

Visualización y reconstrucción de unidades motoras adultas

FRANCISCA C. TORRES¹, CRISTINA GUATIMOSIN², MÓNICA A. CARRASCO¹,
JUAN C. TAPIA¹

Visualization and reconstruction of adult motor units

Abstract

The examination of the full repertoire of synaptic connections that a single motor axon makes (motor unit, MU) is essential for understanding its physiological function, and to distinguish how these MUs are altered by various neuromuscular diseases. We present a gene expression strategy that allows the visualization of motor units with high selectivity and reproducibility. Using this tool, we reconstructed several motor units in the interscutularis muscle. The reconstructions demonstrated that: i) MUs vary significantly in size, while some innervated three target cells, others innervated more than 30 cells; ii) the presynaptic terminals of each adult MU innervated a single target cell; iii) The synapses of adult MUs varied in architecture and size. In general, the synaptic size was a weak predictor of the target cell size. In summary, our experimental approach allows the in-situ labeling and characterization of adult motor axons.

Keywords: Motor unit, gene expression.

Introducción

Las neuronas motoras controlan el movimiento de todas las extremidades del cuerpo. Están ubicadas en la asta ventral de la médula espinal, desde donde proyectan sus axones hacia la musculatura esquelética. Aquí, se ramifican profusamente formando conexiones sinápticas con varias células diana, i.e., las fibras musculares. El repertorio de fibras musculares que una neurona motora inerva se denomina unidad motora (MU). Y cada músculo está compuesto por numerosas unidades motoras (MUs), las que gracias a su ordenada activación controlan la tensión generada por el músculo (Henneman

1 Escuela de Medicina, Universidad de Talca. Avda. Lircay S/N Talca, Chile.

2 Departamento de Fisiología, Universidad Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil.

Autores de correspondencia:
dirigir a juantapia@utalca.cl y/o
mocarrasco@utalca.cl

1985), permitiendo así el despliegue de prácticamente todos los movimientos y conductas de los animales.

Las terminales axonales de cada MU son estructuras altamente especializadas. Mientras la terminal axonal presináptica está dedicada a la liberación de acetilcolina (ACh), principal neurotransmisor de la sinapsis neuromuscular (también denominada unión neuromuscular, NMJ); la membrana celular postsináptica de la fibra muscular contiene los receptores para el neurotransmisor, i.e. receptores de acetilcolina (AChRs). Los AChRs están concentrados en los pliegues membrano-

sos de la célula muscular, en lo que se conoce como placa motora. En conjunto, la activación de las sinapsis neuromusculares distribuidas por las MUs permiten la generación eficaz de tensión en cada una de sus fibras musculares, favoreciendo en última instancia el desarrollo de movimiento (Wood and R. Slater 2001, Henneman 1985, Sanes and Lichtman 1999). La afección de las MUs, sus axones y sinapsis neuromusculares resulta en severos desórdenes neuromusculares, que en muchos casos culminan en parálisis y/o muerte (Al-Chalabi and Hardiman 2013, Gilhus 2012, Murray et al. 2008). De esta forma, comprender la estructura y función de las MUs y sus afecciones no solo es de relevancia fisiológica, sino que también de enorme importancia clínica.

Los vectores virales han sido utilizados para marcar diversos tipos de células en el sistema nervioso central (SNC). Recientemente, están siendo utilizados para dirigir la transducción de determinados genes de forma célula específica en una diversidad de trastornos neurológicos (Li and Samulski 2020). De los vectores virales, los virus adenoasociados (AAV) han sido los de mayor atracción científico - clínica por su baja respuesta inmune, no se integran al genoma de la célula huésped, y porque presentan tropismo por algunos tipos de neuronas. Actualmente, existe una enorme diversidad de serotipos de AAVs, cada cual con tropismo particular por algún tipo celular (Wu et al., 2006, Hammond et al. 2017). Varios AAVs han sido utilizados para transducir genes en células de la médula espinal (Hammond et al. 2017, Hoshino et al. 2019, Wu et al., 2006), y específicamente en neuronas motoras. Desafortunadamente, en ninguno de estos estudios se evaluó si los serotipos usados eran eficaces en expresar los genes transducidos en los axones de las neuronas motoras, los que se proyectan hacia las extremidades musculares, alcanzando en muchos casos distancias extremadamente largas (metros). Igualmente, se desconoce si vía la transducción de genes reporteros es po-

sible visualizar la arquitectura de las MUs en los músculos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer una metodología de expresión génica basada en AAVs que permita expresar la proteína fluorescente verde (GFP) en un número pequeño de axones motores y así lograr estudiar sus propiedades morfológicas. Desarrollamos una estrategia de inyección viral, la que, en conjunto con reconstrucciones tridimensionales de alta resolución óptica, nos permitió “marcar” con GFP, y examinar el patrón de ramificación de axones motores individuales, e identificar todas sus células blanco (i.e., MU). Encontramos tamaños de MUs diversos en los músculos adultos. Algunos axones motores inervaron 3 fibras musculares (MU pequeña); mientras que, otros contactaron más de 30 fibras (MU grande), siendo los tamaños de inervación intermedia (~7-21 sinapsis) los más frecuentes de encontrar. Interesantemente, la cohorte de sinapsis de cada una de las MU estudiadas fueron diversas en estructura y tamaño, contrario a la homogeneidad de las MUs propuesta por estudios electrofisiológicos.

Métodos

Modelo animal. La cepa CD1 fue el modelo animal utilizado para todos los experimentos. Estos animales fueron criados y mantenidos en el bioterio de la Universidad de Talca, siguiendo los criterios indicados por el comité de bioética para el manejo y cuidado de animales. Una parte significativa del trabajo fue también aprobada por el comité de bioética de la Universidad de Columbia (New York, USA). En una primera instancia, los ratones CD1 fueron comprados al bioterio central de la Pontificia Univ. Católica de Chile (Santiago, Chile), trasladados, mantenidos y criados en el bioterio de la Universidad de Talca. Machos y hembras fueron apareados para obtener hembras preñadas cronometradas. Animales de un día de edad postnatal (P1) fueron utilizados para todos los ensayos.

Vectores AAV. Todos los vectores virales utilizados en el presente trabajo se encuentran comercialmente disponibles (Addgene, USA; Univ. of Iowa, USA). Aquí, examinamos la transducción de GFP controlada por los promotores CAG y CMV. Los vectores usados fueron: AAV1-CAG-eGFP (Addgene 37825-AAV1), AAV2-CAG-eGFP (Addgene 37825-AAV2), AAV4-CMV-eGFP (VVC-U of Iowa-2297); AAV5-CAG-eGFP (Addgene 37825-AAV5), AAV6-CMV-eGFP (VVC-U of Iowa-547); AAV6.2-CMV-eGFP (VVC-U of Iowa-4444); AAV8-CAG-eGFP (Addgene 37825-AAV8), AAV9-CAG-eGFP (Addgene 37825-AAV9); AAVrh10-CMV-eGFP (Addgene 105530-rh10), AAV-scAAV9-CMV-eGFP (VVC-U of Iowa-416). La concentración (i.e., título) de los diferentes virus fue entre 7×10^{12} y 1×10^{13} partículas por ml.

