, Y., Hata, A., Osada, S., Kubo, K., Konno, Y., Akimoto, K., Mizuno, K., Saido, T., Kuroki, T., *et al.* (1991). Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv Enzyme Regul* 31, 287-303.
- Ojeda, J., Bermedo-Garcia, F., Perez, V., Mella, J., Hanna, P., Herzberg, D., Tejero, R., Lopez-Manzaneda, M., Tabares, L., and Henriquez, J.P. (2020). The Mouse Levator Auris Longus Muscle: An Amenable Model System to Study the Role of Postsynaptic Proteins to the Maintenance and Regeneration of the Neuromuscular Synapse. *Frontiers in cellular neuroscience* 14, 225.
- Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., *et al.* (2006). The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312, 1802-1805.
- Olmstead, D.N., Mesnard-Hoaglin, N.A., Batka, R.J., Haulcomb, M.M., Miller, W.M., and Jones, K.J. (2015). Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e52382.
- Ortiz, C.L., and Junge, D. (1978). Depressant action of lithium at the crayfish neuromuscular junction: pre- and postsynaptic effects. *J Exp Biol* 75, 171-187.
- Oury, J., Liu, Y., Topf, A., Todorovic, S., Hoedt, E., Preethish-Kumar, V., Neubert, T.A., Lin, W., Lochmuller, H., and Burden, S.J. (2019). MACF1 links Rapsyn to microtubule- and actin-binding proteins to maintain neuromuscular synapses. *The Journal of cell biology* 218, 1686-1705.
- Oury, J., Zhang, W., Leloup, N., Koide, A., Corrado, A.D., Ketavarapu, G., Hattori, T., Koide, S., and Burden, S.J. (2021). Mechanism of disease and therapeutic rescue of Dok7 congenital myasthenia. *Nature* 595, 404-408.
- Park, E.J., Sun, X., Nichol, P., Saijoh, Y., Martin, J.F., and Moon, A.M. (2008). System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the Foxa2 locus in mice. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 447-453.
- Perez-Garcia, M.J., and Burden, S.J. (2012). Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell reports* 2, 497-502.

- Perkins, G.A., Wang, L., Huang, L.J., Humphries, K., Yao, V.J., Martone, M., Deerinck, T.J., Barraclough, D.M., Violin, J.D., Smith, D., *et al.* (2001). PKA, PKC, and AKAP localization in and around the neuromuscular junction. *BMC Neurosci* 2, 17.
- Pestronk, A., and Drachman, D.B. (1980). Lithium reduces the number of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Science* 210, 342-343.
- Pestronk, A., and Drachman, D.B. (1987). Mechanism of action of lithium on acetylcholine receptor metabolism in skeletal muscle. *Brain Res* 412, 302-310.
- Phillips, W.D., Noakes, P.G., Roberds, S.L., Campbell, K.P., and Merlie, J.P. (1993). Clustering and immobilization of acetylcholine receptors by the 43-kD protein: a possible role for dystrophin-related protein. *The Journal of cell biology* 123, 729-740.
- Phillips, W.D., and Vincent, A. (2016). Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms. *F1000Research* 5.
- Pratt, S.J.P., Valencia, A.P., Le, G.K., Shah, S.B., and Lovering, R.M. (2015). Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Front Physiol* 6, 252.
- Proietti, D., Giordani, L., De Bardi, M., D'Ercole, C., Lozanoska-Ochser, B., Amadio, S., Volonte, C., Marinelli, S., Muchir, A., Bouche, M., *et al.* (2021). Activation of skeletal muscle-resident glial cells upon nerve injury. *JCI Insight* 6.
- Ramirez, V.T., Ramos-Fernandez, E., Henriquez, J.P., Lorenzo, A., and Inestrosa, N.C. (2016). Wnt-5a/Frizzled9 Receptor Signaling through the Galphao-Gbetagamma Complex Regulates Dendritic Spine Formation. *The Journal of biological chemistry* 291, 19092-19107.
- Redfern, P.A. (1970). Neuromuscular transmission in new-born rats. *The Journal of physiology* 209, 701-709.
- Reilein, A., and Nelson, W.J. (2005). APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks. *Nature cell biology* 7, 463-473.
- Reinert, R.B., Kantz, J., Misfeldt, A.A., Poffenberger, G., Gannon, M., Brissova, M., and Powers, A.C. (2012). Tamoxifen-Induced Cre-loxP Recombination Is Prolonged in Pancreatic Islets of Adult Mice. *PloS one* 7, e33529.
- Ren, D.N., Chen, J., Li, Z., Yan, H., Yin, Y., Wo, D., Zhang, J., Ao, L., Chen, B., Ito, T.K., *et al.* (2015). LRP5/6 directly bind to Frizzled and prevent Frizzled-regulated tumour metastasis. *Nature communications* 6, 6906.
- Reynolds, J.G., McCalmon, S.A., Donaghey, J.A., and Naya, F.J. (2008). Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry* 283, 8070-8074.
- Reynolds, M.L., and Woolf, C.J. (1992). Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 21, 50-66.
- Robbins, N. (1992). Compensatory plasticity of aging at the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* 27, 75-81.

