



Desarrollo neuromuscular en la atrofia muscular espinal

Rebeca Martínez Hernández

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Doctorado Biomedicina. Universidad de Barcelona

Línea de Neurociencias 2009-2012

DESARROLLO NEUROMUSCULAR EN LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL

Servicio de Genética

Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau (IIB Sant Pau)

Memoria presentada por:

Rebeca Martínez Hernández

Para optar al grado de Doctora en Biomedicina por la Universidad de Barcelona

Barcelona 2012

Eduardo Tizzano Ferrari

Director de la tesis

Isidre Ferrer Abizanda

Tutor de la tesis

Rebeca Martínez Hernández

Doctoranda

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

¡Por dónde empezar! Cuando llegas a esta parte de la tesis, viene el momento de reflexionar. De pensar en todo lo que ha pasado en estos años, de cómo ha ido la tesis y con quien has compartido tantos momentos al realizarla. Con mis compañeros siempre hablamos de que hay dos tipos de “personas” a la hora de hacer los agradecimientos, los que dan gracias a todo el mundo de forma sencilla y natural, o los que la hacen más a nivel personal. Este último, es mi caso.

Igualmente antes de empezar me gustaría agradecer a todos lo que han participado en ella, y eso incluye a toda la gente que me rodea, ¡ya que en algún momento de la vida ha tenido que sufrir mis charlas sobre esta tesis! Así que si estás leyendo esto, ¡MUCHAS GRACIAS POR EL APOYO que me has dado hasta ahora!

Primero de todo quiero agradecer a Eduardo por la confianza que me ha depositado. Aún recuerdo el primer día que llegué al laboratorio, *curriculum* en mano, y que, casi sin dudarlo me dijo que intentaría conseguir subvención para mi y así formar parte del “grupo AME”. ¡Desde entonces ya han pasado 5 años! Y hemos tenido de todo: aprendizaje, reflexiones sobre ciencia, “matizaciones”, teorías hipotéticas sobre la enfermedad, momentos de paciencia, descubrimientos, “Houston tenemos un problema”, “el Nono siempre tiene razón”, y muchos más que podría mencionar. Así que jefe, ¡ya hemos llegado al final! Una tesis más “a la butxaca”. ¡Muchas gracias por conseguir que llegue hasta aquí! A continuación quiero dar las gracias a una de las personas más importante en este trayecto, a la gran Sara! Aish Sareta que hagués fet sense tu! Ets la persona amb qui he compartit tot desde l’inici, a més a més vam arribar quasi alhora, així que aquesta tesi es tan teva com meva! Qui més m’ha recolzat, m’ha entés i m’ha aguantat! L’experiència es un grau, i com es nota que la tens! He après molt de tu, i m’has servit com a exemple en moltíssimes coses. Gràcies per ajudar-me a formular les nostres teories, com hem après juntes! Mirant informació, treient articles, i aguantant-nos les nostres històries diàries. Saps que t’estimo molt i que

aquesta tesi no hagués estat igual sense tu. Segueixo els agraïments amb la Jefa, la Dra. Baiget, que com sempre, acull a tots els doctorands com si estiguessim a Casa Nostra i per la confiança que dóna a tot el personal. Al “grup AME”, les meves companyes de tesi: la Evita, que sempre he tingut com a precedent, seguint els seus passets sempre al darrera, em vas ensenyar tot al principi quan vaig arribar! Com anava el laboratori, les tècniques, les comandes, la qPCR!! Però sobretot he après de la teva visió positiva de la vida, amb la feina, els amics i la família! Gràcies bonica! La Laura y la Ma Jesús, per ajudar-me en qualsevol problema de molecular y diagnòstic. A las adjuntos de genética Pía y Adriana, por tratarnos como sus becarios en cuanto se les pide ayuda y por aguantarnos cuando nos reunimos con Eduardo cada dos por tres! Als meus súper companys de laboratori: el Jonàs, la Lidia, la Laia, l’Ana, l’Eva, l’Edgard i la Juliana. Pel dia a dia, per les nostres hores de menjador, les xerrades de ciència, “el cafè de l’amor”, i les nostres filosofades sobre la vida, i sobre el camí dels científics avui en dia. Ha fet que tot es faci més amè! A tot el departament de genètica: la Ma Jose, el Manel, la Mònica, l’Anabel, la Eli i la Montse perquè em compartit la transició de l’hospital vell al nou, i amb tot i així encara ens seguim veient cada setmana.

En aquest apartat vull mencionar al Josep Esquerda i tot el seu grup. Josep, gràcies per la teva saviesa compartida, per ensenyar-me tantes coses sobre el múscul y la unió neuromuscular, i per la teva paciència com a docent. La col·laboració amb el teu laboratori ha estat indispensable! A la Marta, el Javi i la Montse per tractar-me com una més del grup de Lleida, i per ajudar-me en tot moment que ho necessitava. Al Jordi, l’Anna, la Olga i la Eli pel seu suport en quan es te qualsevol dubte.

Seguidament vull donar les gràcies a tot el servei de ginecologia i obstetrícia de l’Hospital de Sant Pau. Destacar al Juan Parra per la seva paciència en ensenyar-me a distingir els diferents moviments fetals, descobrint un nou món del desenvolupament humà. També vull agrair a tot el departament de Neurologia

Experimental de l'Hospital: l'Eduard, la Noemí, l'Esther, el Jordi i tot el grup en general, per l'ajuda que m'han donat en tot moment, resolent qualsevol dubte sobre el múscul. Sobretot vull donar les gràcies a la Bàrbara, pel teu recolzament com a companya i amiga, pels anticossos, les tècniques, i pels problemes tan personals com professionals, en fi, per estar sempre tan a prop quan t'he necessitat.

A Blanca, por ser mi mejor amiga siempre. Porque hemos vivido el doctorado juntas desde el primer momento en el mismo centro, por compartir este trayecto conmigo aguantando los bucles, subidones y bajones de estos años, y por estar siempre a mi lado. ¡No hubiese sido lo mismo sin ti! A les "Biogirls": l'Ali, la Bea, la Fani, la Montse, la Marta i la Núria, pel seu recolzament diari i per esta allà sempre com bones amigues!

A mis padres por su apoyo incondicional, por ofrecer toda la ayuda que está en sus manos, y por aguantarme siempre. A mis hermanos: Laura por tu interés en entender siempre a que nos dedicamos los científicos y Dani por ayudarme con tus aportaciones médicas y científicas, siempre dispuesto a ofrecer soluciones. A M^{re}Jesús, Jesús, Peña, Ángel, Diana, Xavi, Ana, Marta y Gerard por formar parte de la familia y animarme en todo momento.

A Marcos, porque esta tesis es para ti y por ti, el inicio y la meta. Por todos estos años, porque al final todo llega y se cumple. Por seguir cada minuto de mi vida a mi lado. Después de tantos años, cerramos una etapa, para empezar una fase nueva.

GRÀCIES A TOTS!

¡GRACIAS A TODOS!

ABREVIATURAS

AAV	Vector viral Adeno-Asociado
Ach	Acetilcolina
AChRs	Receptores de Acetilcolina
AME	Atrofia Muscular Espinal
ASO	Oligonucleótido Anti-sentido
ATP	Adenosin Trifosfato
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa
BVC	Biopsia de Vellosidades Coriónicas
CGRP	<i>Calcitonine-Gene Related Peptide</i>
ChAT	Colinacetiltransferasa
CK o CPK	Creatina quinasa
CMAP	Potencial de Acción Muscular Compuesto
DEXA	Absorciometría dual de rayos X
DGP	Diagnóstico Genético Preimplantacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EK	Egen Klassification
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EMG	Electromiografía
ESC	Células Madre Embrionarias
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	<i>Exonic Splicing Silencer</i>
FA	Fibras Atróficas
FGF	Factor de crecimiento de los Fibroblastos
FH	Fibras Hipertróficas
FL-SMN	<i>Full-lenght Survival Motor Neuron</i>
GMFM	Medida de la motricidad global
GTF2H2	Factor General de Transcripción IIH
HDAC	Histona-Deacetilasa

HFMS	Escala de Hammersmith
iPSCs	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
ISE	<i>Intronic Splicing Enhancer</i>
ISS	<i>Intronic Splicing Silencer</i>
MF	Movimientos Fetales
MFM	Evaluación de la funcionalidad motora
MHCd	<i>Developmental Myosin Heavy Chain</i>
MHCf	<i>Fast Myosin Heavy Chain</i>
MHCs	<i>Slow Myosin Heavy Chain</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MUNE	Estimación del número de unidades motoras
NAIP	<i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NMJ	Unión Neuromuscular
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLS3	Plastina 3
PRMT5	Proteína Arginina Metiltransferasa
RHA	RNA helicasa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAPII	RNA polimerasa II
SC	Células Satélite
SERF1	<i>Small EDRK-Rich factor</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SMA	Spinal Muscular Atrophy
SMN	<i>Survival Motor Neuron</i>
SMNΔ7	<i>Survival Motor Neuron Delta7</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNPs	<i>small nuclear Ribonucleoprotein</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>

ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESÚMENES.....	1
II. INTRODUCCIÓN	7
1. Generalidades de la Atrofia Muscular Espinal	9
1.1. Introducción	9
1.2. Descripción clínica	11
1.3. Bases moleculares	13
1.3.1. Genes <i>SMN</i>	14
1.3.2. <i>Splicing</i> alternativo de <i>SMN2</i>	17
1.3.3. Proteína SMN	18
1.3.4. Funciones de la proteína SMN	20
1.4. Métodos de diagnóstico	21
1.5. Seguimiento de la enfermedad	26
1.6. Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal y preimplantacional	27
1.6.1. Diagnóstico prenatal	28
1.6.2. Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)	30
1.7. Aspectos neuropatológicos	30
1.7.1. Aspectos neuropatológicos prenatales	31
1.7.2. Aspectos neuropatológicos postnatales	32
1.8. Tratamiento de la AME: Aproximaciones terapéuticas.....	35
1.8.1. Estrategias terapéuticas	36
1.8.1.1. Terapia farmacológica:	37
1.8.1.2. Terapia génica	41
1.8.1.3. Terapia celular	41
1.8.1.4. Otras medidas terapéuticas	42
2. Modelos animales de AME.....	43
3. Músculo, inervación y unión neuromuscular durante el desarrollo humano.....	47
3.1. El Músculo:	47
3.1.1. Diferenciación histológica	47
3.1.2. Las células satélite	50
3.1.3. Diferenciación histoquímica del desarrollo muscular	50
3.2. La Inervación:	52
3.3. La Unión Neuromuscular.....	54
3.3.1. Características de la unión neuromuscular	54

3.3.2. Diferenciación del aparato postsináptico.....	54
3.3.3. Diferenciación del aparato presináptico	56
3.3.4. Aspectos ultraestructurales de la unión neuromuscular durante el desarrollo humano	58
4. Movimientos fetales	60
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
IV. RESULTADOS.....	67
5. The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation.	69
6. Synaptic defects in type i spinal muscular atrophy in human development.	81
7. Ultrasound evaluation of fetal movements in pregnancies at risk for severe spinal muscular atrophy	105
V. DISCUSIÓN.....	115
VI. CONCLUSIONES.....	131
VII. ANEXOS	137
Anexo I:.....	139
Anexo II:.....	145
VIII. BIBLIOGRAFÍA	159

I. RESÚMENES

RESUMEN

Introducción: La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad neuromuscular infantil caracterizada por la muerte de las neuronas motoras del asta anterior de la médula espinal. Como consecuencia de ello hay una degeneración y atrofia muscular, por lo que los pacientes mueren a menudo de insuficiencias respiratorias graves. La AME se clasifica en tres tipos principales según el grado de gravedad, la edad de aparición y las pautas motoras. Se trata de una enfermedad con patrón de herencia autosómico recesivo causada por ausencia o mutaciones en el gen *Survival Motor Neuron 1 (SMN1)*. Existe un gen homólogo, *SMN2*, que está presente en todos los pacientes aunque a diferencia del *SMN1*, produce mucha menor proteína SMN completa y, por lo tanto, no evita la aparición de la enfermedad. Sin embargo se ha demostrado una importante correlación con el tipo de AME y el número de copias de *SMN2*. El rasgo patológico esencial de la AME es la muerte de las neuronas motoras. Estudios hechos en muestras fetales indican que ya existen hallazgos patológicos en el estadio prenatal lo que sugiere que la AME sería un trastorno del desarrollo. Además en modelos de ratón AME se ha determinado que la unión neuromuscular tendría un papel importante en la patogenia de la enfermedad aunque en humanos todavía no existen investigaciones al respecto.

Objetivos y metodología: Con el fin de profundizar en los conocimientos de la patogenia de la AME, en esta tesis se ha realizado un análisis histológico, inmunohistoquímico y ultraestructural del músculo y la unión neuromuscular en muestras prenatales y postnatales de controles y AME. Paralelamente, se han correlacionado los resultados neuropatológicos obtenidos con el estudio de la motilidad fetal por ecografía 2D entre las 11 y 14 semanas de gestación en embarazos diagnosticados genéticamente como AME.

Resultados: A partir de las 12 semanas, los miotubos AME son más pequeños que los controles lo que es compatible con un retraso en la maduración muscular. En esta etapa, la presencia de receptores de acetilcolina agrupados en músculo AME sugiere que éste es capaz de formar la placa neuromuscular. Sin embargo en semanas posteriores se observa una degeneración temprana de los terminales nerviosos asociados a una dispersión de los receptores de acetilcolina y acumulación anormal de vesículas presinápticas. Esto indica que en este período uno de los principales defectos sería la falta de mantenimiento de la unión neuromuscular. El músculo postnatal AME muestra persistencia de la expresión del receptor fetal de acetilcolina que refuerza la idea de una maduración retardada de la unión neuromuscular que persiste durante todo el desarrollo. La falta de mantenimiento de las uniones neuromusculares justificaría el inicio de un proceso de muerte retrograda (*“dying back process”*) dando lugar a una excesiva pérdida de neuronas motoras en la médula espinal. El estudio de los movimientos fetales, sin embargo, no demostró diferencias cualitativas entre los fetos normales y los AME. La falta de correlación entre la neuropatología descubierta en los fetos con AME tipo I y la presencia de movimientos fetales normales en ese mismo grupo indica que deben existir mecanismos compensatorios en el feto AME que enmascaran las posibles consecuencias funcionales de los defectos sinápticos hallados. Estos mecanismos compensatorios desaparecerían más tarde dando lugar a las graves manifestaciones de la enfermedad en las etapas perinatal y neonatal.

Conclusiones: Los resultados obtenidos contribuyen al mejor conocimiento de esta enfermedad en etapas presintomáticas, y abre nuevas perspectivas para investigar estrategias terapéuticas a fin de revertir los procesos de denervación, mantener la actividad de las uniones neuromusculares y mejorar la maduración de las placas motoras.

SUMMARY

Background: Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease characterized by degeneration and loss of spinal cord motor neurons leading to denervation and muscular atrophy. It is caused by defects in the *Survival Motor Neuron 1 gene (SMN1)* and it is classified by age of onset and motor milestones into three main types which strongly correlate with the copy number of its homologous gene, *SMN2*. *SMN2* expresses markedly less full-length protein than *SMN1*, provoking disease manifestations. The essential neuropathological feature in SMA is motor neuron death. Previous studies in SMA foetal samples showed early pathological changes in spinal cord suggesting that the disease is a developmental disorder. Studies in mouse SMA models support that neuromuscular junctions (NMJs) may play a significant role in the disease, although this implication has not yet been addressed in humans.

Aims and methodologies: To better understand the mechanisms of SMA disease, a comprehensive histologic, immunohistochemical and ultrastructural analysis of the muscle and neuromuscular junctions in prenatal and postnatal SMA samples was carried out. To further correlate neuropathological findings with early developmental manifestations of the disease, foetal motility between 11-14 gestational weeks was recorded and analyzed by 2D ultrasound in pregnancies predicted to develop SMA.

Results: At 12 weeks, most SMA myotubes were smaller than controls, indicating a delay in muscle maturation. At this stage, the presence of early acetylcholine receptor (AChR) clusters in developing SMA muscles suggested that pre-patterned and nerve-independent AChR clustering would not be affected by the disease. However, as development proceeded in the following weeks, early degeneration of nerve terminals was present associated with a dispersion of AChRs and abnormal preterminal accumulation of vesicles. These findings pointed towards a defect in

maintenance of the initial innervation in developmental SMA muscle. Furthermore, postnatal muscle of type I SMA patients showed persistence of the foetal subunit of acetylcholine receptors, suggesting a continuous delay in maturation of neuromuscular junctions. Therefore, if nerve terminals are unable to efficiently maintain functional NMJs, a dying-back process leading to motor neuron degeneration and loss may appear, with the consequent increase in programmed cell death. Despite all these early neuropathological findings, we did not observe qualitative differences in foetal movements between unaffected and SMA prenatal cases. The synaptic defects in SMA at this stage of development, therefore, might be compensated by several mechanisms. During perinatal and postnatal periods compensation would no longer be present, resulting in the drastic SMA pathology and clinical manifestations.

Conclusions: These developmental studies open new possibilities to improve our knowledge of presymptomatic SMA stages. Early therapeutic strategies should be investigated to reverse the process of denervation, maintain activity of the NMJ, and improve maturity of the motor endplates.

II. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de la Atrofia Muscular Espinal

1.1. Introducción

La Atrofia Muscular Espinal (AME) engloba un grupo muy heterogéneo de enfermedades genéticas caracterizadas por la degeneración y pérdida de las neuronas motoras de la médula espinal (**Figura 1**). El cuadro clínico típico de los pacientes con AME se caracteriza por una debilidad muscular generalizada en todo el cuerpo, resultante de una atrofia muscular progresiva.