Inyección viral. Una vez nacidos, los animales de un día de edad postnatal (P1) fueron rápidamente anestesiados utilizando exposición a frío (4°C) por 2 min. Luego, los animales fueron ubicados bajo una lupa óptica, equipada con un objetivo 4x y magnificación regulable (31x). El movimiento de los animales fue restringido gracias al uso de cinta adhesiva. Después de esterilizar rápidamente la piel con papel kimwipe inmerso con etanol (70%), las partículas virales de los respectivos stocks fueron aspiradas a través de microelectrodos de vidrio conectados a un picospritzer (WPI Inc., Pneumatic PicoPump, PV820), el que a su vez estaba conectado a un tanque de N_2 . El microelectrodo, que contenía la solución viral, fue manipulado con la ayuda de un micro manipulador de 3 ejes (Narishige, Japan), donde la punta ($<1\mu\text{m}$ de diámetro) del microelectrodo fue insertada directamente en la región cervical de la médula espinal. Después de viajar $\sim 250\mu\text{m}$ al interior de la médula espinal, se inyectaron por presión positiva 10nl de los diferentes vectores virales. Una vez finalizado el protocolo de inyección, los animales fueron mantenidos por una hora en la caja de recuperación a una temperatura de 37°C (luz infrarroja). Una

vez recuperados de la anestesia, los animales fueron regresados con su madre. Luego, los animales fueron mantenidos por alrededor de 15, 30 y 60 días; tiempos a los cuales se evaluó la expresión de la proteína fluorescente GFP por microscopia de epi-fluorescencia (Olympus BX51). Cada uno de los serotipos virales fue ensayado por triplicado. Es importante también indicar que ninguno de los animales inyectados presentó evidencia de infección bacteriana u efectos conductuales deletéreos, indicativo de que la inyección viral fue inerte y sin consecuencias aparentes para los animales.

Muestras. Una vez cumplida la edad de estudio, los animales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico. Después de perfundir transcárdialmente con p-formaldehído (PFA), preparado al 4% en una solución salina de fosfato de sodio 0.1 M (PBS) tamponada a pH 7.4, los músculos diafragma, esternomastoideo, cleidomastoideo, omohioideo, e intercostularis fueron disecados, teniendo cuidado de dejar sus nervios motores intactos. Luego, las muestras fueron post-fijadas con PFA por 2 horas. Después de extraer el máximo tejido conectivo posible, las muestras fueron incubadas por 60 min con α -bungarotoxina conjugada con el fluorocromo Alexa594 (a-btx594; 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Invitrogen, USA) para marcar los receptores de acetilcolina (AChRs). En algunos casos, también incubamos las muestras con faloidina conjugada con Alexa 405 (fal405), que marcó de manera específica los filamentos de actina presentes en las fibras musculares. Los músculos que expresaron niveles elevados de la proteína fluorescente GFP en axones motores fueron montados en portaobjetos inmersos en Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para ser visualizados por microscopía confocal.

Inmunofluorescencia. Debido a que en su gran mayoría los músculos expresaron bajos niveles de GFP, fue necesario someterlos a amplificación por inmunofluorescencia. Para esto, las muestras fueron primeramente bloqueadas

con una solución que contenía albumina sérica (BSA; Sigma Aldrich, USA) al 4% en presencia del detergente iónico Triton-X-100 (Sigma Aldrich, USA) al 2% en PBS pH 7.4. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en esta solución; y al día siguiente, después de lavar en múltiples ocasiones (3X) en PBS 0.1M (pH 7.4), se procedió a incubar con el anticuerpo primario contra la proteína GFP de conejo (Invitrogen, USA) preparado en una dilución de 1:1000 en la solución de bloqueo. Luego de incubar por 48 horas a 4°C, y lavar por 5 horas en PBS, los músculos fueron incubados con un anticuerpo secundario contra conejo producido en burro y conjugado al fluorocromo Alexa488 (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:1500 preparado en la solución de bloqueo. Después de varios lavados en PBS, los músculos fueron mantenidos en Vectashield (Burlingame, CA) y montados en portaobjetos para luego ser examinados por microscopía de epi-fluorescencia (Olympus BX51). Solo muestras apropiadamente marcadas, sin daño aparente en el nervio/músculo, fueron utilizadas para la adquisición de imágenes vía microscopía confocal.

Microscopía confocal. Se obtuvieron imágenes de las unidades motoras individuales como también de sus terminales sinápticas utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 equipado con múltiples láseres. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de inmersión de aceite 20× (1,00 NA) para la reconstrucción de las unidades motoras completas, y un objetivo de aceite 60× (1,45 NA) para la adquisición de las terminales motoras individuales. La proteína fluorescente (GFP) fue excitada usando la línea de 488 nm de un láser de argón, y se detectó su fluorescencia usando un filtro de emisión de 522 nm. Una proyección de máxima intensidad fue obtenida para cada uno de los stacks en Z usando Confocal Assistant Software (Olympus), y los montajes de estas proyecciones (10-20) fueron ensamblados y armados utilizando Adobe Photoshop CC (2019). Las

sinapsis neuromusculares de cada unidad motora fueron reconstruidas a alta resolución (Aumento digital de dos veces, objetivo 60 x 1,45 NA). Los receptores de acetilcolina (AChRs) presentes en las sinapsis neuromusculares fueron marcados con alfa-bungarotoxina conjugada con el fluorocromo Alexa 594 (Invitrogen). Los AChRs fueron excitados usando la línea de 568 nm de un láser de criptón, y se detectó su fluorescencia usando un filtro de emisión de 620 nm. El área de la terminal axonal y su colocalización con los receptores de acetilcolina fueron medidos utilizando ImageJ (NIH). Se utilizó la toxina faloidina conjugada con el fluorocromo Alexa 405 para visualizar las fibras musculares, la que fue excitada usando la línea 405 nm de un láser de diodo azul, y detectada usando un filtro de emisión de 440 nm.

Análisis morfométricos: Áreas sinápticas, diámetros de axones y fibras musculares.

Para el análisis de los stacks ópticos de las diversas MUs, se utilizó el Software ImageJ (versión Fiji 2.0.0-rc-67/1.52i). Brevemente, para cada stack de imágenes, se separaron y guardaron los canales de fluorescencia de forma individual (i.e., archivos formato TIFF). Los nombres de los archivos incluyeron los respectivos códigos de las muestras, canales fluorescentes, y datos de calibración de cada imagen. Para la medición del área sináptica, se realizaron análisis de colocalización entre los 2 canales de interés: receptores de acetilcolina (alfa-bungarotoxina conjugada con Alexa594) y axones (proteína GFP amplificada con anticuerpo policlonal anti-GFP y anticuerpo secundario conjugado con Alexa488), empleando el comando: Image>Color>Merge Channels. Se obtuvo una proyección de máxima intensidad del stack (Imagen>Stacks>Zproject), y luego con la herramienta polígono, se dibujó el contorno alrededor de la sinapsis neuromuscular, tomando cuidado de excluir cualquier tinción espuria que no se origine de la sinapsis: Edit>Clear Outside. En la región seleccionada se aplicó un umbral de color (Threshold) Ima-

ge>Adjust>Color Threshold; ajustando el nivel del umbral hasta que cada píxel contenía la porción colocalizada en rojo y verde (amarillo). Finalmente, se midió el área total colocalizada (área amarilla seleccionada dentro del polígono) aplicando: Analyze>Measure. Los datos de las áreas fueron extraídos a una hoja de cálculo y se obtuvo correlaciones mediante gráficos de dispersión en Microsoft Excel (versión 16.16.27). Se analizaron solo sinapsis neuromusculares que tuvieran su estructura en-face (>70% de su estructura); evitando aquellas que tuvieran una disposición ortogonal al plano de las fibras musculares. Los diámetros para los axones pre-terminales y sus respectivas fibras musculares fueron también analizados usando la proyección de máxima intensidad y el comando Analyze>Measure en ImageJ.