- Roccamo, A.M., Pediconi, M.F., Aztiria, E., Zanello, L., Wolstenholme, A., and Barrantes, F.J. (1999). Cells defective in sphingolipids biosynthesis express low amounts of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *The European journal of neuroscience* *11*, 1615-1623.
- Roder, I.V., Choi, K.R., Reischl, M., Petersen, Y., Diefenbacher, M.E., Zacco, M., Pozzan, T., and Rudolf, R. (2010). Myosin Va cooperates with PKA RIalpha to mediate maintenance of the endplate in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 2031-2036.
- Roder, I.V., Lissandron, V., Martin, J., Petersen, Y., Di Benedetto, G., Zacco, M., and Rudolf, R. (2009). PKA microdomain organisation and cAMP handling in healthy and dystrophic muscle in vivo. *Cellular signalling* *21*, 819-826.
- Roder, I.V., Strack, S., Reischl, M., Dahley, O., Khan, M.M., Kassel, O., Zacco, M., and Rudolf, R. (2012). Participation of myosin Va and Pka type I in the regeneration of neuromuscular junctions. *PloS one* *7*, e40860.
- Rom, S., Fan, S., Reichenbach, N., Dykstra, H., Ramirez, S.H., and Persidsky, Y. (2012). Glycogen synthase kinase 3beta inhibition prevents monocyte migration across brain endothelial cells via Rac1-GTPase suppression and down-regulation of active integrin conformation. *Am J Pathol* *181*, 1414-1425.
- Rosse, C., Linch, M., Kermorgant, S., Cameron, A.J., Boeckeler, K., and Parker, P.J. (2010). PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 103-112.
- Rudolf, R., Khan, M.M., Labeit, S., and Deschenes, M.R. (2014). Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Front Aging Neurosci* *6*, 99.
- Rudolf, R., Khan, M.M., Lustrino, D., Labeit, S., Kettelhut, I.C., and Navegantes, L.C. (2013). Alterations of cAMP-dependent signaling in dystrophic skeletal muscle. *Front Physiol* *4*, 290.
- Rudolf, R., and Straka, T. (2019). Nicotinic acetylcholine receptor at vertebrate motor endplates: Endocytosis, recycling, and degradation. *Neuroscience letters* *711*, 134434.
- Sakuma, M., Gorski, G., Sheu, S.H., Lee, S., Barrett, L.B., Singh, B., Omura, T., Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2016). Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *The European journal of neuroscience* *43*, 451-462.
- Salinas, P.C. (1999). Wnt factors in axonal remodelling and synaptogenesis. *Biochemical Society symposium* *65*, 101-109.
- Salinas, P.C., and Zou, Y. (2008). Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annual review of neuroscience* *31*, 339-358.
- Salpeter, M.M., Cooper, D.L., and Levitt-Gilmour, T. (1986). Degradation rates of acetylcholine receptors can be modified in the postjunctional plasma membrane of the vertebrate neuromuscular junction. *The Journal of cell biology* *103*, 1399-1403.
- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience* *22*, 389-442.

- Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* 2, 791-805.
- Savastano, L.E., Laurito, S.R., Fitt, M.R., Rasmussen, J.A., Gonzalez Polo, V., and Patterson, S.I. (2014). Sciatic nerve injury: a simple and subtle model for investigating many aspects of nervous system damage and recovery. *Journal of neuroscience methods* 227, 166-180.
- Schulte, G., and Bryja, V. (2007). The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 28, 518-525.
- Schulte, G., and Wright, S.C. (2018). Frizzleds as GPCRs - More Conventional Than We Thought! *Trends in pharmacological sciences* 39, 828-842.
- Scott, L.J., Bacou, F., and Sanes, J.R. (1988). A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 932-944.
- Sharma, S.K., and Wallace, B.G. (2003). Lithium inhibits a late step in agrin-induced AChR aggregation. *Journal of neurobiology* 54, 346-357.
- Shen, C., Li, L., Zhao, K., Bai, L., Wang, A., Shu, X., Xiao, Y., Zhang, J., Zhang, K., Hui, T., *et al.* (2018). Motoneuron Wnts regulate neuromuscular junction development. *eLife* 7.
- Shi, L., Fu, A.K., and Ip, N.Y. (2012). Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends in neurosciences* 35, 441-453.
- Shyng, S.L., and Salpeter, M.M. (1989). Degradation rate of acetylcholine receptors inserted into denervated vertebrate neuromuscular junctions. *The Journal of cell biology* 108, 647-651.
- Shyng, S.L., Xu, R., and Salpeter, M.M. (1991). Cyclic AMP stabilizes the degradation of original junctional acetylcholine receptors in denervated muscle. *Neuron* 6, 469-475.
- Slater, C.R. (1982). Neural influence on the postnatal changes in acetylcholine receptor distribution at nerve-muscle junctions in the mouse. *Developmental biology* 94, 23-30.
- Slater, C.R. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *International journal of molecular sciences* 18.
- Slater, C.R. (2019). 'Fragmentation' of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions. *Neuroscience*.
- St John, P.A., and Gordon, H. (2001). Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes. *Journal of neurobiology* 49, 212-223.
- Stambolic, V., Ruel, L., and Woodgett, J.R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Current biology : CB* 6, 1664-1668.
- Steinbach, J.H. (1981). Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions. *Developmental biology* 84, 267-276.
- Steinhart, Z., and Angers, S. (2018). Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development* 145.