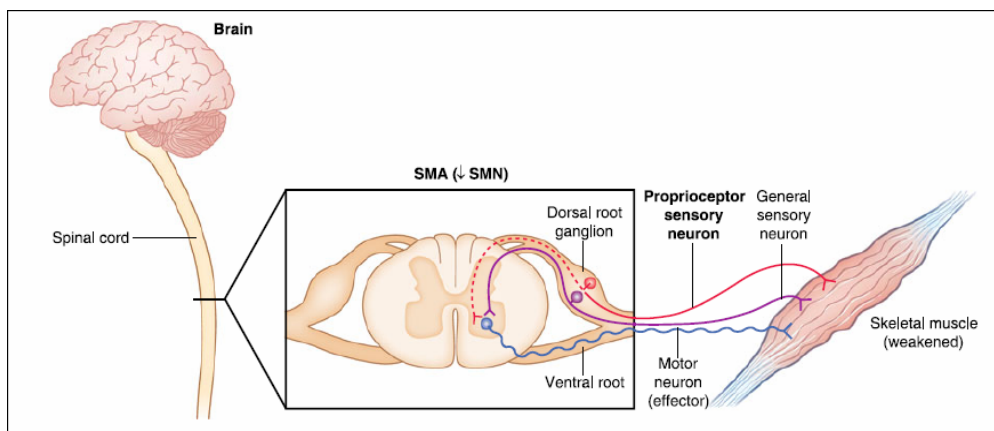


Figura 1: Circuito neuromuscular en la atrofia muscular espinal. La degeneración de las neuronas motoras es el rasgo fenotípico más frecuente. La proteína SMN parece ser crítica en procesos dentro del soma de la neurona motora, el axón, la sinapsis distal y la unión neuromuscular (Extraído de (Lewelt et al. 2012)).

La AME más común afecta a los músculos proximales más que a los distales, y en los casos más graves, afecta más a los músculos intercostales que al diafragma. Se trata de una enfermedad genética autosómica recesiva causada por la pérdida de función del gen Survival Motor Neuron 1 (*SMN1*) (Lefebvre et al. 1995). Con una incidencia aproximada de 1/6.000-1/10.000 nacimientos, y una frecuencia de portadores de 1/40-1/60, la AME es considerada como una de las principales causas hereditarias de mortalidad infantil (Pearn 1978; Cusin et al. 2003). En

España se calcula que hay unos 100 casos nuevos al año y que existen más de 1.000.000 de portadores que podrían transmitir la enfermedad a su descendencia.

Las primeras descripciones clínicas de AME fueron publicadas a finales del siglo XIX por Guido Werdnig y Johan Hoffmann. Estos autores describieron una forma infantil grave de AME, con aparición de los primeros síntomas nada más nacer o en los primeros meses de vida. Sin embargo, años más tarde, Kugelberg y Welander documentaron casos de AME donde la aparición de los síntomas se daba entre los 2 y 17 años de edad (Dubowitz 2009). Debido a los distintos fenotipos de la enfermedad, en 1991 el *Consortio Internacional de la Atrofia Muscular Espinal* clasificó formalmente la AME en tres tipos, según el nivel de funcionalidad motora y la edad de aparición (Munsat and Davies 1992) (**Figura 2**): AME tipo I (forma grave o Werdnig-Hoffmann, MIM #253300); AME tipo II (forma intermedia, MIM #253550) y AME tipo III (forma juvenil o Kugelberg-Welander, MIM #253400). Posteriormente, se hicieron modificaciones de esta clasificación incluyendo la división de la AME tipo III en dos subcategorías, dependiendo de la edad de aparición (tipo IIIa y IIIb); la AME tipo IV para los casos adultos; y por último el tipo 0 para aquellos pacientes con inicio prenatal o defunción en las primeras semanas de vida. Este esquema ha proporcionado información muy útil tanto para el diagnóstico genético como para el pronóstico clínico (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de la Atrofia Muscular Espinal

Tipo	Edad de aparición	Función motora alcanzada	Edad de defunción	Nº copias de SMN2*
0	Prenatal	Disfunción respiratoria	<1 mes	1
I	0-6 meses	No llegan a permanecer sentados	<2 años	2
II	<18 meses	No llegan a permanecer de pie	>2 años	3
IIIa	18 meses-3 años	Capacidad de deambular	Adulto	3,4
IIIb	>3 años	Capacidad de deambular	Adulto	3,4
IV	>21 años	Capacidad de deambular	Adulto	4 o más copias

* el número de copias del gen *SMN2* refleja la mayoría de los casos observados en cada tipo de AME aunque la correlación no es absoluta (ver apartado 1.3.1)

1.2. Descripción clínica

❖ **AME tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann:** Es la forma más grave y la más común y comprende el 50% de todas las AME. Normalmente, los pacientes con este tipo presentan síntomas antes de los 6 meses de vida. La evolución de la enfermedad empieza con una marcada disminución de los movimientos musculares proximales (con mayor debilidad en las extremidades inferiores que en las superiores) y del tono muscular (hipotonía generalizada), y nunca llegan a permanecer sentados sin ayuda. Los reflejos tendinosos están disminuidos o ausentes, pero la sensibilidad está preservada. La afectación de las neuronas motoras bulbares, puede provocar fasciculación de la lengua y, a veces, problemas de deglución y succión. Aunque el diafragma se mantiene más o menos estable, los músculos intercostales se ven altamente afectados provocando dificultades respiratorias graves. Muchos de estos pacientes dependen de sondas nasogástricas debido a insuficiencias respiratorias, complicaciones que provocan que estos bebés no lleguen a alcanzar los dos años de edad. En los casos más graves de esta forma, se incluyen aquellos con inicio prenatal, donde la madre puede notar disminución de movimientos fetales durante el embarazo. Estos casos presentan debilidad muscular desde el nacimiento, y algunos pacientes pueden presentar fracturas óseas congénitas e incluso malformaciones cardíacas. Esta forma más grave es la descrita como **AME tipo 0** (Dubowitz 1999; Kelly et al. 1999; MacLeod et al. 1999; Felderhoff-Mueser et al. 2002; Menke et al. 2008; Rudnik-Schoneborn et al. 2008; Shababi et al. 2010).

❖ **AME tipo II o forma intermedia:** En esta forma, los síntomas aparecen un poco más tarde que en la AME tipo I, normalmente entre los 7 y 18 meses de vida. Los pacientes presentan debilidad muscular proximal e hipotonía, pero, a diferencia de los AME con la forma grave, éstos son capaces de sentarse sin ayuda e incluso de permanecer de pie, aunque nunca llegan a deambular por sí solos. Las piernas se ven más afectadas que los brazos, y la debilidad de los músculos del

tronco da lugar a deformidades del tórax y desviaciones de la columna (escoliosis). Esto provoca que los pacientes no puedan sentarse holgadamente en la silla de ruedas, con lo que recurren a la cirugía para corregirlo. La esperanza de vida de los mismos depende del rango de gravedad de la función motora; de este modo, aquellos que sean más propensos a presentar alteraciones respiratorias y escoliosis, dependerán de ventilación mecánica mucho antes que aquellos con mayor fuerza muscular.

❖ **AME tipo III o enfermedad de Kugelberg-Welander:** Es la forma más variable y heterogénea. La enfermedad puede empezar a presentarse desde los primeros años de vida hasta la edad adulta. Normalmente alcanza a todas las funciones motoras y el paciente puede deambular sin ayuda. Sin embargo, a medida que la enfermedad va apareciendo, presentan dificultades en la locomoción, desarrollando debilidad muscular proximal. Algunos pueden depender de la silla de ruedas en la infancia, an cambio otros pueden caminar en la edad adulta con defectos musculares menores. Para facilitar el diagnóstico se ha dividido este grupo en dos tipos: AME tipo IIIa y tipo IIIb. La **AME tipo IIIa** aparece durante los 3 primeros años de vida; los pacientes tienen dificultades para andar y a veces no alcanzan a desarrollar todas las funciones motoras. En la **AME tipo IIIb**, los primeros síntomas aparecen entre los 3 y 30 años de edad. La debilidad muscular y la progresión de la misma pueden ser lentas, incluso a veces imperceptible (Zerres et al. 1997). La variabilidad fenotípica en la AME tipo III es mucho más frecuente que en la tipo I y II. Se han encontrado casos en familias con el mismo defecto genético pero con discordancia en la edad de aparición de la enfermedad, su evolución y sus manifestaciones. Incluso algunos casos son asintomáticos (Cusco et al. 2006).

❖ **AME tipo IV o forma adulta:** En este tipo se incluyen aquellos casos en los que la enfermedad aparece después de los 30 años; la progresión es muy lenta y la esperanza de vida es prácticamente normal. Este grupo puede deambular

generalmente sin dificultades y no presentan problemas respiratorios. La debilidad muscular se encuentra sobretodo en los muslos y la cintura pelviana.

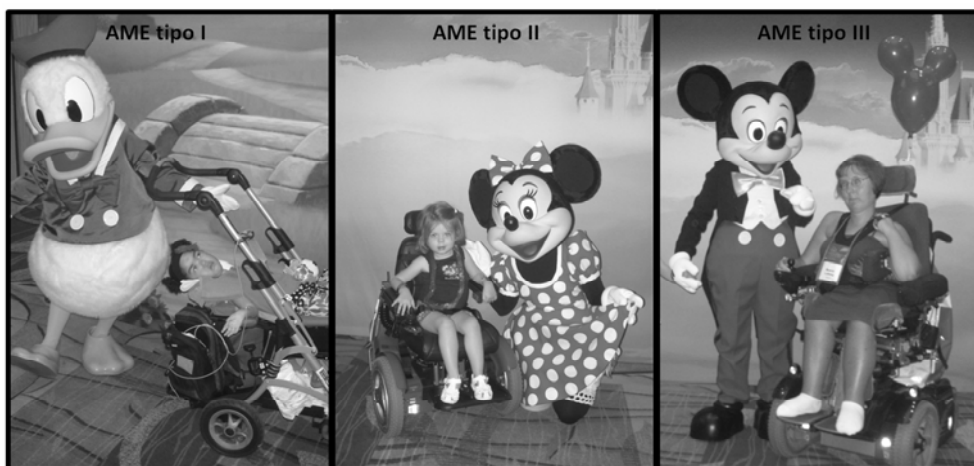


Figura 2. Imágenes tomadas en el 15th Annual International SMA Research Group Meeting (Orlando, Junio 2011) de los tres tipos de AME.

1.3. Bases moleculares

En 1995, el grupo de la Dra. Melki, descubrió que el 95% de las AME estaban causadas por una deleción homocigota del gen *Survival Motor Neuron 1* (*SMN1*) (Lefebvre et al. 1995), localizado en una región del brazo largo del cromosoma 5 (5q11.2-q13.3) (Brzustowicz et al. 1990; Melki et al. 1990). En humanos, existen dos formas del gen *SMN*: la copia telomérica (*SMN1*) y la copia centromérica (*SMN2*). Estas regiones contienen además tres genes: gen *NAIP* (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) (Roy et al. 1995), gen *GTF2H2* (factor general de transcripción IIH) (Burglen et al. 1997; Carter et al. 1997) y gen *SERF1* (con función desconocida) (Scharf et al. 1998) (representación en **Figura 3**). Aunque en la población normal se pueden encontrar deleciones de cualquiera de estos genes, todos los tipos de AME están causados por variaciones en el gen *SMN1*, y el

fenotipo de éstos dependerá del número de copias de *SMN2* o de la presencia de posibles genes modificadores.

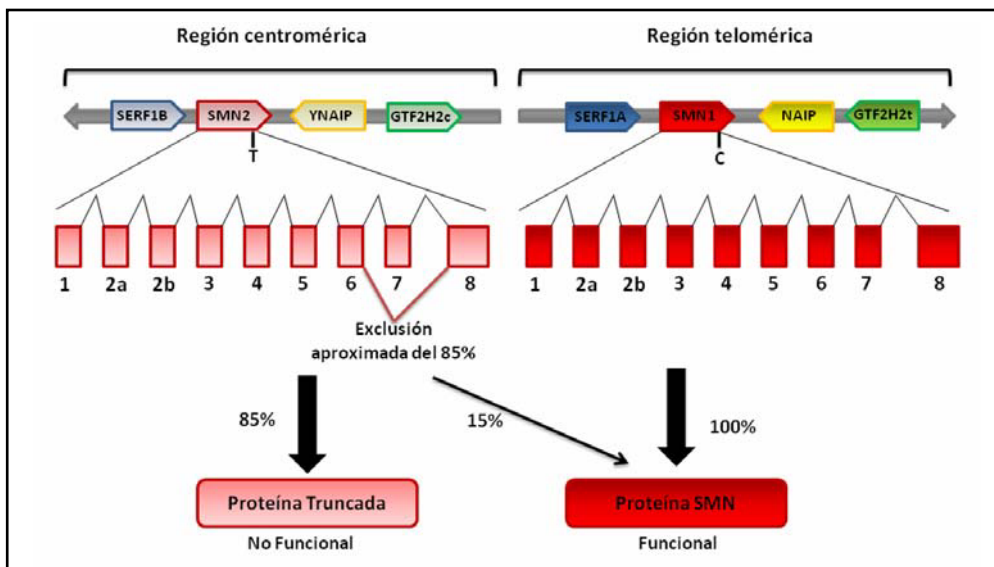


Figura 3. Esquema de la región centromérica y telomérica del locus AME, formado por 4 genes: *SERF*, *SMN*, *NAIP* y *GTF2H2*. El cambio de nucleótido de 840C>T del gen *SMN2* provoca un *splicing* alternativo generando de forma mayoritaria la exclusión del exón 7, dando lugar a una proteína truncada no funcional (Adaptado de (Kolb and Kissel 2011)).

1.3.1. Genes *SMN*

La población general presenta mayoritariamente dos copias de los genes *SMN1* y *SMN2*. Ambos genes son altamente homólogos y tan solo se diferencian por cinco nucleótidos, uno de los cuales se encuentra en una región codificante, aunque no afecta a la secuencia de aminoácidos (Echaniz-Laguna et al. 1999; Monani et al. 1999). Los dos genes contienen nueve exones y ocho intrones que se expanden en una región cromosómica de aproximadamente 20 kb. Este gen está altamente conservado desde las levaduras hasta los humanos. Sin embargo el gen *SMN2* es único en humanos, característica que dificulta su estudio basado en modelos animales. La diferencia crítica entre *SMN1* y *SMN2* es el cambio de nucleótido de una citosina (C) a una timina (T) en la posición 840, que da lugar a un

proceso de corte y empalme (*splicing*) alternativo produciendo la exclusión del exón 7 en la mayoría de los transcritos del gen *SMN2* (Lorson et al. 1999). De este modo se traduce una proteína truncada no funcional que será posteriormente degradada (*SMN Δ 7*). Cabe decir, que la exclusión del exón 7 del mRNA del gen *SMN2* no es completa, con lo que una pequeña fracción del total de los transcritos (aproximadamente un 10-15%) contiene el exón 7, codificando la proteína SMN normal (**Figura 3**).

Todos los pacientes AME presentan pérdida de función del gen *SMN1* ya sea por deleciones homocigotas del gen (90% de los casos), por la formación de genes híbridos (sustitución del exón 7 por su homólogo centromérico, un 5% de los casos), o por mutaciones puntuales intragénicas (4% de los casos) (Cusco et al. 2001; Cusco et al. 2004; Cusco et al. 2006; Alias et al. 2009). En la población española existe una mutación puntual prevalente y con un efecto fundador que consiste en una deleción de 4 pares de bases en el exón 3 (c.399_402delAGAG) que genera un cambio de la pauta de lectura dando lugar a un codón *stop* prematuro (Bussaglia et al. 1995; Cusco et al. 2003).

La ausencia de ambos genes *SMN1* y *SMN2* nunca se ha observado en humanos, por lo que se deduce que este genotipo es letal durante el desarrollo humano. El gen *SMN2* está presente en todos los pacientes AME, sin embargo la formación de proteína funcional no es suficiente para compensar la pérdida del gen *SMN1* (Wirth 2000; Rojas-García et al. 2002). Es decir, la baja producción de proteína permite el desarrollo embrionario normal, pero no es suficiente para mantener la supervivencia de las neuronas motoras de la médula espinal, dando lugar a la enfermedad. Por lo tanto, se podría decir que la enfermedad está causada por una disminución de la proteína SMN. Dado que el gen *SMN2* produce cierta cantidad de proteína funcional, el número de copias de éste influye en el fenotipo final de la enfermedad. De este modo, la mayoría de pacientes AME tipo I tendrán una o dos copias del gen *SMN2*, mientras que los AME tipo II o III tendrán 3 copias de *SMN2*

(**Tabla 1**) y la mayoría de pacientes que deambulan tendrán 4 o más copias (Feldkotter et al. 2002; Cusco et al. 2006; Wirth et al. 2006; Alias et al. 2011).

Sin embargo la correlación genotipo *SMN2*-fenotipo AME no es absoluta. Además se puede encontrar variabilidad dentro de la misma familia (especialmente en las formas menos graves), es decir, hermanos con la misma delección del gen *SMN1* y con el mismo número de copias de *SMN2*, pero uno es sintomático y el otro asintomático o con manifestaciones mínimas de la enfermedad (Bussaglia et al. 1997; Cusco et al. 2006). Estos casos sugieren que puede haber otros genes o factores modificadores intrafamiliares. El gen de la *Plastina 3 (PLS3)* ha sido el primero identificado fuera del locus AME que podría explicar las diferencias de fenotipo en algunas familias discordantes (Oprea et al. 2008). Sus descubridores observaron que en 5 familias discordantes, los hermanos asintomáticos tenían niveles de PLS3 en linfoblastos inmortalizados superiores a los hermanos afectados por lo que sugirieron que un aumento de esta proteína podría ser un modificador protector de la enfermedad (Oprea et al. 2008). En nuestro laboratorio, se estudió la expresión de *PLS3* en 4 familias discordantes aunque no se pudo confirmar un efecto modificador de este gen en ellos (Bernal et al. 2011).

Entre los modificadores interfamiliares se ha descrito recientemente la variante c.859 G>C en el exón 7 del gen *SMN2*. Esta variante es un cambio nucleotídico que produce un aumento de la inclusión del exón 7, dando lugar a un aumento de transcritos completos generados por el gen *SMN2*. Esta variante está relacionada con una disminución de la severidad de la enfermedad, explicando aquellos casos en los que el número de copias de *SMN2* no se correlacionaba con el fenotipo de la enfermedad (Prior et al. 2009; Bernal et al. 2010; Vezain et al. 2010).