Análisis Estadísticos. Todos los resultados fueron presentados como el promedio \pm desviación estándar. Debido a los números (N) relativamente pequeños por cada uno de los grupos utilizados, las comparaciones entre dos grupos experimentales (por ejemplo, AAV2.1 y AAV2.6) se realizaron mediante una prueba t-Student para datos no apareados. Los análisis estadísticos fueron realizados usando Microsoft Excel (versión 16.16.27).

Resultados

Expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en axones de neuronas motoras.

Una gran diversidad de serotipos virales ha sido desarrollada con el propósito de infectar células en distintos tejidos (Li and Samulski 2020). Muchas de estos viriones permiten la expresión de variantes de la proteína verde fluorescente (GFP), ya sea bajo el control de elementos promotores específicos al tejido de interés o de control global (Korecka et al. 2011). Aquí, examinamos la posibilidad de usar partículas virales para transducir el gen que codifica para GFP en neuronas motoras espinales con el propósito de “marcar”, y así visualizar y caracteri-

zar sus axones y sinapsis a nivel intramuscular. Para soslayar problemas de intensidad inherentes a los promotores presentes en los vectores virales, todas las muestras analizadas fueron amplificadas utilizando un anticuerpo policlonal contra GFP (Métodos). Igualmente, debido a que nuestro interés era identificar unidades motoras (MUs) individuales, mantuvimos los niveles de inyección viral en concordancia con lo reportado en otros trabajos (Hoshino et al. 2019, Li and Samulski 2020, Wu et al., 2006, Hammond et al. 2017, Korecka et al. 2011).

De la batería de serotipos virales comercialmente disponibles (Addgene; University of Iowa), caracterizamos adenovirus (AAVs) que tenían la habilidad para transducir la expresión de GFP primeramente en neuronas motoras a nivel de la médula espinal; y luego, en las proyecciones axonales periféricas (i.e., músculos). Encontramos que solamente tres de los diez serotipos virales disponibles (Tabla 1) indujeron la expresión de GFP en un grupo discreto de neuronas motoras en la asta ventral de la médula espinal (Figura 1-A, recuadro). Estas células tenían la morfología típica de las neuronas motoras: un soma grande, con diámetros que variaron entre 30-55 μ m de diámetro al día postnatal 30 (P30), con varias (~5-7) prolongaciones dendríticas gruesas (3-7 μ m) que se extendían desde el soma y, que luego, se subdividían en reiteradas oportunidades al interior de la sustancia gris (Figura 1-B), donde en algunos casos, alcanzaban incluso hasta regiones adyacentes al canal central. En muchas oportunidades, fue también posible observar una proyección más fina (~1-3 μ m de ancho) que se extendió desde el soma, presumiblemente el axón motor (Figura 1-B, Ax., flecha), hacia las raíces ventrales de la médula espinal.

Con estos vectores, encontramos que las proyecciones de los axones motores intramusculares expresaban GFP (Figura 1-C). En aproximadamente, el 4% (8/200), 9% (11/125) y 14% (27/200) de todos los músculos revisados (diafragma, esternomastoideo, cleidomastoideo,

omohioideo e interscutularis) había expresión del gen reportero al día postnatal 30 (P30) para AAV9, AAV2.8 y AAVRh10 respectivamente (Tabla 1). Los tres serotipos virales mostraron variabilidad en términos del número de axones motores donde el gen reportero (GFP) era transducido; en algunas muestras se observaron desde uno hasta más de 6 axones GFP positivos para el vector AAV9-eGFP; mientras que, de dos a un axón “marcado” era posible visualizar cuando los vectores usados eran AAV2.8 y AAVRh10, todos cuantificados en los nervios antes del ingresar a los respectivos músculos. De todos, el vector viral que presentó mayor reproducibilidad en términos de expresión del reportero, bajo número de axones GFP positivos, y selectividad / tropismo por neuronas motoras, fue el serotipo AAVRh10 (Tabla 1). Con este vector, en prácticamente todos los músculos que presentaban expresión, encontramos consistentemente uno, dos o tres axones motores GFP positivos como máximo. Además, aunque con baja frecuencia (2/50), este vector podía también inducir la transducción de GFP en axones motores a las dos semanas post-inyección (~P12), tiempo en que gran parte de los axones se encuentran terminando su proceso de remodelación sináptica (Redfern 1970). En la Figura 1-C, se muestra un ejemplo de axones motores GFP positivos que inervaron una subregión del músculo esternomastoideo. Tanto las ramificaciones axonales como las sinapsis neuromusculares podían ser observadas con gran detalle, como se muestra en la Figura 1-D. Muchas de las sinapsis tenían la forma típica de "terminaciones en placa o tipo pretzel", con numerosas extensiones del axón pre-terminal, donde prominencias y constricciones del axón eran posibles de observar (Figura 1-D, Axón). Otras sinapsis, en cambio, eran extremadamente simples en su arquitectura, solo poseían una extensión continua sin ramificaciones intra terminales. Cualquiera fuese la estructura del axón pre-terminal (compleja vs. simple), este siempre estaba asociado con los receptores

postsinápticos (Figura 1-D, AChRs), con una aposición casi perfecta (≥ 98 ; Figura 1-D, Merge). En suma, estos resultados demuestran que un subgrupo de vectores virales es apropiado para identificar axones motores intramusculares.

Reconstrucción y segmentación de unidades motoras completas marcadas con GFP.