- Strack, S., Khan, M.M., Wild, F., Rall, A., and Rudolf, R. (2015). Turnover of acetylcholine receptors at the endplate revisited: novel insights into nerve-dependent behavior. *J Muscle Res Cell Motil* 36, 517-524.
- Strack, S., Petersen, Y., Wagner, A., Roder, I.V., Albrizio, M., Reischl, M., Wacker, I.U., Wilhelm, C., and Rudolf, R. (2011). A novel labeling approach identifies three stability levels of acetylcholine receptors in the mouse neuromuscular junction in vivo. *PloS one* 6, e20524.
- Strochlic, L., Falk, J., Goillot, E., Sigoillot, S., Bourgeois, F., Delers, P., Rouviere, J., Swain, A., Castellani, V., Schaeffer, L., *et al.* (2012). Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PloS one* 7, e29976.
- Svensson, A., Norrby, M., Libelius, R., and Tagerud, S. (2008). Secreted frizzled related protein 1 (Sfrp1) and Wnt signaling in innervated and denervated skeletal muscle. *Journal of molecular histology* 39, 329-337.
- Takamori, M., Nakamura, T., and Motomura, M. (2013). Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis. *Journal of neuroimmunology* 254, 183-186.
- Tapia, J.C., Wylie, J.D., Kasthuri, N., Hayworth, K.J., Schalek, R., Berger, D.R., Guatimosim, C., Seung, H.S., and Lichtman, J.W. (2012). Pervasive synaptic branch removal in the mammalian neuromuscular system at birth. *Neuron* 74, 816-829.
- Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E., and Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1697, 259-269.
- Tintignac, L.A., Brenner, H.R., and Ruegg, M.A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiological reviews* 95, 809-852.
- Torres, L.F., and Duchen, L.W. (1987). The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110 (Pt 2), 269-299.
- Tsay, H.J., and Schmidt, J. (1989). Skeletal muscle denervation activates acetylcholine receptor genes. *The Journal of cell biology* 108, 1523-1526.
- Turney, S.G., Culican, S.M., and Lichtman, J.W. (1996). A quantitative fluorescence-imaging technique for studying acetylcholine receptor turnover at neuromuscular junctions in living animals. *Journal of neuroscience methods* 64, 199-208.
- Ueta, R., Sugita, S., Minegishi, Y., Shimotoyodome, A., Ota, N., Ogiso, N., Eguchi, T., and Yamanashi, Y. (2020). DOK7 Gene Therapy Enhances Neuromuscular Junction Innervation and Motor Function in Aged Mice. *iScience* 23, 101385.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D., Jr., Gage, F.H., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2010). Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14863-14868.
- van der Pijl, E.M., van Putten, M., Niks, E.H., Verschuuren, J.J., Aartsma-Rus, A., and Plomp, J.J. (2016). Characterization of neuromuscular synapse function abnormalities in multiple Duchenne muscular dystrophy mouse models. *The European journal of neuroscience* 43, 1623-1635.

- Varela-Nallar, L., Ramirez, V.T., Gonzalez-Billault, C., and Inestrosa, N.C. (2012). Frizzled receptors in neurons: from growth cones to the synapse. *Cytoskeleton* 69, 528-534.
- Villarroel, A., and Sakmann, B. (1996). Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *The Journal of physiology* 496 (Pt 2), 331-338.
- Wanamaker, C.P., Christianson, J.C., and Green, W.N. (2003). Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Annals of the New York Academy of Sciences* 998, 66-80.
- Wang, H.Y., Liu, T., and Malbon, C.C. (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cellular signalling* 18, 934-941.
- Wang, J., Jing, Z., Zhang, L., Zhou, G., Braun, J., Yao, Y., and Wang, Z.Z. (2003). Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC. *Nature neuroscience* 6, 1017-1018.
- Wang, J., Ruan, N.J., Qian, L., Lei, W.L., Chen, F., and Luo, Z.G. (2008). Wnt/beta-catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction. *The Journal of biological chemistry* 283, 21668-21675.
- Weatherbee, S.D., Anderson, K.V., and Niswander, L.A. (2006). LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 133, 4993-5000.
- Wild, F., Khan, M.M., Straka, T., and Rudolf, R. (2016). Progress of endocytic CHRN to autophagic degradation is regulated by RAB5-GTPase and T145 phosphorylation of SH3GLB1 at mouse neuromuscular junctions in vivo. *Autophagy* 12, 2300-2310.
- Willadt, S., Nash, M., and Slater, C.R. (2016). Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Scientific reports* 6, 24849.
- Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a007864.
- Witzemann, V., Barg, B., Nishikawa, Y., Sakmann, B., and Numa, S. (1987). Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs. *FEBS Lett* 223, 104-112.
- Wu, H., Xiong, W.C., and Mei, L. (2010). To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137, 1017-1033.
- Xu, R., and Salpeter, M.M. (1997). Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 8194-8200.
- Yan, M., Xing, G.L., Xiong, W.C., and Mei, L. (2018). Agrin and LRP4 antibodies as new biomarkers of myasthenia gravis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1413, 126-135.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* 93, 23-67.
- York, A.L., and Zheng, J.Q. (2017). Super-Resolution Microscopy Reveals a Nanoscale Organization of Acetylcholine Receptors for Trans-Synaptic Alignment at Neuromuscular Synapses. *eNeuro* 4.