El estudio de factores modificadores es prioritario para poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. En nuestro laboratorio existen varias líneas de investigación con el fin de descubrir nuevos factores modificadores de la

enfermedad en diferentes familias con casos discordantes, en pacientes con menor número de copias *SMN2* y fenotipo menos grave del esperable y en pacientes con más copias de *SMN2* y fenotipo más grave del esperable. En ellos se estudian diferencias que podrían aparecer al aplicar metodologías como exon arrays, arrays de expresión, arrays de SNP's y ultrasecuenciación. También es importante el estudio de estos marcadores en el tejido diana de la enfermedad, ya sea músculo o médula espinal. Debido a la inaccesibilidad del estudio en neuronas motoras, también se están llevando a cabo experimentos empleando células pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). Estas células madre procedentes de la reprogramación de fibroblastos de pacientes, tienen la capacidad de ser diferenciadas a neuronas motoras, pudiendo dar lugar a un modelo *in vitro* más cercano al estudio de la AME.

1.3.2. *Splicing* alternativo de *SMN2*

La diferencia entre los genes *SMN1* y *SMN2* se genera debido a la alteración del proceso de *splicing* por el cambio nucleotídico c.840 C>T (Lorson et al. 1999).

Durante el procesamiento de maduración del RNA, existen una serie de modificaciones basadas en la escisión de los intrones llamadas procesamiento de *splicing*. Durante este procesamiento se requiere un complejo formado por varias ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), llamado *spliceosoma*. El *spliceosoma* es el responsable de reconocer una serie de secuencias consenso que definirán la escisión de los intrones. Además existen otras secuencias que pueden ser tanto activadoras como inhibidoras del *splicing* y se definen como: *intronic splicing enhancer* (ISE), *exonic splicing enhancer* (ESE), *intronic splicing silencer* (ISS) y *exonic splicing silencer* (ESS). En la inclusión del exón 7 participan varias regiones ESE que son cruciales para la correcta maduración del transcrito completo *SMN* (*Full-length SMN* o *FL-SMN*) (Lorson and Androphy 2000).

Se han descrito dos teorías sobre el efecto de la transición de C→T en el *splicing* de *SMN2*. Cartegni y Krainer, describieron que este cambio nucleotídico altera la función de una secuencia ESE (activadora del *splicing*) que ayuda a promover la inclusión del exón 7, necesaria para la producción intacta de la proteína SMN (Cartegni and Krainer 2002). Kashima y Manley, argumentaron sin embargo que este cambio nucleotídico creaba un ESS (inhibidor del *splicing*) en el gen *SMN2*, que favorecía la exclusión del exón 7 por la unión de una ribonucleoproteína represora (hnRNP A1) (Kashima and Manley 2003). Aunque el efecto de estas dos teorías es el mismo, las suposiciones sobre la exclusión o inclusión del exón 7 siguen siendo discutibles.

La variante c.859 G>C en el gen *SMN2* descrita en el apartado anterior, es un modificador positivo que afecta el *splicing* del exón 7. Así, este cambio genera un ESE o inhibe un ESS en el gen *SMN2* cuyo resultado es favorecer la inclusión del exón 7. Los pacientes con este modificador que tienen sólo dos copias del gen *SMN2* (que predice el desarrollo de un tipo I) son capaces de incrementar los niveles de transcrito *FL-SMN* dando lugar a un fenotipo más leve (tipo II-III).

1.3.3. Proteína SMN

La proteína SMN esta formada por 294 aminoácidos y tiene un peso molecular de 38 kiloDaltons. Esta proteína se expresa en el núcleo y citoplasma de todos los tejidos somáticos, con unos niveles particularmente elevados en las neuronas motoras de la médula espinal. Sin embargo, tanto los niveles de expresión como la localización de SMN varían según la etapa de desarrollo, siendo más elevados durante la etapa fetal, en comparación con la postnatal (Burlet et al. 1998; La Bella et al. 1998; Williams et al. 1999; Pagliardini et al. 2000; Jablonka et al. 2001). Estas diferencias a nivel de expresión sugieren que SMN pueda tener una regulación diferencial en ambos períodos, dando evidencias que tendría una

función crucial en el desarrollo humano y en la patología de la enfermedad en esta etapa.

Dentro del núcleo, la proteína se localiza en unas estructuras asociadas a los cuerpos de Cajal, llamadas gems (Liu et al. 1997; Matera and Frey 1998; Young et al. 2001). La proteína SMN forma parte de un complejo multiproteico formado por diferentes geminas (*Gemin* 2-8) que interactúan con diferentes proteínas snRNPs, incluidas las proteínas Sm (Cauchi 2010). Las proteínas Sm se unen a pequeños RNAs nucleares ricos en uridina (U snRNAs) que intervienen en los procesos de splicing del pre-mRNA (**Figura 4**) (Massenet et al. 2002; Yong et al. 2004; Eggert et al. 2006; Chari et al. 2009).

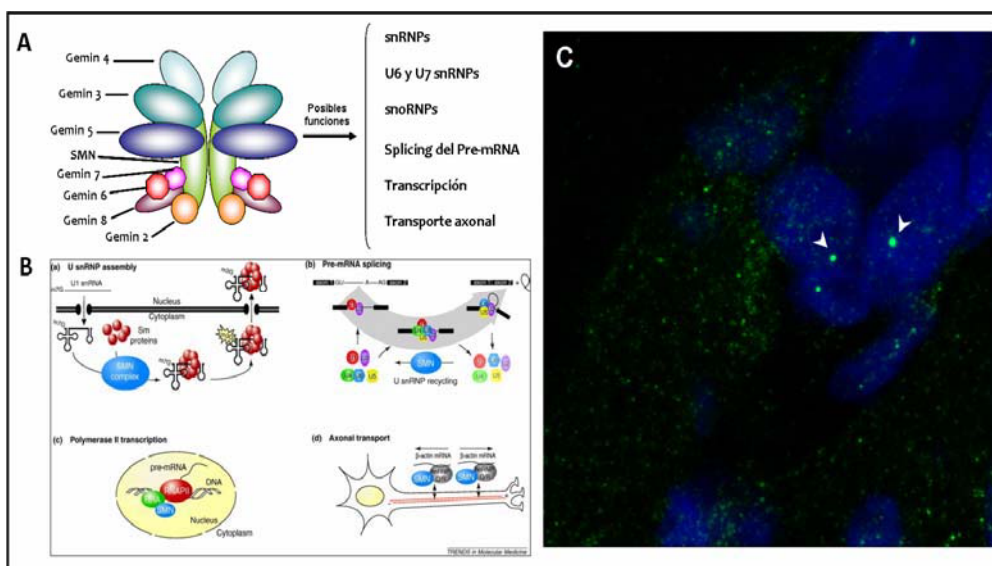


Figura 4. Estructura, función y localización de la proteína SMN. **A:** Complejo SMN formado por diferentes Geminas 2-8. Este complejo interactúa directamente con partículas ribonucleoproteicas que contribuyen en diferentes funciones del metabolismo del RNA (Adaptado de (Yong et al. 2004)). **B:** Posibles funciones celulares de la proteína SMN: ensamblaje de U snRNPs, participación en el splicing del pre-mRNA, transcripción de la RNA polimerasa II, transporte axonal del mRNA de la β -actina. (Esquema extraído de (Eggert et al. 2006)). **C:** Localización de SMN en músculo. Doble inmunofluorescencia de SMN (en verde) y DAPI (azul). La expresión de SMN aún siendo ubicua, se concentra altamente en las gems nucleares (flechas).

Aunque SMN se expresa en todas las células somáticas, la vulnerabilidad de las neuronas motoras de la médula espinal en la atrofia muscular espinal sigue siendo un misterio (Briese et al. 2005; Wishart et al. 2010). Muchos estudios sugieren que esta proteína pueda tener funciones importantes únicas en las neuronas motoras, sin embargo no hay evidencias claras sobre su actuación en estas células.

En pacientes AME, la cantidad de proteína SMN completa (15%) producida por el número de copias del gen *SMN2*, permite su desarrollo embrionario, sin embargo este nivel no es suficiente para mantener las neuronas motoras vivas. El resto de proteína que se forma de este gen (85%) tiene ausencia del exón 7, con lo que se forma una proteína inestable que se degrada rápidamente (Lorson et al. 1998; Vitte et al. 2007; Burnett et al. 2009).

1.3.4. Funciones de la proteína SMN

El hecho de que la proteína SMN tenga una expresión ubicua en todos los tejidos, sugiere que pueda tener un papel común importante a nivel celular. Sin embargo, la pérdida de función de SMN se traduce directamente en la degeneración de las neuronas motoras. Por este motivo, se han asociado funciones celulares de SMN comunes y otras tejido-específicas.

Como he mencionado anteriormente, la proteína SMN forma parte de un complejo multiproteico necesario para mediar el ensamblaje de las proteínas Sm con los U snRNAs, que formarán los componentes principales del *spliceosome*. Se ha descubierto una segunda macromolécula que podría estar implicada en esta función junto con SMN, la proteína arginina metiltransferasa (PRMT5) (Friesen et al. 2001; Meister et al. 2001). Una vez ensamblado todo el complejo, los snRNAs se hipermetilan y son transportados al núcleo (localizados en los cuerpos de Cajal) donde actuarán en la maduración y *splicing* de los pre-mRNAs (Coady and Lorson 2011). Otros estudios sugieren otra función para SMN en la asociación de ésta con

la RNA helicasa A (RHA) y la RNA polimerasa II (RNAPII), donde tendría un papel importante en la expresión génica (Strasswimmer et al. 1999; Pellizzoni et al. 2001; Voss et al. 2001). Además de estas funciones genéricas, en los últimos años se le han atribuido funciones específicas en la neurona motora, concretamente en el transporte axonal de mRNA (Rossoll et al. 2002). La primera sugerencia proviene de la interacción de SMN con la proteína hnRNP R, que se une a una región no traducida UTR (*untranslated region*) del mRNA de la β -actina. Estos estudios realizados en líneas celulares de feocromocitoma (PC12) atribuyeron a la proteína SMN una función en el crecimiento axonal (Rossoll et al. 2003). Además, en neuronas motoras purificadas de modelos de ratón AME, encontraron una disminución de los niveles de mRNA de β -actina en axones distales y conos de crecimiento, sugiriendo que Smn y hnRNP R modulan el transporte axonal del mRNA (Rossoll et al. 2003). Estas ideas, fueron respaldadas por Bassel *et al*, quienes encontraron el movimiento de SMN a lo largo del axón en cultivos neuronales primarios (Zhang et al. 2003) y por Giesemann *et al*, quienes revelaron la interacción de SMN con la profilina II, un factor específico neuronal para la polimerización de actina (Giesemann et al. 1999). De este modo se podría especular que SMN, hnRNP R y la profilina II están todas involucradas en el tráfico axonal de las neuronas motoras (**Figura 4**). El transporte axonal de mRNA se ha visto afectado en otras enfermedades neuronales, como en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y el síndrome de X frágil. Estos hallazgos demuestran la importancia del metabolismo del RNA durante el desarrollo del sistema nervioso (Dahm and Macchi 2007; Baumer et al. 2010).

1.4. Métodos de diagnóstico

Actualmente, el método más utilizado para certificar el diagnóstico de la AME, es el diagnóstico molecular. Este método ha ayudado mucho a los clínicos para descartar la AME frente a otras enfermedades de neurona motora o

miopatías, debido a la gran variabilidad fenotípica de sus síntomas. Aun así, es necesario hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, para poder clasificarla en uno de los tipos de AME. La debilidad muscular es debida a la denervación del músculo; esta denervación se puede demostrar mediante electromiografía o mediante estudios histológicos en biopsias musculares. De este modo tanto para realizar el seguimiento y evolución de la enfermedad como para un posible tratamiento de la misma, se tienen en cuenta los siguientes criterios (Crawford and Pardo 1996; D'Amico et al. 2011; Mercuri et al. 2012):

❖ **Diagnóstico Clínico de la AME:**

La debilidad muscular es la manifestación más importante y es casi siempre simétrica, más proximal que distal, y generalmente es mayor en las piernas que en los brazos. La debilidad muscular se correlaciona con la edad de aparición y el nivel de funcionalidad motora (**Tabla 1**). La sensibilidad está preservada, y la ausencia de reflejos tendinosos pueden ser variables según la edad de aparición y la duración de la enfermedad. En las formas más graves también se pueden encontrar diferentes signos como: afectación del movimiento de la cabeza, debilidad al llorar y toser, dificultad en la deglución y succión, atrofia y fasciculación de la lengua y respiración diafragmática (ver apartado 1.2).

❖ **Diagnóstico Molecular:**

Como se comentó anteriormente, el primer nivel de diagnóstico para un paciente sospechoso de tener AME es la búsqueda de la delección homocigota del gen *SMN1*. La ausencia del exón 7 del gen *SMN1* confirma el diagnóstico de AME. Aproximadamente el 90% de los casos tiene también delección del exón 8 mientras que un 5% tiene presencia de este exón. Estos últimos casos representan genes híbridos *SMN2-SMN1* (Cusco et al. 2001). Este tipo de diagnóstico tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad de casi el 100%. Si el test es negativo, se realiza la valoración del número de copias del gen *SMN1*, empleando

metodologías como *Real Time PCR (Lightcycler o Taqman)* o *Multiplex Ligation-dependent probe amplification (MLPA)* (Feldkotter et al. 2002; Anhuf et al. 2003; Arkblad et al. 2006; Rudnik-Schoneborn et al. 2009). Si el paciente tiene una copia del gen *SMN1*, se pasa a secuenciar este alelo con la finalidad de buscar la mutación causante de la enfermedad. Durante este procedimiento, se realizan además, y si es posible, estudios de portadores en los padres para facilitar el diagnóstico y realizar asesoramientos genéticos e informar sobre futuras opciones reproductivas. El estudio de los portadores pertenecientes a familias con afectados se realiza habitualmente utilizando la estrategia indirecta mediante el uso de marcadores polimórficos tipo microsatélite (C212 y C272). Para ésto es necesario disponer de muestra de DNA del afectado a fin de identificar los haplotipos de riesgo que segregan con la enfermedad. El análisis de estos marcadores, que están localizados en el extremo 5' del gen *SMN*, permite realizar un diagnóstico probabilístico pero altamente fiable. Incluso en algunas familias en las que el afectado ha fallecido es posible efectuar el diagnóstico genotípico gracias a la amplificación de DNA procedente de muestras de sangre seca sobre papel cromatográfico (utilizadas en el cribaje neonatal) y de bloques o secciones de tejidos de material de biopsias o autopsias.

❖ **Electromiografía:**

Antes de que se descubriese el gen, el diagnóstico de AME se hacía mediante la confirmación de electromiografía (EMG) y biopsia muscular. El EMG muestra signos de denervación como potenciales de fibrilación espontánea y ondas positivas así como potenciales de unidad motora de gran amplitud. Pueden observarse potenciales de acción polifásicos de baja amplitud. En los casos más graves se encuentran potenciales de fibrilación, fasciculaciones ocasionales, una marcada disminución de las amplitudes motoras y signos de denervación y reinervación crónica. La velocidad de conducción de los nervios sensitivos y motores suele ser normal (Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1980; Hausmanowa-Petrusewicz 1988).

❖ **Biopsia muscular:**

Los cambios patológicos estudiados en las biopsias musculares de la AME tipo I y II son muy similares. Éstas se caracterizan por la presencia de grandes grupos de fibras atroficas intercaladas por fibras hipertróficas de tamaño 3 o 4 veces mayor que las fibras normales en proporción a la edad. La forma de estas fibras atroficas tiende a ser redondeada, a diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas que suelen ser fibras anguladas (**Figura 5A**). Muchos investigadores, clasifican estas fibras como fibras inmaduras o con aspecto fetal. Este rasgo tan peculiar de la AME sugiere que esta enfermedad pueda tener su inicio durante el desarrollo fetal. Normalmente este tipo de fibras atroficas se caracterizan histoquímicamente como fibras de tipo 1 y 2 (ver apartado 3.1), sin embargo las fibras más grandes muestran una uniformidad invariable de fibras tipo 1. En una tinción con ATPasa a pH 9.4 muchos grupos de fibras atroficas aparecen como fibras tipo 2, debido a la co-expresión de más de una isoforma de miosina (**Figura 5B**). La presencia constante de fibras hipertróficas sugiere que debe haber un mecanismo de compensación a la pérdida de funcionalidad de las fibras atroficas. De este modo, estas fibras más grandes son reinervadas por nuevas ramificaciones colaterales de axones cercanos supervivientes (o *sprouting*), intentando compensar la pérdida de función. Hay que considerar que el patrón de afectación de las fibras musculares no es homogéneo, y que la atrofia puede variar según las diferentes partes del músculo, pudiendo haber zonas sin afectación clara. De este modo, hay que tener en cuenta que si la muestra de una biopsia muscular es muy pequeña, podría haber regiones no afectadas lo que llevaría a un diagnóstico clínico erróneo.

El patrón histopatológico de las formas más leves de AME es más variable. Mientras que algunos casos pueden mostrar signos de denervación leves con fibras atroficas otros pueden mostrar signos patológicos difíciles de distinguir de otras miopatias y distrofias musculares. El diagnóstico de estos casos puede ser todavía

más difícil si además presentan niveles más elevados de creatina quinasa (Dubowitz and Sewry 2007).