Para examinar en mayor detalle los axones motores y sus sinapsis neuromusculares (i.e., expresaron GFP vía transducción por AAVRh10), elegimos continuar nuestra caracterización fundamentalmente en el músculo interscutularis. Esto debido a que el músculo, ubicado en la superficie del cráneo, presenta características morfológicas ideales para realizar reconstrucciones de axones motores: es pequeño (aproximadamente 1.8 y 8.5 mm de ancho y largo respectivamente), delgado (compuesto por ~200 fibras musculares), y está inervado por no más de 25 neuronas motoras (Tapia et al., en preparación). De todas las muestras de músculos interscutularis examinadas, alrededor del 18% (7/40) de ellas mostraron expresión de GFP al día postnatal 30 (P30); en muchas de las cuales, solo un axón motor podía ser visualizado (~60%). Interesantemente, la expresión de GFP incrementó paulatinamente con la edad del animal; en músculos aislados, con una edad igual o superior a 60 días (P60), más del 60% de las muestras mostraron expresión de GFP (22/35), donde con frecuencia era posible observar dos axones motores GFP positivos por músculo (Figura 2-A, flecha 1, y B1). El diámetro de estos axones, medidos 0.2 mm antes de la bifurcación inicial, varió entre 0.8 – 5.2 μm (Tabla 2). Y una vez en el interior del músculo, los axones se ramificaron profusamente. Después de la bifurcación inicial (Figura 2-A, flecha 2, y B2), estos generaron subdivisiones intramusculares adicionales que con mayor frecuencia correspondieron a bifurcaciones (~94%; 60/64); aunque también, produjeron subdivisiones más complejas de 3 (3%; 2/64), 4 (1.5%; 1/64), y hasta 5 ramas (1.5%; 1/64). En la Figura 2-A,

flecha 3, y B3 se muestra un ejemplo de un axón motor que generó una subdivisión de 4 ramas terminales, con cada una de ellas dando origen a terminales sinápticas adyacentes (Figura 2-A, flecha 3). Las sinapsis neuromusculares de estos axones pudieron ser observadas con gran resolución morfológica, como se muestra en la Figura 2-A, flecha 4, y B4. Muchas de las sinapsis tenían la forma típica de "terminaciones en placa o pretzel", con numerosas extensiones terminales, y con prominencias y constricciones del axón (Figura 2-B4, Axón). Otras, en cambio, eran extremadamente simples en su arquitectura, solo extendían el axón pre-terminal, pero con ausencia de extensiones/ramificaciones intra-terminales (e.g., Figura 3-B6; Figura 4-B12). Medimos el diámetro del axonal pre-terminal $5\mu\text{m}$ antes de formar la sinapsis, el que osciló entre 1.7 y $7\mu\text{m}$ (Promedio $4.4 \pm 1.3\mu\text{m}$). Cuantificamos también el tamaño de las terminales presinápticas (Área; Figura 2-C), las que oscilaron entre 247 y $822\mu\text{m}^2$ (Promedio $440 \pm 120\mu\text{m}^2$). Por otro lado, en el lado postsináptico, los AChRs, marcados en rojo con α -bungarotoxina conjugada con Alexa594 (a-btx594; Figura 2-B4, AChRs, y C), también presentaron estructuras relativamente complejas, con múltiples pliegues, las que siempre estaban asociadas entre sí, y, por tanto, eran continuos. En algunos casos, sin embargo, los AChRs parecían estar parcialmente disgregados, formaban verdaderos islotes (Figura 3-B4) o fragmentos (Figura 4-B6) de AChRs, separados de la placa principal. Al cuantificar el área ocupada por los AChRs (Figura 2-C), observamos que variaron entre 305 y $928\mu\text{m}^2$ (Promedio $504 \pm 133\mu\text{m}^2$). Por último, utilizando estos parámetros determinamos la cantidad de aposición que existía entre ambos componentes, la terminal presináptica y los AChRs. Observamos que las terminales axonales presinápticas colocalizaron de forma casi completa ($\geq 98\%$) con prácticamente todos los grupos de AChRs postsinápticos (Figura 2-C; y Figuras 3-B y 4-B). No todas las sinapsis pre-

sentaron aposición completa entre la terminal presináptica y los AChRs. En la Figura 4-B6, por ejemplo, un subgrupo de AChRs (rojo) no colocalizó completamente con la terminal axonal (amarillo), y solo el 96% de los AChRs fueron inervados (Merge). La frecuencia de este tipo de eventos sin embargo fue baja ($1/28$); así, en general, encontramos que cerca del 98% de las sinapsis neuromusculares adultas a P60 estaban completamente ocupadas por el axón motor. Esto fue corroborado por ensayos de triple inmuno marcaje con anticuerpos contra neurofilamento y SV2 (marcador axonal y de vesículas sinápticas respectivamente). Además, en todas las sinapsis ocupadas por el axón GFP positivo se encontró colocalización con los AChRs, indicativo de que estas se encontraban inervadas completamente por un solo axón (datos no mostrados).

Quisimos luego determinar si en las muestras existía alguna relación entre los tamaños de los axones pre-terminales (i.e., diámetro), las sinapsis neuromusculares (i.e., área sináptica) y las fibras musculares asociadas (diámetro); estas últimas teñidas con faloidina, toxina que posee una alta afinidad por los filamentos de actina y conjugada con el fluorocromo Alexa405. En general, observamos una débil relación entre el diámetro del axón y el tamaño de la sinapsis (Figura 2-D, gráfico superior). Así, sinapsis grandes se asociaron solo débilmente con axones gruesos, y viceversa, sinapsis pequeñas sin asociación directa axones delgados. Igualmente, no encontramos que el tamaño de las sinapsis correlacionara de forma directa con el diámetro de las fibras musculares inervadas (Figura 2-D, panel inferior).

Una vez establecida la reproducibilidad de la transducción viral, decidimos examinar si era posible reconstruir y segmentar completamente todas las ramas de los axones motores marcados con GFP mediante la adquisición y el montaje de stacks de imágenes confocales a la mayor resolución posible (Métodos). Usamos, además, ImageJ plugins (NIH), Confocal

Assistant, y Photoshop CC (métodos) para segmentar cada una de las MUs adquiridas. Usando esta estrategia, reconstruimos por completo 7 unidades motoras (MUs), todas provenientes de animales adultos de dos meses de edad (P60, Tabla 2). En las Figuras 3 y 4 mostramos dos MUs completamente reconstruidas y segmentadas a P60 en el músculo interscutularis. Los axones de ambas MUs ingresaron al músculo centralmente, y luego se ramificaron hacia la zona medial donde se encontraba la banda de AChRs. Las dos MUs proyectaron sus ramificaciones hacia territorios no superpuestos del músculo (Figuras 3-4), distribuidas cada una en aproximadamente un cuarto de la banda central de AChRs; donde inervaron solo una pequeña proporción de fibras musculares, correspondientes al 7.5% (Figura 3: 15/200) y 6.5% (Figura 4: 13/200) de todas las fibras. Esta reducida razón de inervación entre el axón y el músculo indica que otras MUs, de las cuales probablemente ocurren entre 16 y 24, proyectan hacia las regiones adyacentes, donde se observaron fibras sin inervar (i.e., AChRs libres). En general, las MUs reconstruidas exhibieron largos intramusculares que variaron entre los 1.983 y 13.720 μm (Promedio 5864.286 \pm 4244 μm), mostrando una fuerte correlación con los tamaños sinápticos de las MUs. Así, observamos que algunas MUs eran pequeñas, tenían de una a tres sinapsis (2/7), en concordancia con un menor largo axonal (Tabla 2); mientras otras, las más grandes tenían hasta 36 sinapsis (1/7; Tabla 2), muy en acorde con su mayor largo intramuscular. Las MUs que expresaron GFP con mayor frecuencia fueron aquellas que tenían tamaños intermedios, entre 5 y 21 sinapsis (4/7), y concordantemente, también tenían largos intermedios (Tabla 2). En general, el rango de tamaños de MUs encontrado concuerda plenamente con resultados obtenidos a través de estudios electrofisiológicos (Henneman et al., 1965; Henneman, 1985), donde la distribución de las tensiones producidas por las MUs era unimodal y sesgada hacia

MUs con tamaños intermedios.