Zhang, B., Liang, C., Bates, R., Yin, Y., Xiong, W.C., and Mei, L. (2012). Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Molecular brain* 5, 7.

Zhang, B., Luo, S., Dong, X.P., Zhang, X., Liu, C., Luo, Z., Xiong, W.C., and Mei, L. (2007). Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 3968-3973.

Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W.C., and Mei, L. (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60, 285-297.

Zhao, K., Shen, C., Lu, Y., Huang, Z., Li, L., Rand, C.D., Pan, J., Sun, X.D., Tan, Z., Wang, H., *et al.* (2017). Muscle Yap Is a Regulator of Neuromuscular Junction Formation and Regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37, 3465-3477.

PRODUCTIVIDAD ASOCIADA A ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Las técnicas, los resultados y conceptos generados durante la ejecución de esta tesis permitieron la autoría y co-autoría de las siguientes publicaciones científicas:

2022

“FUNCTIONAL REGENERATION OF THE MURINE NEUROMUSCULAR SYNAPSE RELIES ON LONG-LASTING MORPHOLOGICAL ADAPTATIONS”. Francisca Bermedo-García, **Diego Zelada**, Esperanza Martínez, Lucía Tabares and Juan Pablo Henríquez. BMC Biology, Aceptado.

2021

“LITHIUM CAUSES DIFFERENTIAL EFFECTS ON POSTSYNAPTIC STABILITY IN NORMAL AND DENERVATED NEUROMUSCULAR SYNAPSES”. **Diego Zelada**, Francisco J. Barrantes and Juan Pablo Henríquez. Scientific Reports, 11(1):17285

“MOTOR FUNCTION RECOVERY: DECIPHERING A REGENERATIVE NICHE AT THE NEUROMUSCULAR SYNAPSE”. **Diego Zelada**, Francisca Bermedo-García, Nicolás Collao and Juan Pablo Henríquez. Biological Reviews, 96: 752-766

2020

“PHOSPHORYLATION OF α -DYSTROBREVIN IS ESSENTIAL FOR AKAP ACCUMULATION AND ACETYLCHOLINE RECEPTOR STABILITY”. Po-Ju Chen, **Diego Zelada**, Dina Cheryne Belhasan and Mohammed Akaaboune. Journal of Biological Chemistry 295, 10677-10688.

2019

“THE P75NTR NEUROTROPHIN RECEPTOR IS REQUIRED TO ORGANIZE THE MATURE NEUROMUSCULAR SYNAPSE BY REGULATING SYNAPTIC VESICLE AVAILABILITY”. Viviana Pérez, Francisca Bermedo-García, **Diego Zelada**, Felipe A. Court, Miguel Ángel Pérez, Marco Fuenzalida, Johanna Ábrigo, Claudio Cabello-Verrugio, Guillermo Moya-Alvarado, Juan Carlos Tapia, Vicente Valenzuela, Claudio Hetz, Francisca C. Bronfman & Juan Pablo Henríquez. Acta Neuropathologica Communications 7,147

“EFFICIENT GENE TRANSFER INTO PRIMARY MUSCLE CELLS TO ANALYSE NERVE-INDEPENDENT POSTSYNAPTIC ORGANIZATION IN VITRO” Jessica Mella, Viviana Pérez, **Diego Zelada**, Nicolás Moreno, Ariel Ionescu and Juan Pablo Henríquez. Neuromuscular Disorders 29 533–542.

Además, fue posible participar en congresos nacionales e internacionales, de los cuales destaca el premio a la mejor charla en la “NMJ Research Conference”: el primer congreso enfocado exclusivamente al área del estudio de la unión neuromuscular.