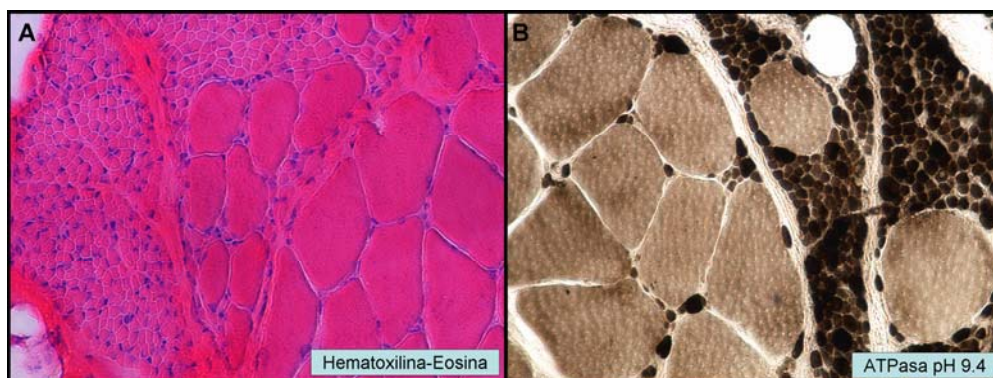


Figura 5. Histopatología de la AME. Biopsia muscular de una AME tipo 1. **A:** Tinción de hematoxilina-eosina. La fibras atróficas redondeadas muestran características de fibras inmaduras o fetales, al lado de un grupo de fibras hipertróficas. **B:** Tinción ATPasa pH 9.4. La mayoría de fibras hipertróficas son de tipo 1, mientras que las fibras atróficas aparecen como fibras de tipo 2, debido a la co-expresión de la forma de miosina neonatal.

❖ **Bioquímica:**

La creatina quinasa (CK o CPK) es una enzima que cataliza la producción de fosfocreatina a través de la fosforilación de una molécula de creatina, consumiendo una molécula de ATP en el proceso. En la miofibrilla, al inicio de la contracción muscular, la concentración de ADP aumenta a medida que disminuyen los niveles de ATP. En esta situación la enzima CK cataliza la reacción inversa, transfiriendo un radical fosforilo al ADP, restaurando rápidamente la concentración de ATP. Así, la fosfocreatina, por intermedio del ATP, constituye una reserva energética rápidamente utilizable por el músculo esquelético y otros tejidos.

La CK puede salir del interior de las miofibrillas de un músculo que está siendo afectado por algún proceso anormal y así mostrar niveles elevados en sangre.

En pacientes con AME la enzima CK puede estar ligera o moderadamente aumentada, aunque nunca se encuentra a niveles como los que se observan en las miopatías donde la destrucción es primaria en músculo. En las formas crónicas tipo

III/IV, un 25% de los pacientes pueden tener CK aumentadas a niveles que podrían hacer confundir el diagnóstico con las distrofias musculares (Rudnik-Schoneborn et al. 1998).

1.5. Seguimiento de la enfermedad

En pacientes AME tipo I, la supervivencia y el periodo con ventilación asistida, son las medidas más importantes para su seguimiento. Sin embargo, se han añadido otro tipo de medidas de funcionalidad motora (instrumentales) y biomarcadores (moleculares) para hacer el seguimiento de los pacientes AME menos graves, que ayudan a percibir los cambios durante el desarrollo de la enfermedad. Las medidas instrumentales incluyen electromiogramas específicos como el CMAP y MUNE, medidas de la fuerza muscular con miómetro de mano y escalas de función motora. Algunas de estas medidas están resumidas en la **Tabla 2** (Resumido en (Swoboda et al. 2005; Mercuri et al. 2012)).

Los biomarcadores moleculares disponibles para el seguimiento de la AME incluyen fundamentalmente la cuantificación de transcritos de RNA y de proteína SMN en sangre periférica. La metodología para obtener estas medidas es relativamente poco costosa. Sin embargo, hay mucha dispersión de resultados y eso hace difícil la interpretación de los valores obtenidos de SMN en sangre para que representen la de los tejidos diana de la enfermedad (médula espinal y músculo) o para correlacionarlo con el fenotipo (Sumner et al. 2006; Tiziano et al. 2011). Se están generando datos para la identificación de transcritos, proteínas y metabolitos que puedan ser útiles para aplicarse en ensayos clínicos ya sea farmacológicos o de nuevas terapias en fase de experimentación (Finkel et al. 2012).

Tabla 2: Medidas instrumentales y escalas utilizadas para el seguimiento de la AME

	Tipos de AME	Medidas
Estimación del número de unidades motoras (MUNE)	I, II y III	Función motora
Potencial de acción muscular compuesto (CMAP)	I, II y III	Función motora
Absorciometría dual de rayos X (DEXA)	II y III	Densidad mineral ósea
Miometría	II y III	Evaluación de la resistencia
Evaluación de la funcionalidad motora (MFM)	II y III	Escala funcional
Medida de la motricidad global (GMFM)	II y III	Escala funcional
Escala de Hammersmith (HFMS)	En silla de ruedas	Escala funcional
Escala de Hammersmith modificada	En silla de ruedas y ambulantes	Escala funcional con cambio de orden de los ítems para evitar la fatiga
Escala de Hammersmith ampliada	En silla de ruedas y ambulantes	Escala funcional con 15 ítems añadidos de la GMFM
Escala Egen Klassification (EK)	No ambulantes	Habilidades funcionales

1.6. Asesoramiento genético y diagnóstico prenatal y preimplantacional.

La AME es una de las enfermedades genéticas raras más comunes, con una frecuencia de portadores de 1/40-1/60. Teniendo en cuenta la gravedad de los síntomas de los pacientes afectados, es importante la identificación precoz de personas asintomáticas o portadores que puedan transmitir la enfermedad. El consejo genético en estos casos, tiene como objeto facilitar a los futuros padres con riesgo conocido de tener un hijo con AME, una adecuada información que les capacite para tomar decisiones acerca de las opciones reproductivas posibles, así como proporcionar apoyo psicológico durante dicho proceso.

El asesoramiento genético no se limita sólo a la mención de un riesgo de recurrencia. Incluye todo un proceso por el cual es posible asegurar que la familia conozca las implicaciones de la enfermedad, la forma en que se hereda, la probabilidad de que vuelva a aparecer y las alternativas que existen para que, disponiendo de todos estos conocimientos, se pueda elegir la opción más adecuada a cada persona o pareja.

De este modo, a parejas que han tenido hijos afectados con AME, se les ofrecen diferentes opciones reproductivas para evitar tener descendencia con la enfermedad. Éstas se basan en el diagnóstico prenatal y preimplantacional. Hay que tener en cuenta que estas opciones son aplicables cuando se ha hecho el estudio previo genético que confirme el estado de portadores de los padres y que facilitará la identificación de fetos o embriones afectados.

1.6.1. Diagnóstico prenatal

Teniendo en cuenta que el riesgo de recurrencia de la AME en familias portadoras es del 25%, es recomendable el diagnóstico prenatal a la madre una vez queda embarazada de forma natural. De este modo, se conocerá si el feto lleva alguna anomalía que pueda dar lugar a la enfermedad. El diagnóstico prenatal ofrece la oportunidad de tener hijos sanos restringiendo la opción del aborto terapéutico sólo a los casos de fetos afectados con AME. Para realizar este diagnóstico es necesario que la portadora disponga del estudio genético previamente realizado (Prior 2010).

La obtención de DNA fetal se realiza mediante biopsia de vellosidades coriónicas (BVC), por amniocentesis y por extracción de sangre a partir del cordón umbilical (**Figura 6**). La técnica de BVC consiste en la extirpación de un pequeño trozo de tejido placentario (villi). Se realiza con ayuda ecográfica entre las 10 y las 12 semanas de gestación y la vía de abordaje puede ser la abdominal o la transcervical

(vía vaginal), dependiendo de la localización placentaria y siempre bajo control ecográfico. Presenta la ventaja frente a la amniocentesis (14-16 semanas) de permitir un diagnóstico más precoz, de forma que, en caso de un feto afectado, se puede evitar una interrupción tardía de la gestación que implica un mayor riesgo de complicaciones y una mayor repercusión psicológica para la paciente. Para los casos en los que la amniocentesis no ha dado resultados claros, o para los que presentan un periodo de gestación avanzado (18-19 semanas) la siguiente alternativa sería la funiculocentesis. Es ésta una técnica prenatal invasiva que se basa en la extracción de una muestra de sangre fetal a partir del cordón umbilical. Con una parte de las muestras obtenidas también se puede realizar el cariotipo para excluir cualquier tipo de cromosomopatía. Una vez obtenido el resultado del diagnóstico de la muestra (tarda alrededor de 5-7 días), se deberá considerar la posibilidad de interrumpir voluntariamente el embarazo si el feto está afectado de AME, siempre con el consentimiento de la madre que quiera acogerse a esta posibilidad.

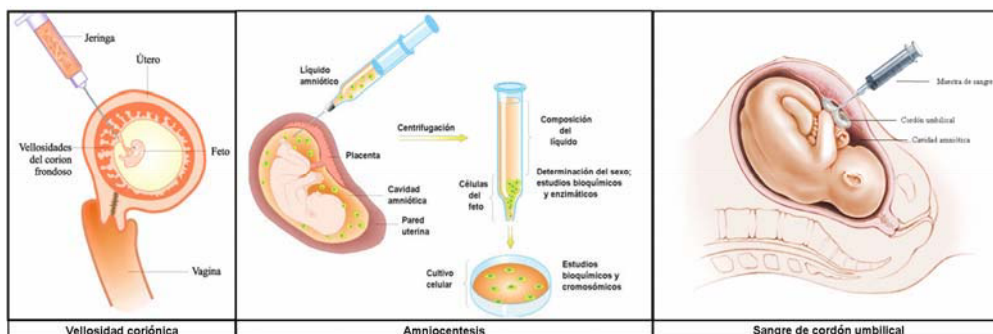


Figura 6: Esquema de la obtención de DNA fetal mediante biopsia de vellosidades coriónicas (BVC), por extracción de líquido amniótico y extracción de sangre de cordón umbilical.

La realización de esta tesis, se ha llevado a cabo mediante muestras obtenidas de casos de AME confirmados genéticamente, previo consentimiento informado de los padres (ver Anexo I). Debido a que la mayoría de diagnósticos prenatales se realizan mediante BVC, (alrededor de las 11 y 12 semanas de gestación) las

muestras obtenidas de tejido fetal para el estudio de la unión neuromuscular y su patología correspondían normalmente a las 12-15 semanas de gestación.

1.6.2. Diagnóstico genético preimplantacional (DGP)

El DGP consiste en la realización de un análisis genético en preembriones obtenidos por técnicas de fecundación *in Vitro* antes de ser transferidos al útero, lo que posibilita seleccionar aquellos embriones en los que no se detecte las anomalías homocigotas en el gen *SMN1*. El diagnóstico genético se realiza mediante la extracción de biopsias de células embrionarias cuyo tamaño puede variar según el número de días de desarrollo. Una biopsia entre el día 1 ó 2 permite la obtención del corpúsculo polar de la segunda división meiótica (con el mismo material genético que los embriones); una en el día 3 permite la obtención de una biopsia de 2 ó 3 células blastoméricas; y una en el día 5 ó 6 permite la obtención de hasta 5 células provenientes del trofoctoblasto. Cada biopsia plantea sus propias ventajas y riesgos.

Hay que tener presente que el DGP lleva inherentes inconvenientes propios de una fecundación *in vitro* como son el embarazo múltiple, el síndrome de hiperestimulación ovárica y las complicaciones de la punción ovárica (principalmente hemorragias o de infección tras la punción) (Swanson et al. 2007; Girardet et al. 2008).

1.7. Aspectos neuropatológicos

Debido a la dificultad para acceder a las muestras, muchos de los estudios neuropatológicos de la AME se han llevado a cabo mediante un número muy limitado de pacientes, y en grupos muy heterogéneos. La mayoría de estudios se han realizado en necropsias de pacientes tipo I, debido a su peor pronóstico y gravedad.

En nuestro laboratorio se ha seguido durante mucho tiempo la línea de investigación llevada a cabo durante el desarrollo prenatal de la enfermedad. Así pues dividiremos este apartado en aspectos neuropatológicos durante el desarrollo prenatal de la AME, y los hallazgos postnatales de biopsias musculares y material de autopsia.

1.7.1. Aspectos neuropatológicos prenatales

❖ **Médula espinal:** Los aspectos más importantes encontrados durante el desarrollo fetal AME son: incremento de células apoptóticas y alteraciones en el patrón de expresión de proteínas antiapoptóticas entre las 12 y 15 semanas de gestación (Soler-Botija et al. 2002); anomalías nucleares con signos de degeneración en las neuronas motoras a las 16 semanas e incremento de morfología apoptótica a las 16 e incluso a las 20 semanas gestacionales (**Figura 7A**) (Fidzianska and Rafalowska 2002). Las neuronas motoras que restan, sin embargo, son capaces de expresar colinacetyltransferasa (ChAT), sugiriendo que la función colinérgica de las neuronas motoras supervivientes, debe ser normal en este periodo fetal (Soler-Botija et al. 2005).

❖ **Músculo y unión neuromuscular:** Hasta la realización del presente trabajo de tesis no existían descripciones de las características del músculo y la unión neuromuscular en AME durante el desarrollo fetal. Las mismas serán expuestas en la sección de resultados y discusión.

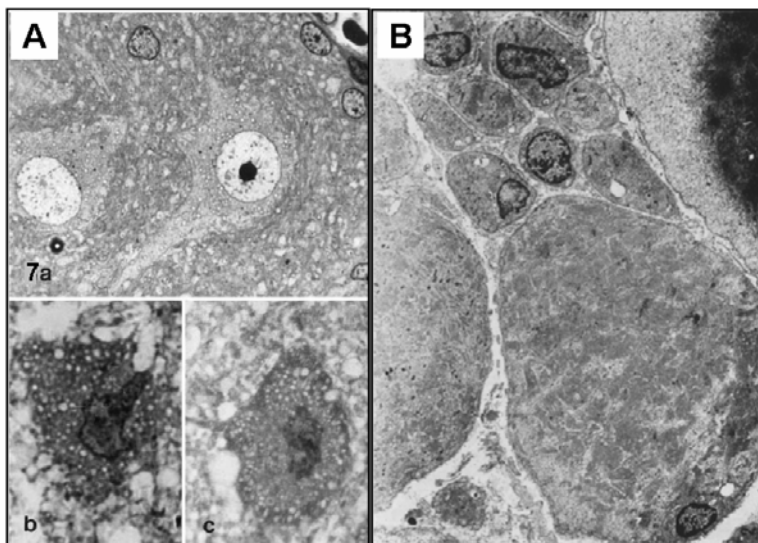


Figura 7: Microscopia electrónica de médula espinal fetal y músculo postnatal AME tipo I. **A:** Motoneuronas de un feto control a las 16 semanas de gestación (**7a**) con núcleo oval y cromatina bien distribuida comparada con las motoneuronas AME tipo I en el mismo periodo (**b y c**) con morfología anómala y gran densidad nucleoplasmática (extraído de (Fidzianska and Rafalowska 2002)). **B:** Fibras musculares postnatales AME de diferentes tamaños: una fibra hipertrófica con pérdida de miofibrillas y espacios subsarcolémicos rodeada de fibras más pequeñas con aspectos inmaduros, con núcleo central muy similar a la morfología de los mioblastos (extraído de (Fidzianska 1974)).

1.7.2. Aspectos neuropatológicos postnatales

En los pacientes con AME, se han encontrado defectos en todos los niveles de la unidad motora:

❖ **Médula espinal:** Entre los primeros cambios neuropatológicos que se describieron en la AME, la disminución del número de neuronas motoras ha sido el más destacado. Esta disminución puede ser debida a un aumento de la muerte celular programada (o apoptosis) de las neuronas motoras durante el desarrollo fetal (Soler-Botija et al. 2002), o bien a que esta apoptosis se prolongue en el tiempo (Simic et al. 2000). En las neuronas motoras remanentes había algunas con morfología normal aunque la gran mayoría presentaba núcleo excéntrico como signo incipiente de degeneración. Las neuronas más afectadas presentaban formas globulares y depósitos granulares de ubiquitina, acumulación de neurofilamentos

en la periferia del pericario y cromatolisis (Crawford and Pardo 1996; Simic 2008; Ito et al. 2011). También se describió atrofia axonal, inmadurez y pérdida selectiva de fibras mielinizadas; nervios con degeneración *walleriana* (desestructuración del axón) y nervios con paquetes poliaxiales rodeados de una única célula de Schwann (Fidzianska and Hausmanowa-Petrusewicz 1984). En algunos casos también se han encontrado neuronas motoras heterotópicas situadas en la zona ventral de la sustancia blanca y en las raíces ventrales; no tienen axones ni dendritas y aparecen hipercromáticas en tinciones de Nissl (Simic et al. 2008; Kuru et al. 2009).

❖ **Músculo:** El análisis morfológico del músculo esquelético de niños con AME muestra una predominancia de fibras extremadamente pequeñas con características fetales. Muchas de estas fibras muestran un solo núcleo central con estructuras bien preservadas. No muestran cambios inflamatorios. El estudio ultraestructural revela dos tipos de células musculares pequeñas: células con sarcoplasma bien organizado, estructura bien preservada y núcleo periférico y células inmaduras pequeñas, con forma oval y un único núcleo central parecidas a miotubos fetales. En algunos casos se pueden encontrar cuerpos apoptóticos en el citoplasma de fibras maduras e inmaduras. Las fibras hipertróficas no muestran cambios sustanciales en la estructura. A veces se puede encontrar pérdida de miofibrillas, dando lugar a una expansión del espacio intermiofibrilar y la formación de espacios vacíos debajo del sarcolema (Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1980; Fidzianska and Hausmanowa-Petrusewicz 1984; Fidzianska et al. 1990) (**Figura 7B**). En algunos casos también se puede hallar infiltración de tejido graso entre las fibras musculares (Kuru et al. 2009).

Además de los defectos estructurales y morfológicos de las fibras musculares, también se hallaron modificaciones en la expresión y distribución de proteínas específicas del músculo (**Tabla 3**) (Soussi-Yanicostas et al. 1992; Soubrouillard et al. 1995; Stathas et al. 2008).

Tabla 3: Características de las fibras atroficas (FA) e hipertróficas (FH) en la AME postnatal. Distribución de la expresión de los distintos tipos de miosina: rápida (MHCf), lenta (MHCs) y del desarrollo (MHCd); de desmina, vimentina y NCAM.