Luego, nos preguntamos si existían diferencias en la estructura de las sinapsis que un axón motor distribuye (i.e., MU). Encontramos que existían diferencias arquitectónicas significativas entre las sinapsis que conforman a una misma MU (Figuras 3-B y 4-B). Por ejemplo, algunas sinapsis presentaban una estructura pre-terminal compleja, con extensiones, proyecciones y constricciones; mientras otras sinapsis poseían axones pre-terminales con una morfología simple, sin extensiones (Figura 4-B12). De igual manera, encontramos que el diámetro de los axones pre-terminales fue bastante variable para cada MU, oscilaron entre 1.7 y 6.3 μm (Promedio 4.8 \pm 0.9 μm ; N=15) para la MU01, y de 2.1 hasta 7.8 μm (Promedio 4.0 \pm 1.8 μm ; N=13) para la MU02. Esta variabilidad fue también observada a nivel del tamaño de las sinapsis. Aquí el área cubierta por la terminal presináptica varió entre 127 y 270 μm^2 (Promedio 228 \pm 45 μm^2 ; N=13) para la MU01 y entre 111 y 379 μm^2 (223 \pm 91 μm^2 ; N=9) para la MU02. Por su parte, las terminales nerviosas inervaron de forma casi total (~98% de colocalización) cada uno de los grupos de AChRs con las que se contactaron (Figuras 3-B y 4-B). Interesantemente, y al igual que lo encontrado anteriormente, observamos una débil correlación entre el tamaño de la sinapsis neuromuscular, el diámetro del axón pre-terminal y el tamaño de las fibras musculares contactadas. En suma, estos resultados indican que existe una enorme variabilidad en la conectividad de cada MU. Y, por tanto, las MUs parecen no ser homogéneas, contrario a lo reportado previamente por (Larsson et al. 1991, Hamm et al. 1988).

Discusión

La expresión de genes en todos los compartimientos (soma, dendritas, axón y terminales sinápticas) de las neuronas ha resultado ser una tarea extremadamente compleja. Aquí, presentamos un desarrollo técnico, donde hemos lo-

grado expresar el gen que codifica para GFP y marcar neuronas motoras espinales y sus proyecciones axonales en músculos adultos (\geq dos meses de edad). Logramos esto gracias a la utilización de serotipos virales específicos (AAVRh10) que fueron capaces de transducir la expresión de la proteína GFP en uno o dos neuronas motoras. Esto nos permitió reconstruir, segmentar y analizar el patrón de ramificación de axones motores individuales; así como también, identificar la cohorte completa de terminales sinápticas de cada axón, y las fibras musculares asociadas; estructura anatómica conocida como unidad motora (MU).

Usando esta tecnología, podemos indicar que: Primero, las MUs reconstruidas proyectaron sus terminales en subregiones espacialmente discretas del músculo interscutularis (Figura 2). La causa de tal regionalización es desconocida, aunque gradientes de expresión para factores reguladores de la expansión axonal durante el desarrollo embrionario han sido sugeridos como responsables del fenómeno (Sun et al., 2011, Chédotal 2019). Segundo, los axones motores tienen una rama axonal principal de gran diámetro, desde donde numerosas ramificaciones secundarias son generadas. Tercero, el rango de tamaños de las MUs reconstruidas fue consistente con los tamaños observados utilizando registros electrofisiológicos para medir las tensiones de contracción muscular (Henneman et al., 1965). Estos investigadores demostraron que la mayoría de las unidades motoras generaban tensiones de contracción pequeñas e intermedias, y solo unas pocas generan tensiones de contracción alta. Nuestras reconstrucciones están en línea con estos resultados, donde observamos una mayor frecuencia de MUs intermedia y pequeñas. Cuarto, encontramos

relaciones lineales débiles entre el diámetro axonal, el tamaño sináptico y el tamaño de las fibras musculares asociadas. Es posible que dicha relación de tamaños sea más evidente entre MU grandes y pequeñas, y no entre MU intermedias; ya que, estas podrían ser mixtas en términos de innervación (i.e., controlar células diana grandes y pequeñas). Cualquiera sea la situación, para consolidar estas relaciones morfométricas es fundamental analizar un mayor número de MUs. Quinto, la estructura de ramificación axonal de cada neurona motora fue única. Sexto, la estructura de las sinapsis de cada MU fue altamente variable tanto en tamaño como en morfología. La variabilidad de las MUs, tanto en sus ramificaciones como de sus sinapsis, es posiblemente una resultante de la extensiva remodelación axonal que ocurre durante el desarrollo postnatal en mamíferos (Redfern 1970, Tapia and Lichtman 2012). Esta remodelación axonal de los mamíferos es contraria a lo que ocurre en invertebrados e insectos, donde axones motores y sus sinapsis se comportan, arquitectónica y funcionalmente, de forma idéntica (Chen et al. 2006, Coggeshall and Fawcett, 1964, Wilensky et al. 2003). En conclusión, los axones que transducen GFP de forma viral brindan la posibilidad de estudiar procesos biológicos relacionadas con la fisiología de las unidades motoras, incluyendo procesos de plasticidad y remodelación axonal. Igualmente, este desarrollo técnico permite el estudio de la población sináptica asociada a un axón durante procesos neurodegenerativos como, por ejemplo, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA); donde se ha hipotetizado que un subgrupo de sinapsis neuromusculares es afectado diferencialmente por la enfermedad.

Agradecimientos

Agradecemos a los laboratorios de Tom Maniatis y Tom Jessell por su generosidad en el uso de animales, y sus facilidades de microscopia e inyección viral. Igualmente agradecemos al Dr. Jeff W. Lichtman (Harvard University) por su apoyo crítico. Este trabajo fue financiado por proyectos Fondecyts 1161014 (MAC), 1160888, 1200951 y ALS association (JCT).