2021

Neuromuscular Junction Research Conference 2021. “LITHIUM CAUSES DIFFERENTIAL EFFECTS ON POSTSYNAPTIC STABILITY IN NORMAL AND DENERVATED NEUROMUSCULAR SYNAPSES”. **Diego Zelada**, Francisco J. Barrantes & Juan Pablo Henríquez. Oral presentation. ****Premio a la major charla****.

Chilean Society for Cell Biology (SBCCh). Colloquium series in cell biology: Young investigators. “LITHIUM CAUSES DIFFERENTIAL EFFECTS ON POSTSYNAPTIC STABILITY IN NORMAL AND DENERVATED NEUROMUSCULAR SYNAPSES”. **Diego Zelada**, Francisco J. Barrantes & Juan Pablo Henríquez. Oral presentation.

2020

Federation of European Neuroscience Societies (FENS) Forum. “TURNOVER AND LOCALIZATION OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBPOPULATIONS AT THE NORMAL AND INJURED NEUROMUSCULAR SYNAPSE IN VIVO”. **Diego Zelada**, Francisca Bermedo-García & Juan Pablo Henríquez.

2019

SNF’s 50th Annual meeting, Chicago, IL, Estados Unidos. “DYNAMICS OF NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBPOPULATIONS AT THE NORMAL AND INJURED NEUROMUSCULAR SYNAPSE IN VIVO”. **Diego Zelada**, Francisca Bermedo-García & Juan Pablo Henríquez.

XXXIII Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Puerto Varas, Chile. “REGENERATION OF THE NEUROMUSCULAR SYNAPSE: GOOD OR BAD REMINISCENCES?”. Francisca Bermedo-García, **Diego Zelada**, Ignacio Leal, Lucía Tabares & Juan Pablo Henríquez. Oral presentation.

2018

XXXII Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Puerto Varas, Chile. “NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR DYNAMICS AT THE NORMAL AND INJURED NEUROMUSCULAR SYNAPSE IN VIVO”. **Diego Zelada**, Francisca Bermedo-García and Juan Pablo Henríquez. Oral session.

XXXII Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Puerto Varas, Chile. “SYSTEMATIC ANALYSIS OF THE MORPHOLOGICAL CHANGES OCCURRING AFTER DEGENERATIVE AND REGENERATIVE DAMAGE OF THE NEUROMUSCULAR JUNCTION”. Francisca Bermedo-García, **Diego Zelada**, and Juan Pablo Henríquez. Poster session.

2017

XXXI Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Puerto Varas, Chile. “THE WNT RECEPTOR FRIZZLED-9 MODULATES THE POST-SYNAPTIC MAINTENANCE OF THE VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION”. **Diego Zelada**, Francisca Bermedo-García and Juan Pablo Henríquez. Poster Session.

XXXI Annual Meeting of the Chilean Society for Cell Biology, Puerto Varas, Chile. “MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE NEUROMUSCULAR JUNCTION OF THE MOUSE LEVATOR AURIS LONGUS MUSCLE AFTER NERVE INJURY”. Francisca Bermedo-García, **Diego Zelada** and Juan Pablo Henríquez. Poster Session.

La ejecución de esta tesis además originó colaboración científica internacional, la cual incluye pasantías:

2019-2020: Laboratorio del Dr. Mohammed Akaaboune. Universidad de Michigan, Ann Arbor. Estados Unidos.

2017: Laboratorio de Neurobiología Molecular, dirigido por el Dr. Francisco J. Barrantes. Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED). Pontificia Universidad Católica de Argentina, Buenos Aires. Argentina.

Y la colaboración internacional con los laboratorios:

- 1) Dra. Marina Bouché, Universidad de Roma La Sapienza, Italia.
- 2) Dra. Laura Soucek, Universidad Autónoma de Barcelona, España.