FIBRAS ATRÓFICAS	FIBRAS HIPERTRÓFICAS
Distribución: Agrupadas	Distribución: Dispersas
Fibras tipo I y II	Predominancia de fibras tipo I
Las FA tipo I disminuyen con la edad mientras que las tipo II aumentan	Las FH disminuyen con la edad
FA tipo I → MHCs + MHCf FA tipo II → MHCd + MHCf	FH tipo I → MHCs FH tipo II → MHCs + MHCf
Acumulación subsarcolémica de desmina en FA tipo II	Acumulación subsarcolémica de desmina difusa en FH tipo I
Expresión de vimentina en FA tipo II	No expresión de vimentina
Positivas para NCAM	Negativas para NCAM

❖ **Unión neuromuscular:** Coërs and Wolf en 1959 fueron los primeros en describir las características de las terminaciones nerviosas en diferentes biopsias musculares de pacientes con AME tipo I. En estas muestras encontraron nervios intramusculares en forma de “collar de perlas”, es decir, con hinchazones a lo largo del axón (*swellings*). Finalmente, las fibras nerviosas con estos *swellings* se ramifican dando lugar a terminaciones diminutas que inervan las fibras musculares. Las placas motoras se encuentran poco desarrolladas. En los grupos de fibras hipertróficas, se pueden hallar reinervaciones con *sprouts* colaterales. El aparato postsináptico, aunque con apariencia normal, tiene características más sencillas, debido probablemente al proceso de degeneración nervioso (Coers and Woolf 1959).

En estudios más recientes realizados con técnicas más modernas, se ha descrito una acumulación anómala de neurofilamento en terminales nerviosos finos y poco ramificados. Las placas motoras se caracterizaban por ser pequeñas y poco desarrolladas (Kariya et al. 2008).

❖ **Patología en otros tejidos:** Además de las neuronas motoras de la médula espinal, se han descrito hallazgos neuropatológicos en otras células y estructuras del sistema nervioso central. Los mismos incluyen cromatolisis de las neuronas sensoriales y de los nódulos de Nageotte en los ganglios de la raíz dorsal, además de fibras sensoriales degenerativas en el nervio sural. Neuronas cromatolíticas se han descrito también en la columna de Clarke y en los núcleos geniculados lateral y posteroventral del tálamo (Marshall and Duchon 1975; Peress et al. 1986; Murayama et al. 1991). Se postula que el sistema nervioso autónomo también juega un papel importante en las formas graves dado que existen casos de muerte súbita, trastornos de conducción cardíaca, excesiva sudoración y alteraciones en la perfusión de las extremidades. Las formas más graves de la enfermedad también se han asociado con cardiopatías congénitas, fracturas óseas, anomalías vasculares y defectos pancreáticos. Sin embargo no existen casuísticas anatomopatológicas amplias y la aportación de más casos sería de gran ayuda para una mejor comprensión del papel de los diferentes órganos en el desarrollo de la enfermedad (Shanmugarajan et al. 2007; Rudnik-Schoneborn et al. 2008; Kuru et al. 2009; Rudnik-Schoneborn et al. 2010; Bowerman et al. 2012).

1.8. Tratamiento de la AME: Aproximaciones terapéuticas

Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo para la cura de la AME. Sin embargo, es posible mejorar la calidad de vida de los pacientes mediante cuidados paliativos. Hay que tener en cuenta el seguimiento de la función pulmonar y las interurrencias infecciosas, la adecuada nutrición y los cuidados ortopédicos. Las enfermedades pulmonares son la mayor causa de mortalidad en

los AME tipo I y II. Los fallos respiratorios son causados por espiración y fallo de los músculos intercostales. Y pueden tener episodios recurrentes de infecciones bronquiales, seguidos de hipoventilaciones nocturnas. En el año 2007, se realizó un cuestionario que reunió mas de 60 expertos en AME dando lugar a un comunicado con guías sobre los cuidados que se deben seguir en los pacientes AME (Wang et al. 2007). De este modo, de acuerdo con el tipo de AME, habrá que considerar el manejo de aspectos fundamentales para el cuidado de estos pacientes:

- **AME tipo I:** Adecuada rehabilitación, soporte nutricional, manejo de las secreciones y mejora de la tos (por rehabilitación o de manera artificial con aparatos especiales) y apoyo respiratorio no invasivo.
- **AME tipo II:** Las consideraciones para la AME tipo I también pueden considerarse para este tipo. Debe tenerse en cuenta que la escoliosis es una complicación agregada y las medidas de rehabilitación y la cirugía específica pueden mejorar las condiciones respiratorias y la calidad de vida de los pacientes.
- **AME tipo III:** En aquellos pacientes que han perdido la capacidad de deambulación y están confinados a silla de ruedas, las medidas de seguimiento se asemejan a las de los pacientes tipo II. Los pacientes que caminan pueden beneficiarse de actividades suaves como la natación y el ejercicio leve (Tizzano 2010).

1.8.1. Estrategias terapéuticas

El hecho de que la AME no tenga aún ninguna cura efectiva, ha dado lugar al desarrollo de diferentes enfoques terapéuticos para identificar posibles tratamientos eficaces contra la enfermedad, o en su defecto, para disminuir sus efectos. Por un lado, los basados en el aumento de la expresión de la proteína SMN

(farmacológicos y terapia génica) y los neuroprotectores basados en la prevención de la muerte de las neuronas motoras (farmacológicos y terapia con células madre). Algunas de estas estrategias terapéuticas han sido o están siendo probadas en ensayos clínicos con humanos (Sumner 2006; Sendtner 2010; Stavarachi et al. 2010; Kolb and Kissel 2011).

1.8.1.1. Terapia farmacológica:

El hecho de que todos los pacientes AME tengan al menos una copia de *SMN2*, hace que muchas investigaciones se dirijan a la idea de aumentar la transcripción de *SMN2* mediante la activación del promotor, favorecer la inclusión del exón 7 en los transcritos del mRNA de *SMN2*, modular la traducción de la proteína SMN y prevenir su degradación.

❖ Incremento de transcritos *FL-SMN* por activación del promotor de *SMN2*:

En los últimos años se ha trabajado con muchos compuestos para intentar incrementar los niveles de transcritos *FL-SMN* procedentes del gen *SMN2* (*FL-SMN2*). De estos compuestos cabe destacar los inhibidores de las histona-deacetilasas (HDAC) por su amplia representación. En 2005, Kernochan *et al* demostraron que el promotor de *SMN* estaba asociado con las HDAC 1 y 2 que modulaban la acetilación de las histonas y determinaban la expresión génica de *SMN2* (Kernochan et al. 2005). La acetilación de las histonas, es un mecanismo epigenético que regula la expresión génica. Cuando las histonas están acetiladas en el centro de la cromatina, éstas pasan a tener una estructura más relajada convirtiéndose en una región más activa debido a la gran accesibilidad de la maquinaria transcripcional al DNA. El grado de acetilación de las histonas depende tanto de la actividad de las histona-acetiltransferasas como de las HDACs. De este modo, los inhibidores de las HDACs se propusieron como posibles candidatos para incrementar los niveles de *FL-SMN2*.

Se han descrito experimentos tanto *in vitro*, con células de pacientes, como *in vivo* en modelos animales de AME, empleando inhibidores de las HDACs como el butirato de sodio, el fenilbutirato, ácido valproico, el SAHA y la tricostatina entre otros, con resultados muy prometedores. Los ensayos clínicos realizados en pacientes AME con fenilbutirato y ácido valproico no han demostrado todavía ningún efecto categórico (Brahe et al. 2005; Brichta et al. 2006; Swoboda et al. 2009; Also-Rallo et al. 2011).

❖ **Inclusión del exón 7 de *SMN2***

Una terapia alternativa al aumento de expresión de *FL-SMN* es favorecer la inclusión del exón 7 en la transcripción final de *SMN2* y de este modo, aumentar la expresión de proteína SMN funcional. Los primeros trabajos publicados se llevaron a cabo mediante aclarubicina, un compuesto quimioterápico utilizado para el tratamiento de tumores sólidos y leucemia (Andreassi et al. 2001). Este compuesto incrementaba los niveles de SMN en fibroblastos derivados de pacientes AME tipo I; sin embargo, el perfil de toxicidad a largo plazo era tan elevado que su uso ha sido excluido para el tratamiento de la enfermedad. Otro compuesto es la hidroxurea, utilizada para el tratamiento de la anemia de células falciformes para inducir la expresión de la hemoglobina fetal mediante la estimulación de factores de *splicing* (Grzeschik et al. 2005). Los ensayos clínicos realizados en casi 60 pacientes con AME tampoco demostraron beneficios claros en el progreso de la enfermedad (Liang et al. 2008; Chen et al. 2010).

Una nueva estrategia para la inclusión del exón 7 se basa en el uso de oligonucleótidos anti-sentido (ASOs). Estas pequeñas moléculas de RNA están diseñadas para unirse a secuencias complementarias de un intrón o un exón, resultando un incremento o una inhibición en el proceso de *splicing*. Se han generado numerosos reguladores del *splicing* dirigidos para incrementar los niveles de proteína SMN, incluyendo RNAs bifuncionales (Dickson et al. 2008) y RNAs

trans-splicing (Coady et al. 2008; Coady and Lorson 2010). Estos oligonucleótidos se administrarían por vía intratecal hasta que se desarrollen moléculas que atraviesen la barrera hematoencefálica.

❖ **Estabilización de la proteína SMN**

Uno de los primeros compuestos publicados como estabilizadores de la proteína SMN, actuando a nivel traduccional, fue el indoprofen. Este compuesto aumentaba los niveles de SMN tanto en cultivos celulares de fibroblastos como en ratones AME (Lunn et al. 2004). Otros estabilizadores de SMN también son los aminoglicosidos. Esta clase de antibióticos, tienen la capacidad de suprimir mutaciones stop prematuras en algunos genes, de forma que durante la traducción de la proteína SMN Δ 7, la maquinaria se saltaría el stop prematuro localizado en el exón 8, alargando y estabilizando la proteína en el extremo C-terminal (Mattis et al. 2006). Se cree que además de estabilizar las proteínas SMN Δ 7, éstas a la vez también podrían ayudar a estabilizar los bajos niveles de FL-SMN. Sin embargo, el hecho de que estos fármacos aumenten la presencia de SMN en citoplasma y gems nucleares, no significa que restaure todas las funciones necesarias en las neuronas motoras.

❖ **Neuroprotectores**

Otro objetivo importante en el tratamiento de la AME, es la identificación de compuestos neuroprotectores para prevenir la degeneración y muerte de las neuronas motoras. La cardiotrofina-1 es una citoquina de la familia de las interleuquinas que tiene efectos beneficiosos probados para la supervivencia de las neuronas motoras durante el desarrollo embrionario de ratones (Lesbordes et al. 2003).

Debido a la vulnerabilidad que algunas neuronas motoras pueden tener a un incremento de estrés oxidativo, otros agentes neuroprotectores usados en ensayos

clínicos han sido los factores con acción anti-glutamatérgica como la gabapentina y el riluzol. Los estudios hechos con el primer compuesto no reflejaron ningún efecto terapéutico potencial importante (Miller et al. 2001; Merlini et al. 2003). En los ensayos hechos con riluzol, aunque concluyeron que era seguro para los niños con AME, necesitaban un mayor potencial estadístico para asegurar los efectos beneficiosos de este fármaco (Russman et al. 2003).

❖ **Fuerza muscular**

Además de los agentes neuroprotectores, se están identificando nuevas terapias para prevenir o calmar el desgaste y la atrofia muscular que sucede en la AME. En esta línea, se han demostrado los efectos positivos de agentes anabólicos como el albuterol (o salbutamol). Aunque los resultados mostraron un incremento modesto en la fuerza muscular y en la capacidad vital pulmonar, son necesarios más estudios para controlar los efectos secundarios de este tratamiento a largo plazo (Kinali et al. 2002; Pane et al. 2008). El salbutamol también parece aumentar la cantidad de *FL-SMN* (Angelozzi et al. 2008) y su efecto está siendo evaluado en ensayos terapéuticos (Tiziano et al. 2010). La folistatina, también ha sido descrita como un agente anabólico que incrementa la masa muscular y mejora la función motora de ratones AME (Rose et al. 2009).

La L-carnitina es un cofactor esencial responsable del transporte de ácidos grasos al interior de las mitocondrias para su utilización energética. Uno de los aspectos más interesantes de esta sustancia es que está disminuida en el músculo denervado y que esto podría ser secundario a algún defecto oxidativo del metabolismo muscular asociado con la AME (Tein et al. 1995). Los ensayos realizados en pacientes AME con L-carnitina no aportaron datos categóricos de un posible beneficio en su administración. Esta molécula también se utilizó como suplemento en la terapia con ácido valproico y su administración conjunta tampoco dejó claro que produjera beneficios en pacientes AME (Kissel et al. 2011).

1.8.1.2. Terapia génica

La estrategia terapéutica más directa para el tratamiento de la AME, sería la corrección de su causa, es decir, el reemplazo del gen *SMN1* anómalo. Investigaciones recientes han conseguido rescatar fenotipos graves de ratones AME usando el serotipo 9 de vectores virales adeno-asociados (AAV9) con el gen *SMN1*. El resultado fue muy prometedor, ya que el 60% de las neuronas motoras de la médula espinal expresaban *SMN1*, y corrigieron la función motora y muscular de los ratones. Una observación que hay que tener en cuenta, es que estos ensayos se llevaron a cabo en el día 1 postnatal del ratón, ya que si se hacía en periodos más avanzados, tenían efectos muy bajos o ausentes. Por lo que este tipo de terapia basado en el incremento de expresión de *SMN1* debería coordinarse en etapas muy tempranas de la enfermedad, o incluso antes de desarrollar síntomas clínicos (Foust et al. 2010). Los últimos estudios basados en AAV se han realizado en animales superiores (cerdos y primates), demostrando que estas partículas víricas son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y llegar hasta las neuronas motoras (Bevan et al. 2011; Dominguez et al. 2011). Después de esta demostración, el siguiente paso ha sido la creación de un modelo de cerdo AME usando inyecciones intratecales de AAV que expresan shRNA (*small hairpin RNA*) con diana al mRNA de *Smn* (resultados presentados por el laboratorio de Arthur Burghes en la conferencia anual de atrofia muscular espinal en Minneapolis “*The 16th Annual SMA Research Group Meeting, 2012*”).

1.8.1.3. Terapia celular

El trasplante de células madre embrionarias (ESC) es una terapia muy prometedora ya que puede mejorar la enfermedad a partir de diferentes mecanismos: el reemplazo de células no-neuronales, el aumento de factores neuroprotectores o la reducción de compuestos neurotóxicos. El uso de ESC en

modelos animales de AME, ha dado lugar a una mejora del fenotipo de la enfermedad (Corti et al. 2008; Corti et al. 2010). Este tipo de terapias están siendo probadas en ensayos clínicos con pacientes con ELA, y se basan en una serie de inyecciones intraespinales de ESC en la zona lumbar, repartidas en diferentes fases de la enfermedad (Glass et al. 2012; Riley et al. 2012).

Otra clase de células pluripotenciales son las células madre inducidas (iPSCs). La ventaja de este modelo es que se generan a partir de células de fibroblastos de los propios pacientes, descartando los posibles dilemas éticos sobre la utilización de células madre embrionarias. La generación de iPSCs y su diferenciación a neuronas motoras, es un modelo que está siendo muy utilizado para la investigación de la patología de la AME, y para estudiar posibles nuevas estrategias terapéuticas en la enfermedad (Ebert et al. 2009).

1.8.1.4. Otras medidas terapéuticas

Aunque las intervenciones farmacológicas y la terapia génica o con células madre generan una gran esperanza y optimismo a las familias de AME, existen otras estrategias para mejorar la calidad de vida del paciente. El ejercicio moderado puede ayudar a los pacientes a disminuir la formación de contracturas, a promover el buen desarrollo de las caderas, aumentar la densidad ósea, promover la motilidad de los intestinos, y generar una sensación de bienestar general. Las intervenciones nutricionales proactivas, el soporte respiratorio y la rehabilitación también son de gran importancia para la autorrealización de todos los pacientes y mejorar su calidad de vida hasta que se pueda identificar una terapia efectiva contra esta devastadora enfermedad.

2. Modelos animales de AME

Con el descubrimiento del gen *SMN*, se han desarrollado diferentes modelos animales que siguen muchos de los síntomas patológicos y electrofisiológicos vistos en los pacientes AME, siendo de este modo, modelos a seguir para poder desarrollar posibles estrategias terapéuticas, y para poder descubrir más a fondo la función de la proteína SMN y el porqué de su gran afectación en neuronas motoras.

Debido a la gran conservación del gen *SMN* en la evolución, los efectos de la delección de éste se han desarrollado en diferentes organismos, incluyendo *Caenorhabditis elegans* (nematodos) (Briese et al. 2009; Sleigh et al. 2011), *Drosophila Melanogaster* (moscas) (Chan et al. 2003; Chang et al. 2008), *Danio Rerio* (pez zebra) (McWhorter et al. 2003; Boon et al. 2009) y *Mus musculus* (ratón) (Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000; Le et al. 2005). Sin embargo debido a la gran importancia de la organización de la unión neuromuscular y de su función, los modelos murinos son los que han podido ayudar a responder mejor las cuestiones sobre la función biológica del gen *SMN* en el sistema nervioso y en la patogénesis de la AME.

Dado que los modelos de ratón no tienen gen *SMN2* nativo, la delección homocigota del gen *smn* murino resulta letal para estos animales. Para poder reproducir la situación genética de pacientes AME, y probar la hipótesis de que el gen *SMN2* es un modificador de la enfermedad, diferentes grupos han desarrollado modelos de ratón transgénicos que contienen íntegro el locus *SMN2* humano. Estos modelos han posibilitado el estudio de la patogénesis de la AME dando lugar a modelos viables con diferentes fenotipos.