Referencias

1. Al-Chalabi, Ammar, and Orla Hardiman. 2013. "The Epidemiology of ALS: A Conspiracy of Genes, Environment and Time." *Nature Reviews Neurology* 9 (11): 617–28. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>.
2. Chédotal, Alain. 2019. "Roles of Axon Guidance Molecules in Neuronal Wiring in the Developing Spinal Cord." *Nature Reviews Neuroscience* 20 (7): 380–96. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0168-7>.
3. Chen, Brian E., Masahiro Kondo, Amélie Garnier, Fiona L. Watson, Roland Püettmann-Holgado, David R. Lamar, and Dietmar Schmucker. 2006. "The Molecular Diversity of Dscam Is Functionally Required for Neuronal Wiring Specificity in *Drosophila*." *Cell* 125 (3): 607–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.034>.
4. Coggeshall, R. E., and D. W. Fawcett. 1964. "The Fine Structure of the Central Nervous System of the Leech, *Hirudo Medicinalis*." *Journal of Neurophysiology* 27: 229–89. <https://doi.org/10.1152/jn.1964.27.2.229>.
5. Gilhus, Nils E. 2012. "Myasthenia and the Neuromuscular Junction," 523–29. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283572588>.
6. Hamm, Thomas M., Patti M. Nemeth, Lata Solanki, Debra A. Gordon, Robert M. Reinking, and Douglas G. Stuart. 1988. "Association between Biochemical and Physiological Properties in Single Motor Units." *Muscle & Nerve* 11 (3): 245–54. <https://doi.org/10.1002/mus.880110309>.
7. Hammond, Sean L., Ashley N. Leek, Evan H. Richman, and Ronald B. Tjalkens. 2017. "Cellular Selectivity of AAV Serotypes for Gene Delivery in Neurons and Astrocytes by Neonatal Intracerebroventricular Injection." *PLoS ONE* 12 (12): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188830>.
8. Henneman, E. 1985. "The Size-Principle: A Deterministic Output Emerges from a Set of Probabilistic Connections." *The Journal of Experimental Biology* 115 (March): 105–12.
9. Henneman, E, G Somjen, and D O Carpenter. 1965. "Functional Significance of Cell Size in Spinal Motoneurons." *J Neurophysiol* 28 (October): 560–80.
10. Hoshino, Yutaka, Kenji Nishide, Narihito Nagoshi, Shinsuke Shibata, Nobuko Moritoki, Kota Kojima, Osahiko Tsuji, et al. 2019. "The Adeno-Associated Virus Rh10 Vector Is an Effective Gene Transfer System for Chronic Spinal Cord Injury." *Scientific Reports* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46069-z>.
11. Korecka, Joanna, Marijn Schouten, Ruben Eggers, Ayse Ulusoy, Koen Bossers, and Joost Verhaage. 2011. "Comparison of AAV Serotypes for Gene Delivery to Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra." *Viral Gene Therapy* 2. <https://doi.org/10.5772/18939>.
12. Larsson, L., L. Edstrom, B. Lindegren, L. Gorza, and S. Schiaffino. 1991. "MHC Composition and Enzyme-Histochemical and Physiological Properties of a Novel Fast-Twitch Motor Unit Type." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 261 (1 30-1): 3–6. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.261.1.c93>.
13. Li, Chengwen, and R. Jude Samulski. 2020. "Engineering Adeno-Associated Virus Vectors for Gene Therapy." *Nature Reviews Genetics* 21 (4): 255–72. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>.
14. Murray, Lyndsay M, Laura H Comley, Derek Thomson, Nick Parkinson, Kevin Talbot, and Thomas H Gillingwater. 2008. "Selective Vulnerability of Motor Neurons and Dissociation of Pre- and Post-Synaptic Pathology at the Neuro-

- muscular Junction in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy” 17 (7): 949–62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm367>.
15. Redfern, By P.A. 1970. “From The,” 701–9.
 16. Sanes, Joshua R, and Jeff W Lichtman. 1999. “Development Of The Vertebrate Neuromuscular Junction,” 389–442.
 17. Sun, Karen Lai Wing, James P. Correia, and Timothy E. Kennedy. 2011. “Netrins: Versatile Extracellular Cues with Diverse Functions.” *Development* 138 (11): 2153–69. <https://doi.org/10.1242/dev.044529>.
 18. Tapia, Juan C., and Jeff W. Lichtman. 2012. “Synapse Elimination.” *Fundamental Neuroscience: Fourth Edition*, 437–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385870-2.00019-6>.
 19. Wilensky, Ann E., David H. Baldwin, Andrew E. Christie, and Katherine Graubard. 2003. “Stereotyped Neuropil Branching of an Identified Stomatogastric Motor Neuron.” *Journal of Comparative Neurology* 466 (4): 554–63. <https://doi.org/10.1002/cne.10903>.
 20. Wood, Sarah J., and Clarke R. Slater. 2001. Safety Factor at the Neuromuscular Junction. *Progress in Neurobiology*. Vol. 64. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00055-1).
 21. Wu, Zhijian, Aravind Asokan, and R. Jude Samulski. 2006. “Adeno-Associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy.” *Molecular Therapy* 14 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>.

| Serotipo | GFP en NMJs | Tiempo (expresión) | Volumen inyectado(stock) | Promotor/gen reportero |
|-----------------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| AAV2.1 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (1x10 ¹³ vg/ml) | CAG/eGFP* |
| AAV2.2 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (1x10 ¹³ vg/ml) | CMV/eGFP* |
| AAV2.4 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (7x10 ¹² vg/ml) | CMV/eGFP# |
| AAV2.5 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (1x10 ¹³ vg/ml) | CMV/eGFP* |
| AAV2.6 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (7x10 ¹² vg/ml) | CMV/eGFP# |
| AAV2.6.2 | No | > 4 semanas (solo en cerebro) | 10 nl (7x10 ¹² vg/ml) | CMV/eGFP# |
| AAV2.8 | + | 30 días (cerebro y médula espinal) | 10 nl (1x10 ¹³ vg/ml) | CMV/eGFP* |
| scAAV2.9 | No | 2 weeks (solo en cerebro) | 10nl (7x10 ¹² vg/ml) | CMV/eGFP# |
| AAV2.Rh 10 | +++ | 14 días (cerebro y médula espinal) | 10nl (7x10 ¹² vg/ml) | CMV/eGFP# |
| AAV2.9 | ++ | 30 días (cerebro y médula espinal) | 10nl (1x10 ¹³ vg/ml) | CAG/eGFP* |

Tabla 1. Caracterización de serotipos virales para transducir GFP en proyecciones motoras intramusculares. Los símbolos se refieren a la intensidad de la expresión de GFP en sinapsis neuromusculares (NMJs), siendo baja (+), regular (++), muy buena (+++). Diez nanolitros del stock fueron inyectados (Métodos). *indica que el vector provino de Addgene, mientras que # de U. of Iowa.

| Axón Motor | Largo Total (µm) | Diámetro Axonal* (µm) | Frecuencia de Ramificaciones (2; 3; 4; 5) | Número de Sinapsis Neuromusculares |
|------------|------------------|-----------------------|---|------------------------------------|
| 1 | 1.983 | 0.8 | 0% (Sin ramas) | 1 |
| 2 | 2.087 | 1.2 | 100% (2 x2) | 3 |
| 3 | 3.221 | 1.9 | 100% (2 x4) | 5 |
| 4 | 4.547 | 2.5 | 100% (2 x6) | 7 |
| 5 | 7.256 | 3.1 | 100% (2 x12) | 13 |
| 6 | 8.236 | 3.3 | 92% (2 x11) 8% (4 x1) | 15 |
| 7 | 13.720 | 5.2 | 90% (2 x27) 7% (3 x2) 3% (5 x1) | 36 |

Tabla 2. Parámetros cuantitativos de las unidades motoras (MUs) reconstruidas al día postnatal 60 en el músculo interscutularis.

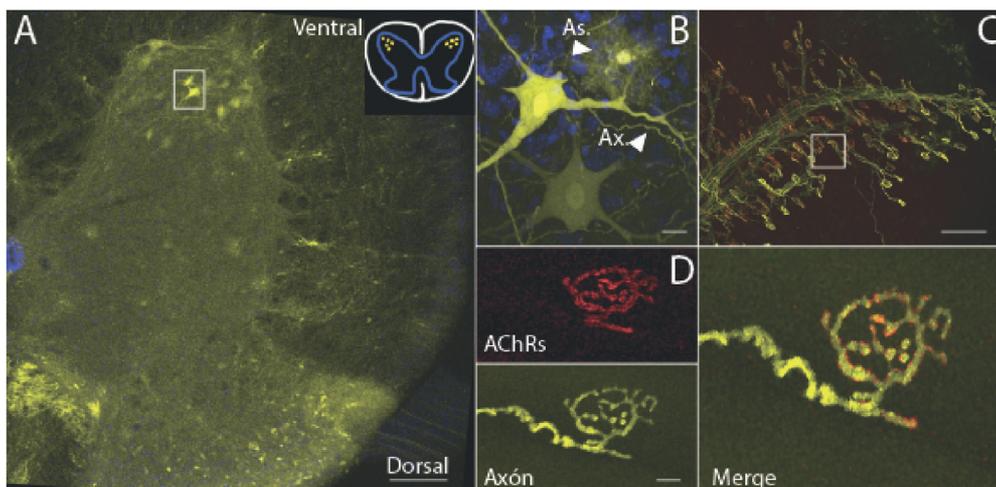


Figura 1. Transducción de GFP en neuronas motoras y en sus proyecciones intramusculares. A, Neuronas grandes (>30µm en diámetro) con múltiples proyecciones neuríticas, localizadas en la asta ventral (representación de corte transversal con neuronas motoras indicadas en círculos amarillos, dibujo superior derecha) de la médula espinal, expresaron GFP a P60. Cuadrado, indica un par de neuronas magnificadas en el panel B. Al menos 5 ramificaciones dendríticas fueron observadas en cada una de estas células. En algunos casos, también fue posible observar astrocitos asociados con estas células (As.). Note la ramificación fina que se extiende desde el soma neuronal (Ax.). Barra de calibración=100µm. C, Las ramificaciones de axones motores al interior del músculo esternomastoideo son identificadas por la expresión de GFP (amarillo), las que inervaron los AChRs (rojo). Barra de calibración=100µm. El cuadrado indica una sinapsis neuromuscular que es magnificada a mayor resolución en D. El axón terminal presináptico (Axón, amarillo), los receptores de acetilcolina postsinápticos (AChRs, rojo), y la perfecta asociación que existe entre ambos componentes (Merge; derecha) es mostrada. Note la complejidad de las extensiones intra-terminales presentes en esta sinapsis. Barra de calibración=5µm.

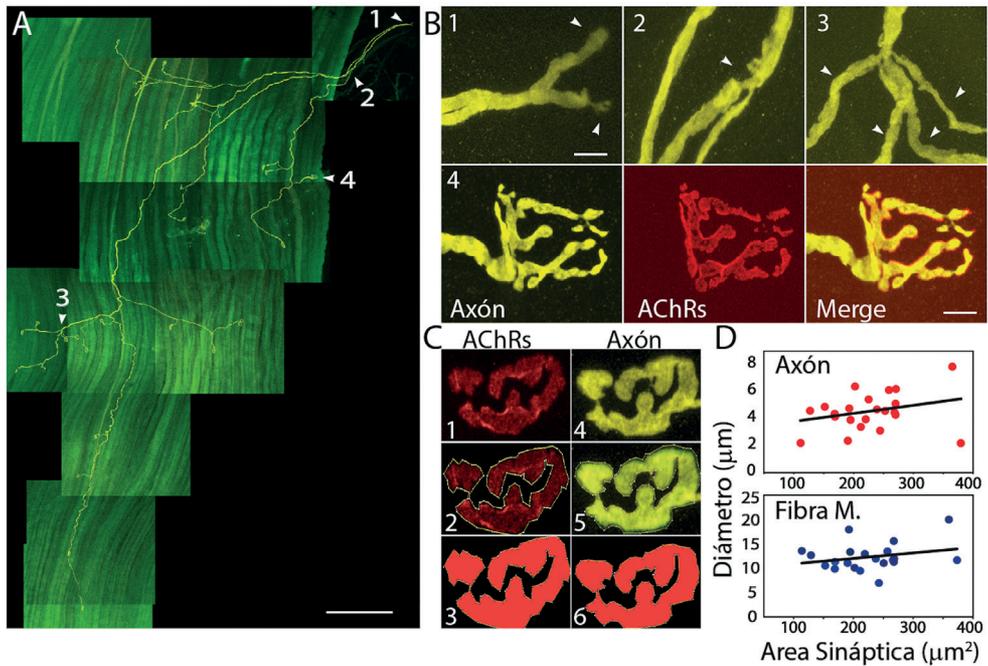


Figura 2. Transducción de GFP en axones motores adultos en el músculo interscutularis. A, Subgrupo de axones motores que expresaron GFP en el músculo interscutularis a P60. Se indican dos axones motores (amarillo; flecha 1), los que se ramificaron (flecha 2), y proyectaron sus ramas al interior del músculo, donde continuaron subdividiéndose (flecha 3), hasta generar varias sinapsis neuromusculares (flecha 4). En verde se indica la tinción para fibras musculares (faloidina). Barra de calibración=100 μ m. B, Vista magnificada de las flechas indicadas en A. Flecha 1: identificación de axones que ingresaron al músculo interscutularis; 2: bifurcación inicial de uno de los axones motores; 3: subdivisión axonal que generó cuatro ramas terminales (flechas); 4: imagen a alta resolución de una sinapsis neuromuscular. Son mostrados, el axón terminal presináptico (amarillo; izquierda), los receptores de acetilcolina postsinápticos (AChRs, rojo; centro), y la perfecta asociación que existe entre ambos componentes (Merge; derecha). Barra de calibración=5 μ m. C, Cuantificación de la superficie ocupada por AChRs (1: imagen de AChRs; 2: su demarcación poligonal; y 3: cuantificación de su área) y el axón presináptico (4: Terminal axonal; 5: su demarcación poligonal; y 6: superficie) en sinapsis neuromusculares al día P60. Detalles del análisis en métodos. D, Gráficos de correlación entre diámetro axonal presináptico y área sináptica (panel superior); y diámetro de las células diana (i.e. fibras musculares) versus el área sináptica (panel inferior).