El gen *Smn* murino produce transcritos completos, como el gen *SMN1* humano. La delección homocigota del exón 2 o 7 de este gen (*Smn*^{-/-}), genera la inactivación de

la proteína Smn y resulta letal en el estadio embrionario. Por otro lado, los ratones heterocigotos ($Smn^{+/-}$) tienen una vida media normal sin grandes defectos. Esta gran diferencia entre los fenotipos letales y los normales, conllevó a la generación de modelos transgénicos basados en la manipulación de la dosis de SMN, añadiendo el *SMN2* humano en un ratón sin Smn ($Smn^{-/-}$). Estos modelos intentan imitar los genotipos AME humanos, de forma que con la introducción de una o varias copias de *SMN2* se crean diferentes fenotipos según el grado de severidad de la enfermedad (**resumen en Tabla 4**). En estos modelos, las mayores consideraciones fenotípicas son la afectación de las neuronas motoras y la reducción de la funcionalidad motora. De esta forma, los estudios de neuronas motoras en médula espinal de los diferentes modelos AME de ratón, han mostrado la pérdida de éstas a medida que progresa la enfermedad. Esta pérdida parece estar asociada a un estadio final de la enfermedad, en lugar de ser un defecto inicial de la patología. De este modo las investigaciones se centraron en la patología de la unión neuromuscular. En muchos de estos modelos se encontraron defectos como: la acumulación de neurofilamento en los terminales presinápticos, falta de maduración y desorganización de los receptores de acetilcolina (AChRs) del aparato postsináptico, reducción de la liberación de vesículas sinápticas, regulación a la baja de proteínas presinápticas, simplificación del aparato postsináptico y ramificaciones axonales aisladas en las uniones neuromusculares (NMJs) (Cifuentes-Díaz et al. 2002; Kariya et al. 2008; McGovern et al. 2008; Murray et al. 2008; Kong et al. 2009; Dachs et al. 2011; Torres-Benito et al. 2011; Ling et al. 2012). Estos defectos neuropatológicos, son indicativos de axonopatía, denervación y disfunción de la unión neuromuscular. La desorganización del aparato postsináptico además es indicativo del fallo en la maduración de la NMJ en la AME (Park et al. 2010; Sleight et al. 2011; Torres-Benito et al. 2011; Bebee et al. 2012).

Estos modelos murinos de AME recapitulan la pérdida de neuronas motoras, una de las características más importantes de la enfermedad. Por eso, los estudios con

animales son herramientas imprescindibles para valorar la progresión de la enfermedad, y poder encontrar posibles estrategias terapéuticas. La caracterización de los defectos neuropatológicos encontrados en ratones, han ayudado a entender mejor la fisiopatología de la enfermedad y su progresión en pacientes con AME. Sin embargo las diferencias en el desarrollo con la especie humana y los distintos *backgrounds* genéticos de estos animales hacen que todos estos modelos mimeticen aspectos parciales de la enfermedad y que aparezcan otros menos característicos en humanos. Esto prioriza el estudio del desarrollo de la enfermedad en pacientes AME para determinar qué aspectos de los modelos animales pueden ser aplicados a la patología humana.

Tabla 4. Modelos murinos de AME (adaptado de (Sleigh et al. 2011) y (Beebe et al. 2012))			
Genotipo	Severidad *	Características	Referencias
<i>Smn</i> ^{-/-}	++++	Muerte del embrión antes de la implantación uterina.	(Schrank et al. 1997)
<i>Smn</i> ^{+/-}	+	Perdida temprana de neuronas motoras en la médula espinal lumbar. Vida media: normal	(Jablonka et al. 2000; Balabanian et al. 2007)
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> (2Hu <i>ng</i>) ^{+/+}	+ a +++	La inclusión de los transgenes humanos <i>SMN2</i> , <i>SERF1</i> y parte del <i>NAIP</i> rescata la letalidad embrionaria de <i>Smn</i> ^{-/-} ; El número de copias de los transgenes se correlaciona con la severidad de la enfermedad dentro de un rango de muerte de entre una semana hasta la supervivencia normal.	(Hsieh-Li et al. 2000)
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> (89A <i>hmb</i>) ^{+/+}	+ a +++	Los transgenes que contienen solo el locus <i>SMN2</i> rescatan la letalidad embrionaria de <i>Smn</i> ^{-/-} . 42 de los 56 ratones con una o dos copias transgénicas nacieron muertos o murieron antes de las 6 horas, el resto murieron entre los 4-6 días. Los ratones con ocho copias del transgén alcanzaron la vida adulta.	(Monani et al. 2000)
<i>Smn</i> ^{F7/Δ7} ;NS <i>E-Cre</i> ⁺	++	Ratones <i>Smn</i> ^{F7/Δ7} con <i>Cre-loxP</i> , que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en tejido neuronal. Vida media: 25 días.	(Frugier et al. 2000; Cifuentes-Diaz et al. 2002)
<i>Smn</i> ^{F7/Δ7} ;HS <i>A-Cre</i> ⁺	++	Ratones <i>Smn</i> ^{F7/Δ7} con <i>Cre-loxP</i> que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en mioblastos y miotubos del músculo esquelético. Vida media: 33 días.	(Cifuentes-Diaz et al. 2001)
<i>Smn</i> ^{+/-} ; <i>Gemin2</i> ^{+/-}	+	Ratones con delección heterocigota de <i>Smn</i> y <i>Gemin2</i> manifiestan una pérdida acelerada de neuronas motoras en comparación con los ratones <i>Smn</i> ^{+/-} .	(Jablonka et al. 2002)
<i>Smn</i> ^{-/-} ; <i>SMN2</i> (89A <i>hmb</i>) ^{+/+} ; <i>SMN1</i> (A2 <i>G</i>) ^{+/+}	+	La vida media de ratones con una copia del transgén A2G y una copia de <i>SMN2</i> es de 227 días, mientras que los homocigotos de A2G son casi indistinguibles de los controles.	(Monani et al. 2003)

<i>Smn</i>^{F7/F7}; HSA-Cre⁺	+	Ratones <i>Smn</i> ^{F7/F7} con Cre- <i>loxP</i> que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en mioblastos y miotubos del músculo esquelético. Sin la delección heterocigota del exón 7 de <i>Smn</i> en células somáticas, los animales sobreviven una media de 8 meses.	(Nicole et al. 2003)
<i>Smn</i>^{F7/F7}; NSE-Cre⁺	++	Ratones <i>Smn</i> ^{F7/F7} con Cre- <i>loxP</i> , que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en tejido neuronal. Vida media: 31±2 días.	(Ferri et al. 2004)
<i>Smn</i>^{F7/Δ7}; Alfp-Cre⁺	++++	Ratones <i>Smn</i> ^{F7/F7} con Cre- <i>loxP</i> , que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en hepatocitos. Causa letalidad embrionaria a E18. La delección heterocigota no causa efectos obvios.	(Vitte et al. 2004)
<i>Smn</i>^{-/-}; ;SMN2(89A hmb)^{+/-};SMNΔ7^{+/-}	+++	El transgén con SMNΔ7 humano, mejora el fenotipo <i>Smn</i> ^{-/-} ;SMN2 ^{+/-} . Vida media: 13.3±0.3 días.	(Le et al. 2005)
<i>Smn</i>^{+/-}; SMN2^{+/-};SMN1(A111 G)^{+/-}	+	Transgén que contiene el alelo SMN1 de pacientes AME tipo I y tipo II; aumenta la supervivencia hasta 1 año sin fenotipo obvio.	(Workman et al. 2009)
<i>Smn</i>^{-/-}; SMN2^{+/-};SMN1(VDQ NQKE)^{+/-}	+++	Transgén que contiene los exones 1-6 de gen SMN1; tiene pocos efectos en la extensión de vida media.	(Workman et al. 2009)
<i>Smn</i>^{28/-}	++	Transgén <i>Smn</i> con tres sustituciones nucleotídicas en el <i>exonic splicing enhancer</i> del exon 7. Vida media: 28 días.	(Bowerman et al. 2009)
<i>Smn</i>^{-/-}; SMN2(N11)^{+/-}; ;SMN2(N46)^{+/-}	+++	Se generaron ratones con tres copias de SMN2 cruzando cepas de ratones con dos y cuatro copias. Vida media: 15.2±0.4 días.	(Michaud et al. 2010)
<i>Smn</i>^{F7/-}; ;SMN2(89A hmb)^{+/-};Olig2-Cre⁺	+	<i>Smn</i> ^{+/-} ;SMN2 ^{+/-} con Cre- <i>loxP</i> , que media la delección específica del exón 7 del <i>Smn</i> en las células progenitoras de la neuronas motoras de la médula espinal. Aproximadamente el 70% de los mutantes sobreviven hasta los 12 meses, sin embargo se podían distinguir bien de los controles.	(Park et al. 2010)
<i>Smn1</i>^{tm1Cdid}/ <i>tm1Cdid</i>; Cre^{Esr1} and <i>Smn1</i>^{tm2Cdid}/ <i>tm2Cdid</i>;Cre^{Esr1}₁	++++	Alelos de <i>Smn</i> inducibles, que imitan el splicing del gen SMN2 humano, son letales embrionarios cuando son homocigotos (a E12.5-E15.5) y normales cuando son heterocigotos. En presencia de Cre recombinasa, los genes loxP –flanqueados resistentes a neomicina situados en el intrón 7 de <i>Smn</i> se eliminan, produciendo <i>Smn</i> full-length. Al cruzarse con un alelo inducible con tamoxifeno, la inducción de <i>Smn</i> full-length por tamoxifeno en embriones, rescata la letalidad embrionaria.	(Hammond et al. 2010)

*+=leve; ++=moderado; +++=grave; ++++=letal embrionario; NSE= Neuron Specific Enolase gene; HSA= Human Alfa Skeletal Actin

3. Músculo, inervación y unión neuromuscular durante el desarrollo humano

3.1. El Músculo:

3.1.1. Diferenciación histológica

El músculo esquelético está constituido principalmente por fibras musculares que son células multinucleadas de origen mesodérmico. Las primeras células que se forman en el tejido muscular son los mioblastos, que tienen la capacidad de dividirse y fusionarse formando miotubos con núcleos centralizados. Existen miotubos primarios y secundarios, que se diferencian según su aparición temporal y su histología. La función principal de los miotubos primarios en desarrollo sería la alineación de las fibras en cada músculo a las que luego se alinean un mayor número de miotubos secundarios. Así los miotubos primarios son los primeros en ser observados en pequeños grupos. Los secundarios aparecen 2 o 3 días después de que los primarios alcancen su número más alto, y se forman mediante la fusión de mioblastos que permanecen adyacentes a los miotubos primarios, compartiendo la misma lámina basal y siendo típicamente más pequeños en diámetro que los primarios (**Figura 8**). Algunos mioblastos, permanecen sin fusionarse en la periferia de los miotubos compartiendo la misma lámina basal, pero separados por sus membranas plasmáticas. Estas células corresponderán a las células satélite, consideradas como mioblastos latentes ya que se pueden activar en circunstancias normales y patológicas y dar lugar a nuevas fibras musculares. A lo largo de la diferenciación, los miotubos se vuelven más ricos en miofibrillas y sus núcleos migran a la periferia. La maduración de estas células dan lugar a la formación de fibras musculares adultas, cuyo citoplasma está ocupado en su gran mayoría por miofibrillas y cuyos núcleos son la mayoría periféricos (Engel 2004).

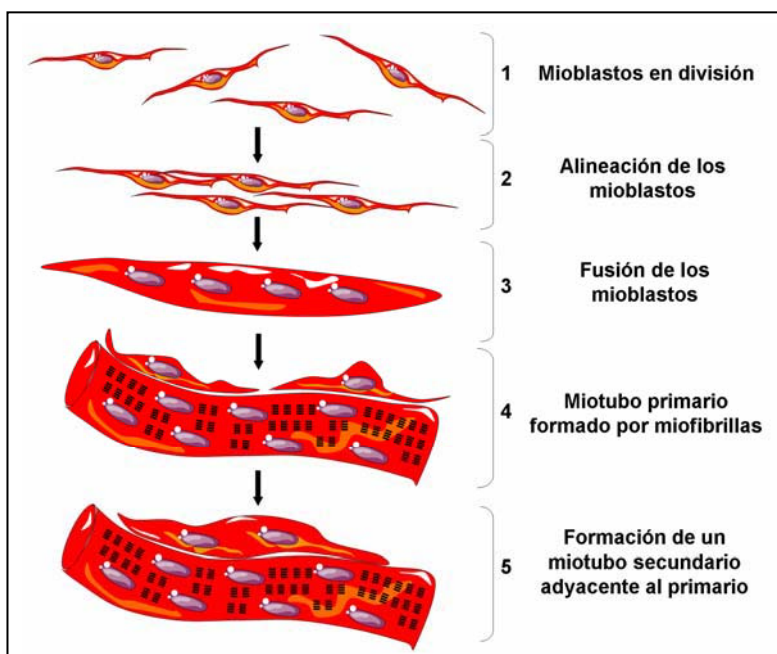


Figura 8: Esquema de la diferenciación muscular.

Las fibras musculares se diferencian según su función contráctil dando lugar principalmente a dos tipos: lentas o tipo I y rápidas o tipo II. Cada tipo de fibra sintetiza tanto enzimas implicadas en el metabolismo como proteínas reguladoras que actúan conjuntamente para mantener su fenotipo lento o rápido. La nomenclatura genérica que más se ha usado para la clasificación de estas fibras musculares está basada en la tinción adenosin trifosfatasa (ATPasa) según el grado de resistencia de las fibras a medios ácidos o básicos. Las fibras lentas o tipo I, tienen una coloración rojiza, debido a su alto contenido en mioglobina, proteína que participa en la difusión del oxígeno al interior del músculo. Tienen una elevada densidad de capilares y muchas mitocondrias. Este tipo de fibra utiliza principalmente sustratos que capta de la sangre y a través del metabolismo oxidativo los metaboliza hasta obtener energía. Por este motivo, tras su estimulación, la contracción se produce de manera lenta. Este tipo de fibras son

especialmente importantes para realizar ejercicios sostenidos y de resistencia como caminar o trotar largas distancias.

Las fibras rápidas o tipo II, son de color blanco y tienen un bajo contenido en mioglobina. Estas fibras tienen menos mitocondrias y están dotadas de toda la maquinaria necesaria para realizar glucólisis anaeróbica. Su principal sustrato para la glucólisis es la glucosa 6-fosfato producida por la degradación de las reservas de glucógeno dentro de cada una de las células. La secuencia de degradación de glucógeno y de generación de energía a través de la glucólisis puede ser extremadamente veloz, por eso pueden contraerse de manera rápida. Como dependen de sus reservas de sustrato, no pueden mantener la actividad durante mucho tiempo. Por lo tanto, son particularmente importantes en la generación de trabajo muscular durante períodos cortos de tiempo, como el que se requiere en un *sprint*. Existen algunos tipos intermedios de fibras musculares, como las tipo IIA que tienen una contracción rápida, oxidativas glucolíticas, y que son diferentes del tipo IIB, fibras muy rápidas, anaeróbicas glucolíticas. Existe una tercera clasificación de fibras, llamadas fibras IIC que pertenecería a las fibras inmaduras.

Cada tipo de fibra está compuesta por diferentes isoformas de proteínas estructurales, particularmente la isoforma de la cadena pesada de la miosina (*Myosin Heavy Chain*, MHC). Esta característica también se usa para clasificar los tipos de fibras musculares mediante anticuerpos específicos contra las diferentes isoformas: MHC lenta, MHC rápida, MHC embrionaria y MHC neonatal (Dubowitz and Sewry 2007). Esta metodología, a diferencia de la ATPasa, permite distinguir fibras híbridas con más de una isoforma de miosina, fibras inmaduras o con signos de regeneración y tipificar las fibras en músculo postmortem (ya que la actividad ATPasa se puede perder en estos casos).

3.1.2. Las células satélite

Las células satélite (SCs) son la mayor fuente de células miogénicas en el músculo adulto. Estas células proliferan cuando se producen traumas musculares y en situaciones de excesivo uso muscular, formando nuevas miofibras mediante un proceso equivalente a la miogénesis embrionaria.

Durante la formación de miotubos primarios y secundarios en el proceso de miogénesis, las SCs permanecen adheridas a los miotubos compartiendo una misma lámina basal. Las SCs proliferan en etapas tempranas del desarrollo y más tarde, se retiran del ciclo celular y permanecen quiescentes.

Estas células, aunque siempre se encuentran bajo la lámina basal, durante el desarrollo se pueden encontrar adheridas a las células miogénicas antes de que se forme ésta. Además, tienen la capacidad de migrar cruzando la lámina basal bajo una variedad de condiciones experimentales. Cuando se produce un daño muscular, las SCs pueden recorrer largas distancias bajo la lámina basal, dejar la miofibra, y migrar por el músculo y pasar incluso, a células musculares adyacentes. El factor de transcripción Pax7 es el marcador más específico de estas células ya que se expresa en SCs quiescentes, SCs activas y en las proliferativas, pero no en los mionúcleos (Seale et al. 2000; Bischoff and Franzini-Armstrong 2004; Relaix et al. 2005; Shefer et al. 2006).

3.1.3. Diferenciación histoquímica del desarrollo muscular

La diferenciación muscular durante el desarrollo fetal humano se puede subdividir en distintas fases según la formación de los miotubos y sus diferencias histoquímicas (**Figura 9**) (Draeger et al. 1987; Butler et al. 1990; Gambier-Chevallay 1993; Ghosh and Dhoot 1998):

- Entre las 8 y 12 semanas de gestación, la mayor parte de células musculares están en estadio de miotubo o mioblasto. Estos miotubos presentan núcleo centralizado y la mayoría corresponden a miotubos primarios de tipo IIC. Éstos son positivos para la miosina rápida y para la fetal. La miosina lenta se encuentra débilmente marcada en fibras de mayor diámetro, fibras que probablemente correspondan a los miotubos primarios. Los miotubos negativos para la miosina lenta corresponderían a los miotubos secundarios.
- A partir de las 14-16 semanas, muchas células presentan un núcleo lateralizado y dispuesto en fascículos. La miosina lenta se expresa en forma de mosaico en los miotubos primarios, mientras que la rápida, aunque se expresa levemente de forma ubicua, aparece con mayor expresión en miotubos pequeños que empiezan a emerger. Esta clase de miotubos, se ha llegado a describir como miotubos “terciarios”.
- Sobre las 22 y 24 semanas se empieza a observar cierta diferenciación con la aparición de fibras tipo I de gran diámetro, conocidas como fibras B de Wohlfart. Su disposición es regular, casi hexagonal y están separadas por fibras pequeñas aun indiferenciadas. Las células de gran diámetro persisten durante todo el período fetal hasta los 6 meses de vida postnatal. La proporción relativa de fibras grandes expresando miosina lenta disminuye.
- Las fibras musculares de los fetos de 32 semanas presentan el núcleo en situación periférica. Son miotubos con numerosas fibras tipo IIC, aunque también se observan fibras IIA y IIB. La miosina rápida se expresa en la mayoría de miotubos secundarios y terciarios. La miosina lenta, aunque se sigue expresando en las fibras de mayor diámetro, también empieza a aparecer en fibras pequeñas (segunda generación de fibras tipo I).

- Entre las 32 semanas y el parto, el número de fibras I, IIA y IIB aumentan y sus características citoquímicas e histoenzimológicas se vuelven progresivamente parecidas a las células del músculo adulto.

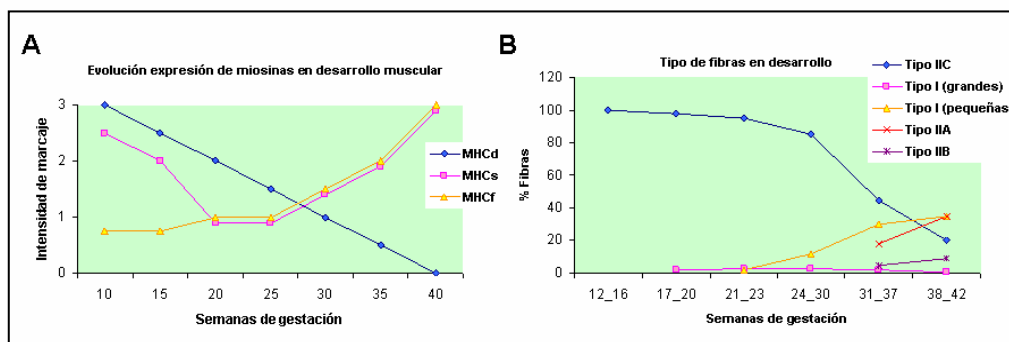


Figura 9: A: Gráfico interpretativo de la evolución de la intensidad de expresión de los diferentes tipos de miosina a lo largo del desarrollo humano (MHCd= Miosina del desarrollo; MHCs= Miosina lenta; MHCf= Miosina rápida). **B:** Evolución de los diferentes tipos de fibras musculares en el desarrollo humano (Adaptado de (Gambier-Chevallay 1993)).

3.2. La Inervación:

En humanos, la formación de los miotubos primarios empieza sobre las 7 semanas de gestación, sin embargo su inervación no se produce hasta la novena semana gestacional por lo que se deduce la característica nervio-independiente de este proceso primario de inervación. En contraste, la formación de miotubos secundarios es dependiente de la misma (Fidzianska 1980; Fidzianska 1980).

Debido a la limitación de muestras para el estudio en humanos, la mayoría de la información sobre el proceso de inervación de los miotubos primarios y secundarios proviene de publicaciones con animales (Duxson et al. 1986; Duxson 1992).

La inervación de los miotubos primarios se caracteriza por ser polineuronal o poliaxonal. Numerosos pequeños terminales nerviosos se encuentran opuestos a la membrana plasmática de las fibras musculares. En muchas ocasiones un mismo

paquete de terminales nerviosos contacta con otras células miogénicas que rodean el miotubo primario. La inervación de los miotubos secundarios sin embargo, se caracteriza por ser más simple, donde existe un menor número de terminales opuestos a la membrana. Estos terminales en muchas ocasiones comparten sinapsis con los miotubos primarios, por lo que se sugiere que los miotubos secundarios podrían recibir su inervación por la transferencia del paquete de terminales nerviosos que reciben los miotubos primarios (**Figura 10**). Mediante técnicas de electrofisiología se ha observado que en etapas tempranas postnatales, todas las fibras musculares se encuentran poliinervadas. Esto implica que una segunda generación de terminales nerviosos debe inervar los miotubos secundarios en etapas tardías del desarrollo (Duxson et al. 1986; Duxson 1992).

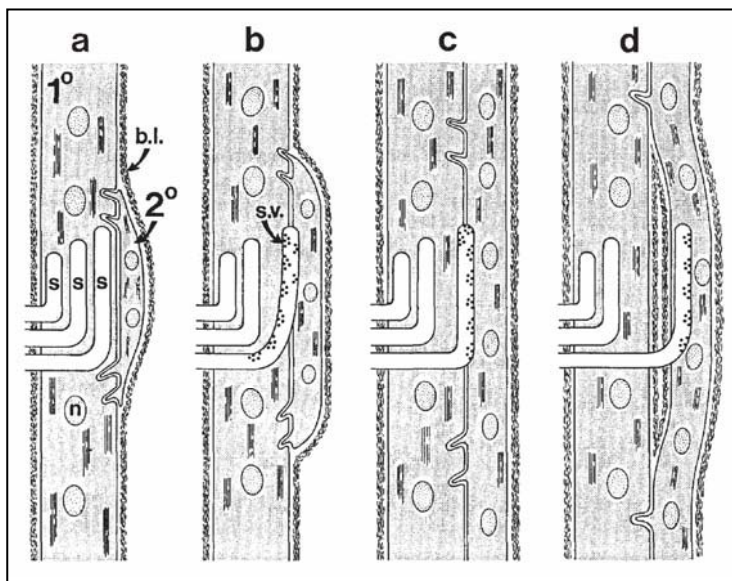


Figura 10: Ilustración esquemática de la transferencia de terminales sinápticos. **a:** Formación de miotubos secundarios nuevos sin contactos sinápticos. **b:** Contacto sináptico compartido, las especializaciones presinápticas se mantienen opuestas al miotubo primario. **c:** Las especializaciones presinápticas se generan en el miotubo secundario y se retraen de las regiones opuestas al miotubo primario. **d:** El miotubo secundario se libera lateralmente del primario, llevándose consigo el terminal sináptico. 1º= Miotubo primario, 2º= Miotubo secundario, n= Núcleo, b.l.= Lámina basal, s= Terminal sináptico, s.v.= Vesículas sinápticas (Extraído de (Duxson et al. 1986)).

3.3. La Unión Neuromuscular

3.3.1. Características de la unión neuromuscular

Cuando el cono de crecimiento de una neurona motora contacta con una fibra muscular, éste se allana y forma sinapsis con esta célula, llamada unión neuromuscular (NMJ) o placa motora. Esta estructura está formada por tres tipos de células: la neurona motora, la fibra muscular y la célula de Schwann. El conjunto de fibras musculares que se contraen cuando se propaga un potencial de acción en las ramas de un axón particular se conoce como unidad motora, que es el elemento contráctil más pequeño del sistema nervioso. Cuando un potencial de acción alcanza una NMJ, causa la liberación de acetilcolina (ACh) en la sinapsis. La ACh se une a los receptores nicotínicos (AChRs) concentrados en la placa motora, produciendo la apertura de canales iónicos seguida de una entrada de iones de sodio en la fibra muscular. Esta despolarización de la membrana causará la activación de los canales de calcio, provocando la contracción muscular.

El desarrollo de la NMJ es un proceso secuencial que requiere interacciones coordinadas entre el nervio y el músculo. Aunque la formación del músculo es un proceso nervio-independiente, la formación de los contactos entre ambos, la ramificación de los nervios intramusculares y la supervivencia neuronal son dependientes de señales recíprocas tanto del nervio como del músculo para regular la formación de sinapsis (Sanes and Lichtman 2001). De este modo dividiremos esta sección en la diferenciación del aparato postsináptico y presináptico.

3.3.2. Diferenciación del aparato postsináptico

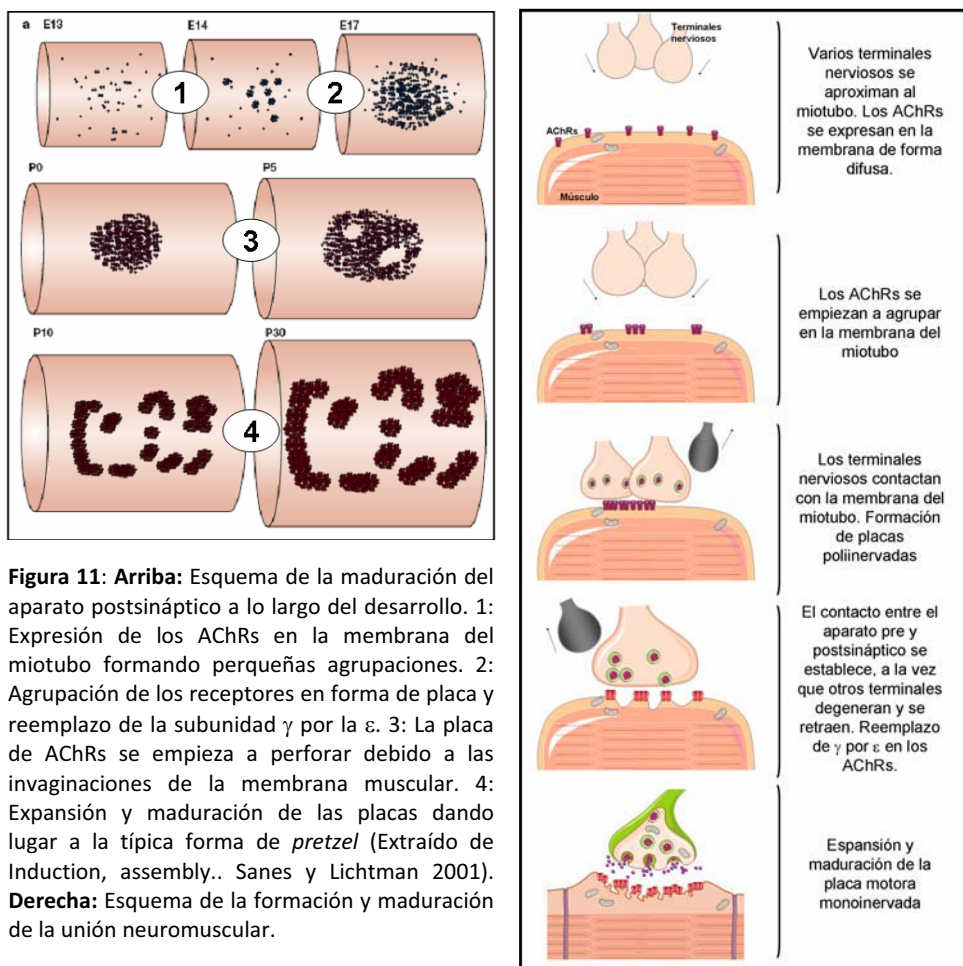
Los receptores nicotínicos de acetilcolina (AChRs) son canales iónicos formados por 4 subunidades que difieren según la etapa del desarrollo. De este

modo existe una forma embrionaria ($\alpha\beta\gamma\delta$) que se reemplaza por la forma adulta ($\alpha\beta\epsilon\delta$) en las etapas tardías del desarrollo humano (Hesselmans et al. 1993).

Durante la formación de miotubos, la distribución de los AChRs se divide en diferentes fases. En primer lugar, los receptores se expresan en la membrana muscular de forma difusa. Posteriormente estos receptores se redistribuyen por la membrana de la zona extrasináptica hacia el foco sináptico. Después de la agrupación de los AChRs, las propiedades metabólicas de los AChRs cambian mediante el reemplazo de la subunidad-fetal (γ AChRs) a la subunidad-adulta (ϵ AChRs). Al mismo tiempo, la membrana muscular empieza a invaginarse aumentando el área de contacto sináptico iniciándose la formación de placas motoras en forma de *pretzel*. En la etapa postnatal, la NMJ aumenta en tamaño, se expande y madura a medida que el músculo crece (**Figura 11 Arriba**) (Sanes and Lichtman 2001).

Aunque la generación de componentes postsinápticos es un proceso que no depende del contacto nervioso, la localización, el aumento y el mantenimiento de éste requieren de actividad sináptica. Se han identificado diferentes moléculas que actúan en la organización del aparato postsináptico entre las que destacan: la neuregulina, la transferrina, el colágeno, la laminina, el ácido ascórbico, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), la pleiotrofina y la agrina. De entre estos componentes, el más estudiado y con mayores evidencias de su papel en la organización postsináptica, es la agrina. La agrina es un proteoglicano liberado por las neuronas motoras que juega un papel importante durante el desarrollo neuromuscular. Ratones deficientes de agrina muestran una diferenciación postsináptica defectuosa, donde los terminales nerviosos son incapaces de establecer contactos sinápticos con los AChRs. Así el papel fisiológico de esta molécula sería la estabilización de los contactos sinápticos, la prevención de la dispersión de las placas de AChRs y el

control del crecimiento axónico (Sanes and Lichtman 1999; Lin et al. 2001; Sanes and Lichtman 2001; Lichtman and Sanes 2003; Witzemann 2006).



3.3.3. Diferenciación del aparato presináptico

Durante el desarrollo, la unión neuromuscular está inervada por más de un axón. Estos terminales contactan con una fibra muscular y compiten para el mantenimiento de la sinapsis. Durante esta competición, ocurren diferentes cambios progresivos en la estructura y la formación de la NMJ que conlleva la debilitación y retracción de algunos terminales, dando lugar a un proceso de

eliminación sináptica. Finalmente, un terminal axónico permanecerá en la placa motora dando lugar a la NMJ que madurará hasta la vida adulta. Todo este proceso se define como el transcurso de inervación poliaxonal a inervación monoaxonal. De esta forma se asegura el establecimiento de las conexiones funcionales adecuadas y se proporcionan las bases para una mayor plasticidad neuronal (**Figura 12**) (Sanes and Lichtman 1999).

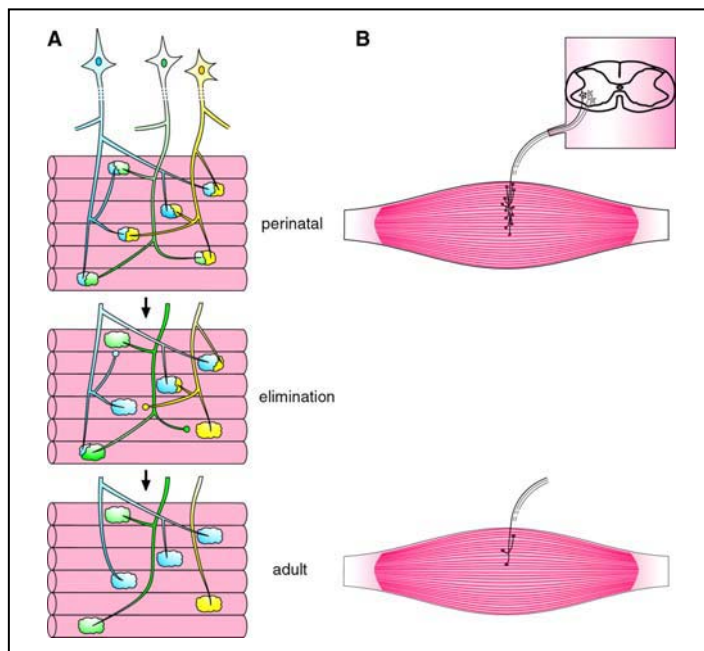


Figura 12: A: Eliminación sináptica durante el periodo prenatal representado por la pérdida de la inervación poliaxonal. Se representan 3 neuronas motoras que inervan varias placas motoras a la vez en el período perinatal. Luego de la eliminación sináptica cada placa motora está inervada por un solo axón. **B:** Disminución del tamaño de la unidad motora. Una neurona motora inerva varias placas motoras en el período perinatal y al final del desarrollo el número de placas que inerva se reduce. (Extraído de (Buffelli et al. 2004))

El proceso de eliminación sináptica puede ocurrir durante el desarrollo normal del sistema nervioso o en respuesta a un daño o enfermedad en el adulto. La pérdida de la inervación múltiple se caracteriza por la retracción de algunas de las ramas nerviosas que recibe cada fibra muscular, sin ningún cambio en el número de axones motores que inervan el músculo como un todo. Hay que tener en cuenta que el periodo de muerte neuronal durante el desarrollo normal en humanos (10-

20 semanas) precede al período de eliminación sináptica que podría llegar a prolongarse hasta el período perinatal (**Figura 12**) (Sanes and Lichtman 2001).

Anatómicamente, el proceso genera una pérdida escalada de ramas nerviosas. Cada rama sufre un proceso de atrofia, desprendimiento y retracción, dando lugar a una separación progresiva del territorio que cada axón ocupa en la fibra muscular. Finalmente, el axón forma un “bulbo de retracción” que se retira de la placa motora. Esta pérdida axonal, tiene lugar a la vez que la placa rica en AChRs se transforma de la forma oval, a la típica forma de pretzel (**Figura 11 derecha**) (Sanes and Lichtman 2001; Engel 2004).

Estudios mediante estimulaciones eléctricas, sugieren que la regresión poliaxonal pueda estar relacionada con la actividad muscular. Así, durante la estimulación de una fibra muscular, la liberación de iones de potasio en la hendidura sináptica, provocaría el aumento de calcio en el terminal nervioso, dando lugar a cambios de las proteínas del citoesqueleto y la consiguiente degradación de los terminales nerviosos sobrantes. En humanos, la regresión poliaxonal empieza entre las 18-25 semanas y acaba sobre las 52 semanas (12 semanas post-término) (Hesselmans et al. 1993; Gramsbergen et al. 1997; Ijckema-Paassen and Gramsbergen 2005).