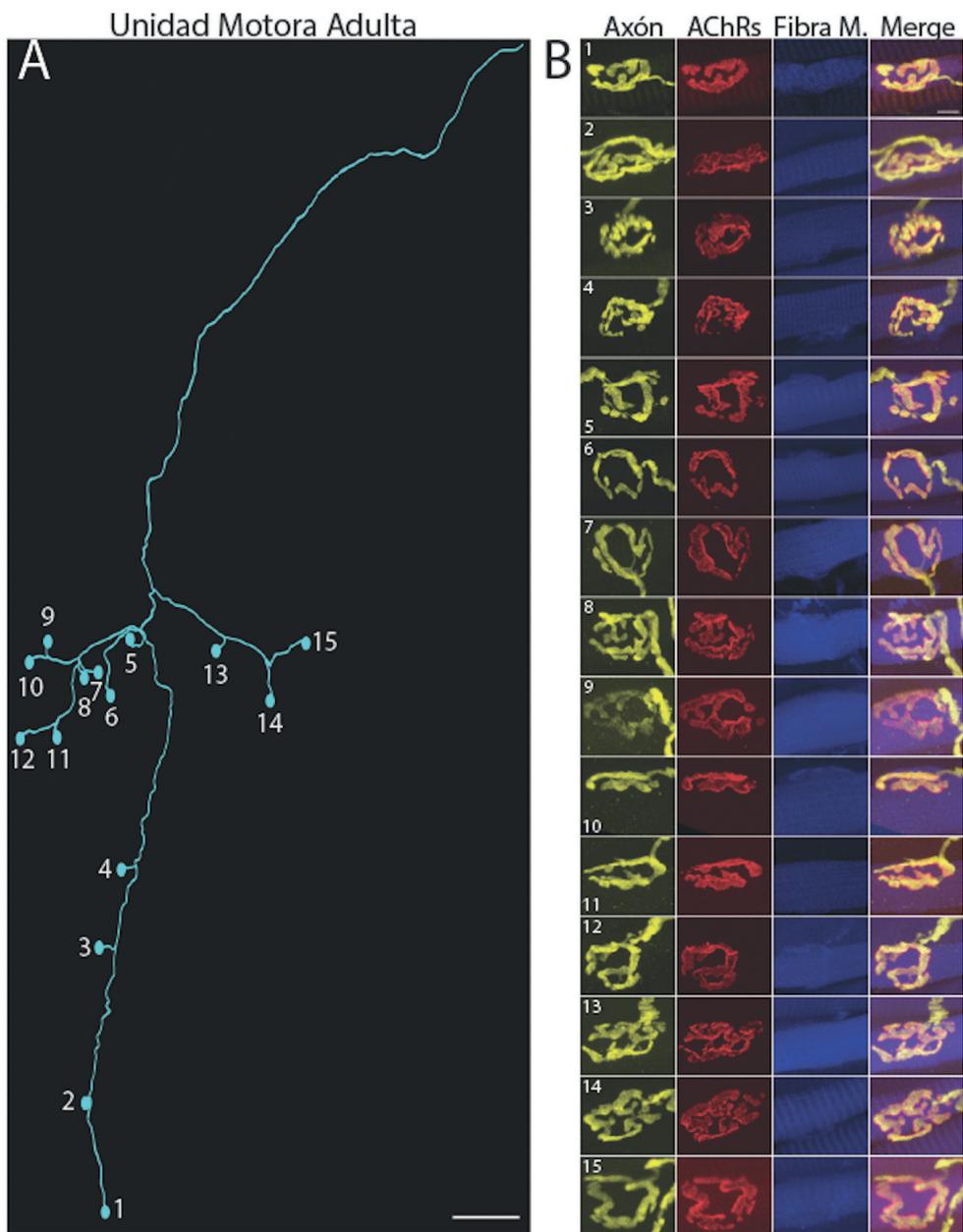


Figura 3. Reconstrucción de la cohorte de sinapsis neuromusculares pertenecientes a una unidad motora (MU) adulta. A, muestra la segmentación de una unidad motora adulta (P60) (celestes; MU01). Los círculos indican la ubicación de las sinapsis neuromusculares, en relación con su posición en el músculo. Cada sinapsis fue enumerada de acuerdo con su distancia respecto de la primera bifurcación en la MU. Esta MU controla 15 fibras musculares. Barra de calibración corresponde a 100µm. En B, se muestra cada una de las sinapsis neuromusculares de la MU celeste, organizadas por el orden indicado en A. En general, todas las sinapsis presentaron una colocalización por sobre el 98% entre la terminal axonal (Axón, amarillo) y los receptores de acetilcolina (AChRs, rojo), localizados en sus respectivas fibras musculares (Fibra M., azul), como se demuestra en la superposición (Merge). Barra de calibración corresponde a 5µm.

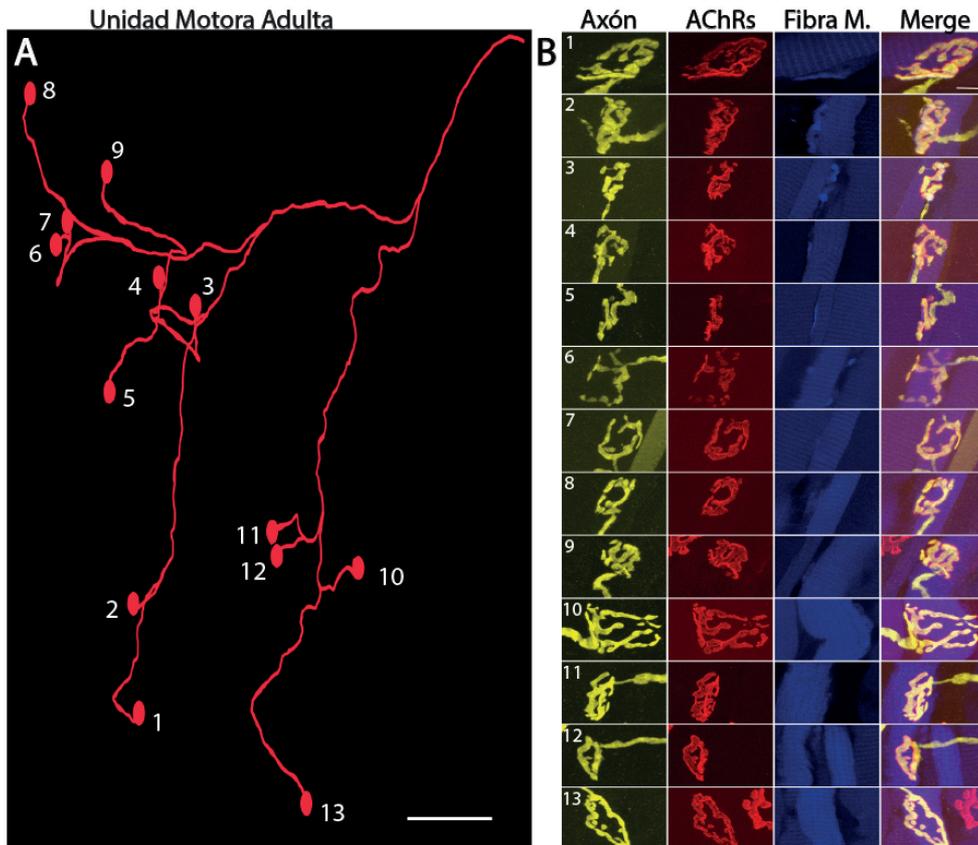


Figura 4. Reconstrucción de la cohorte de sinapsis pertenecientes a una segunda MU adulta. En A, se muestra la segmentación de una segunda unidad motora adulta (P60) (rojo; MU02), y la ubicación de todas sus sinapsis neuromusculares, indicadas con círculos. Este axón motor controla la tensión generada por 13 fibras musculares. Barra de calibración corresponde a 100 μ m. B, muestra cada una de las sinapsis de la MU roja, organizadas en el orden ilustrado en A (numeración). En general, todas las sinapsis neuromusculares presentaron una colocalización superior al 98% entre la terminal axonal (Axón; amarillo) y los receptores de acetilcolina (AChRs; rojo), ubicados en sus respectivas fibras musculares (Fibra M.; azul), como se muestra en la superposición (Merge). Barra de calibración corresponde a 5 μ m.