3.3.4. Aspectos ultraestructurales de la unión neuromuscular durante el desarrollo humano

Durante el desarrollo humano, los primeros contactos neuromusculares aparecen sobre la 9ª semana de gestación. Éstos se caracterizan por ser múltiples terminales axónicos de distintos tamaños, rodeados parcialmente por una célula de Schwann. En el interior, los axones contienen algunas vesículas sinápticas situadas justo en el lado opuesto de la membrana plasmática del miotubo primario (zonas activas). A las 14 semanas, las NMJ se caracterizan por terminales axónicos agrupados de 0.3 a 0.8 μm de diámetro, la mayoría con vesículas sinápticas en su

interior y en contacto directo con la célula muscular (**Figura 13**). En este periodo empiezan a aparecer invaginaciones en la membrana del músculo. Los nervios son amielínicos. A las 16 semanas, tres o más terminales contactan con el músculo, el axoplasma contiene vesículas sinápticas y la superficie muscular presenta invaginaciones más definidas. El axoplasma está compuesto por mitocondrias, neurotúbulos y neurofilamentos. A las 20 semanas el aspecto de la NMJ es parecido al de las 16, pero con las estructuras más definidas y con algunos nervios mielinizados. En el periodo neonatal las NMJs empiezan a madurar, las células de Schwann se extienden por los pliegues sinápticos y se encuentran placas motoras monoinervadas. A medida que avanza la maduración la estructura sináptica aumenta en tamaño, las ramificaciones del terminal nervioso se incrementan y los pliegues sinápticos se hacen más profundos y elaborados (Fidzianska 1971; Fidzianska 1980; Fidzianska and Hausmanowa-Petrusewicz 1984; Engel 2004).

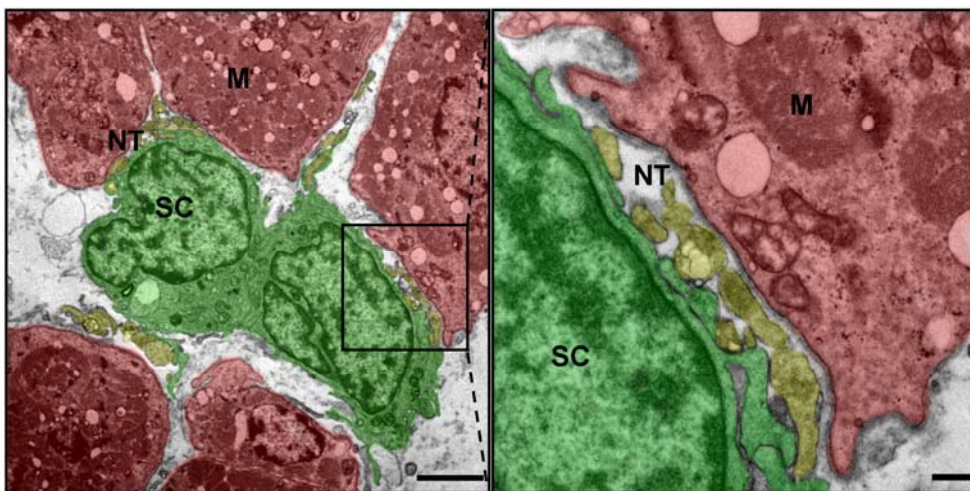


Figura 13: Microscopía electrónica de varias uniones neuromusculares de un feto control de 14 semanas. Varios terminales axónicos llenos de vesículas sinápticas se hallan frente la lámina basal del miofibrilo. M= Miofibrilo (en rojo); SC= Célula de Schwann (en verde); NT= Terminales nerviosos (en amarillo). Escalas= 5 µm y 0.46 µm.

4. Movimientos fetales

La motilidad prenatal está considerada como el reflejo del desarrollo del sistema nervioso, de la maduración y funcionalidad de la hemodinámica fetal, y del sistema muscular. El estudio de los movimientos fetales (MF), se ha logrado llevar a cabo gracias a la introducción del ultrasonido obstétrico en 2D, que provee imágenes de un embrión o feto dentro del útero de una mujer.

En condiciones normales, los primeros signos de viabilidad fetal no son detectados por la gestante hasta las 18 semanas; posteriormente, a las 20 semanas ya han aparecido todos los MF (movimientos del tronco, extremidades, respiratorios..) alcanzando su máxima densidad a partir de las 28 semanas de gestación. Sin embargo, a partir de las 34 semanas, éstos pueden disminuir ligeramente debido principalmente a una acentuación del ritmo circadiano fetal. Los periodos de inactividad fetal, pueden incrementar al aumentar la edad gestacional, sin que esto represente un problema. Además, a medida que el feto crece, tiene menos espacio en el útero y sus movimientos se hacen más limitados y definidos (Illa and Figueras 2010).

Aunque los MF no son detectables para las mujeres hasta las 16-18 semanas, es posible detectarlos mediante el uso de ultrasonido transabdominal en el primer trimestre gestacional. Así los primeros movimientos espontáneos del feto se realizan sobre las 7 semanas de gestación. El número y frecuencia de estos MF se incrementa desde las 10 semanas en adelante, y están relacionados con el desarrollo de las conexiones neuromusculares (**Tabla 5**). Se han caracterizado diferentes tipos de MF y que se definen como (Sparling et al. 1999; Arabin 2004):

➤ Sobresaltos (*startles*): Movimientos generales abruptos, con comienzo en las extremidades esparciéndose hasta el tronco y el cuello, incluyen la flexión y

extensión de los brazos y las piernas al mismo tiempo. Normalmente aparecen como un movimiento aislado, aunque a veces puede ser repetitivo.

- Movimientos generales: Movimientos parecidos a los anteriores pero con la implicación de todo el cuerpo y extremidades. Presentes en secuencias variables y a partir de las 9 semanas en adelante.
- Hipo (*Hiccup*): Contracciones descompasadas del diafragma, seguidas por un reemplazo del tórax y el abdomen. Se observan en intervalos regulares de 2-3 segundos.
- Contacto de cara y mano: Se caracteriza por el contacto de las manos con el rostro. Estos movimientos se tienen que diferenciar del contacto de la boca con el pulgar, ya que debe ser interpretado como succión.
- Aperturas de la boca: Sin deglución, están acompañadas por movimientos de la lengua e iniciadas por succiones.
- Movimientos de deglución: En estos movimientos el feto, es capaz de “beber” líquido amniótico.
- Movimientos respiratorios: Movimientos paradójicos acompañados de movimientos simultáneos lentos del diafragma, del tórax y del abdomen. Ocurren en intervalos irregulares y normalmente están acompañados por la aspiración y la expiración de fluido.
- Movimientos de la cabeza: Incluyen retroflexión, anteflexión y rotación de la cabeza.
- Movimientos de las extremidades: Formados por la extensión, flexión o rotación de los brazos y/o las piernas.

➤ Extensiones (*stretching*): Patrones motores que consisten en una extrema extensión de la columna vertebral, retroflexión de la cabeza, abducción y rotación externa y elevación de los brazos. Este movimiento alcanza varios segundos.

Tabla 5: Resumen de los movimiento fetales durante el desarrollo humano (Adaptado de (de Vries et al. 1982; Flower 1985; Visser et al. 1992; Einspieler et al. 1997; Salihagic-Kadic et al. 2004; Kurjak et al. 2005))

Semanas	Tipo de movimientos
7-8	Flexión y extensión del tronco
11-15	Movimientos generales, movimientos aislados de las extremidades, de la cabeza, sobresaltos, e hipo
16	Disminución de la frecuencia de movimientos. Algunos más abruptos y complejos. Succión del pulgar
20	Movimientos bilaterales
26-32	Movimientos independientes de piernas y brazos
37-38	Disminución de los movimientos. Las manos se pueden encontrar detrás de la cabeza o en la pared uterina

La adecuada adquisición del patrón normal de MF indica un correcto desarrollo neuromuscular. Sin embargo, existen varias anomalías fetales que lo alteran tales como malformaciones, síndromes genéticos, la hipoxia, etc. En la AME se han descrito disminución de movimientos fetales en el tercer trimestre gestacional, relacionando este comportamiento como un signo temprano de la enfermedad (Pearn 1973; MacLeod et al. 1999). Al no haber literatura sobre los movimientos fetales en la AME en el primer y segundo trimestre, estudiar la actividad fetal en esa edad gestacional y relacionarla con los hallazgos del estudio del sistema neuromuscular durante el mismo período puede aportar información importante para el conocimiento de la enfermedad.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

La atrofia muscular espinal es una enfermedad caracterizada por la pérdida y degeneración de las neuronas motoras de la médula espinal ocasionadas por niveles disminuídos de proteína SMN. Es posible asumir que la disfunción y muerte neuronal sería el defecto primario y que la atrofia muscular es una consecuencia de la denervación. Sin embargo, se están llevando a cabo muchos estudios para investigar la función crítica no solo de la neurona motora sino también del músculo y la unión neuromuscular en la patogenia de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la proteína SMN se expresa en mayor grado durante el periodo prenatal comparado con el postnatal, es plausible asumir que SMN tiene una importancia clave durante la etapa fetal y plantear la hipótesis de que la AME es un trastorno del desarrollo. Para demostrarlo, se han investigado aspectos fetales y postnatales del músculo y la unión neuromuscular para definir su papel en el desarrollo de la misma.

OBJETIVOS:

1. Definir la implicación del músculo en la enfermedad.

1.1. Comparar la morfología y la fragmentación del DNA en el músculo esquelético de muestras controles y AME tipo I durante el desarrollo fetal.

1.2. Definir el patrón de expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X y de diferentes proteínas del desarrollo muscular.

2. Estudiar la unión neuromuscular durante el desarrollo humano y la implicación de la misma en la AME.

2.1. Analizar los elementos pre y post-sinápticos de las placas motoras de diferentes grupos musculares mediante inmunofluorescencia.

2.2. Realizar estudios ultraestructurales y morfométricos de la unión neuromuscular.

3. Evaluar los movimientos fetales en embarazos con alto riesgo de AME

3.1. Mediante ultrasonografía obstétrica realizar un estudio cualitativo de los movimientos del primer y segundo trimestre del embarazo en fetos controles y compararlos con fetos confirmados genéticamente como AME.

3.2. Correlacionar los resultados obtenidos en el músculo y la unión neuromuscular con la motilidad fetal observada ecográficamente para definir su implicación en el desarrollo de la enfermedad.

IV. RESULTADOS

5. THE DEVELOPMENTAL PATTERN OF MYOTUBES IN SPINAL MUSCULAR ATROPHY INDICATES PRENATAL DELAY OF MUSCLE MATURATION.

Rebeca Martínez-Hernández¹; Carolina Soler-Botija²; Eva Also¹; Laura Alias¹; Lidia Caselles¹; Ignasi Gich; Sara Bernal¹; Eduardo F Tizzano¹.

¹Department of Genetics and CIBERER ISCIII, ²Department of Cardiology, ³Department of Epidemiology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Av. Sant Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.



Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. May 2009. doi:

10.1097/NEN.0b013e3181a10ea1

RESUMEN

El patrón de desarrollo de los miotubos en la atrofia muscular espinal, indica un retraso de la maduración muscular prenatal.

En estudios previos realizados en la médula espinal de fetos con AME, se detectó un aumento de la apoptosis neuronal y una disminución de la expresión de Bcl-2 y Bcl-X. Siguiendo la misma línea de estudio, y para tener más información acerca del papel del músculo en la enfermedad, en este trabajo se ha realizado un análisis histológico y morfométrico de los miotubos y se ha evaluado la fragmentación del DNA y la expresión de Bcl-2/Bcl-X en el músculo esquelético de fetos con AME tipo I (de 12 a 15 semanas de gestación) y controles (de 10 a 15 semanas de gestación).

En los músculos de las muestras AME se observó que los miotubos eran más pequeños que las muestras controles en todos los estadios analizados. El número de células TUNEL-positivas tanto en control como en AME eran similares, y no mostraban diferencias en la expresión de Bcl-2 y Bcl-X. Las áreas con los miotubos más pequeños y el análisis morfométrico realizado sugiere un retraso en el crecimiento y la maduración del músculo esquelético en el músculo AME. Además, estos resultados podrían indicar que las neuronas motoras de la médula espinal y el músculo esquelético sufren distintos procesos patogénicos durante el desarrollo de la enfermedad. La conclusión de este trabajo refleja la importancia del músculo en la enfermedad y que éste, al igual que las neuronas motoras, podría ser una buena diana para intervenciones terapéuticas tempranas en la AME.

ORIGINAL ARTICLE

The Developmental Pattern of Myotubes in Spinal Muscular Atrophy Indicates Prenatal Delay of Muscle Maturation

Rebeca Martínez-Hernández, BSc, Carolina Soler-Botija, PhD, Eva Also, BSc, Laura Alias, BSc, Lidia Caselles, BSc, Ignasi Gich, PhD, Sara Bernal, PhD, and Eduardo F. Tizzano, MD, PhD

Abstract

The loss and degeneration of spinal cord motor neurons result in muscle denervation in spinal muscular atrophy (SMA), but whether there are primary pathogenetic abnormalities of muscle in SMA is not known. We previously detected increased DNA fragmentation and downregulation of Bcl-2 and Bcl-X_L expression but no morphological changes in spinal motor neurons of SMA fetuses. Here, we performed histological and morphometric analysis of myotubes and assessed DNA fragmentation and Bcl-2/Bcl-X_L expression in skeletal muscle from fetuses with type I SMA (at ~12 and 15 weeks' gestational ages, n = 4) and controls (at ~10–15 weeks' gestational ages, n = 7). Myotubes were smaller in the SMA than in control samples at all ages analyzed (p < 0.001) and were often arranged in clusters close to isolated and larger myotubes. Numbers of terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling–positive cells in control and SMA fetuses were similar, and no differences in Bcl-2 or Bcl-X_L immunostaining between control and SMA muscle were identified. Areas with smaller myotubes and the morphometric analysis suggested a delay in growth and maturation in SMA muscle. These results suggest that spinal motor neurons and skeletal muscle undergo different pathogenetic processes in SMA during development; they imply that muscle as well as motor neurons may be targets for early therapeutic intervention in SMA.

Key Words: Human muscle development, Myotubes, Spinal muscular atrophy.

INTRODUCTION

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disease that affects spinal cord motor neurons and results in progressive skeletal muscular atrophy. Childhood SMA has been divided into 3 types based on the age of onset and clinical severity: Type I (severe form, Werdnig-Hoffmann disease); Type II (intermediate form); and Type III (mild/moderate form, Kugelberg-Welander disease). Mutations of the survival motor neuron (*SMN1*) gene are responsible for SMA, indicating a selective vulnerability of spinal

cord and muscle to reduced SMN protein (1). Degeneration and loss of the α -motor neurons of the anterior horn of the spinal cord are the major neuropathologic features of the disease. Signs of muscle denervation usually appear early in most patients. One distinctive feature of SMA is the presence of a few scattered hypertrophic Type I fibers that presumably result from physiological hypertrophy. Fidzianska et al (2–4) reported that muscle biopsy specimens from patients with Type I SMA have a fetal appearance and are morphologically different from those in other denervating diseases such as amyotrophic lateral sclerosis. These observations led to the suggestion that Type I SMA could result from the arrested development of the motor unit and not from a degenerative process.

The simplest explanation for the neuromuscular phenotype in SMA is to assume that insufficient SMN protein causes motor neuron dysfunction and death and that muscle atrophy is a secondary consequence of denervation. Nevertheless, investigations to address the question of whether muscle, nerve and muscle, or just motor neurons are the critical target tissue in SMA are ongoing; the developmental period is believed to be a critical period in SMA pathogenesis. The SMN is normally expressed in the cytoplasm of myotubes and in most of their nuclei during development. By contrast, fetal SMA muscle has shown weaker SMN expression, with very sparse nuclei exhibiting positive immunostaining (5). Increased neuronal DNA fragmentation has been reported in the spinal cord during fetal development in Type I SMA, suggesting an alteration in programmed cell death (6, 7). Moreover, our group reported downregulation of Bcl-2 and Bcl-X_L protein expression in SMA fetal spinal cords, thereby linking these proteins with the aberrant programmed cell death observed (8). Furthermore, neuropathologic descriptions of SMA largely come from necropsy postnatal samples, making assessment of earlier events more difficult (9).

To obtain further evidence for primary muscle involvement in SMA, in this study, we compared morphology, DNA fragmentation, and Bcl-2 and Bcl-X_L expression in the skeletal muscle from control and type I SMA samples during fetal development.

MATERIALS AND METHODS

Fetal Specimens

The project was approved by the Ethics Committee and the Research Institute at the Hospital of Sant Pau, and family

From the Departments of Genetics and CIBERER ISCIII (RM-H, EA, LA, LC, SB, EFT), Cardiology (CS-B), and Epidemiology (IG), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

Send correspondence and reprint requests to: Eduardo F. Tizzano, MD, PhD, Department of Genetics, Hospital de Sant Pau, Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain; E-mail: etizzano@santpau.cat

This study was supported by the GENOME Project (Rebeca Martínez-Hernández, Sara Bernal), CIBERER U-705 (Laura Alias), and FIS05-2416 (Eva Also).

consent was obtained for each case. Control fetal material from first and second trimesters of gestation was obtained immediately after elective terminations of pregnancy for social reasons. Gestational ages were determined by ultrasound measurements. Prenatal SMN tests performed at approximately 11 to 13 weeks permitted identification of fetuses that would have developed SMA in families with a previous patient affected by Type 1 disease. The SMA fetuses were collected from therapeutic abortions after confirmation of a homozygous deletion of Exons 7 and 8 of the *SMN* gene by chorionic villi DNA analysis (10). Our group has previously studied spinal cord samples from these specimens (5, 7, 8). After a careful analysis of all samples, 7 controls aged 10 (n = 2), 12 (n = 3), and 15 (n = 2) weeks and 4 Type 1 SMA specimens aged 12 (n = 2) and 15 (n = 2) weeks were selected for the study. Upper and lower limbs of each of the fetuses were isolated and immediately fixed by immersion in 4% paraformaldehyde and routinely processed for paraffin embedment. Five-micrometer-thick transverse sections were mounted onto l-lysine 50%–treated slides and stained with hematoxylin and eosin, processed with the method of in situ end-labeling of nuclear DNA fragmentation (i.e. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling [TUNEL]), or treated for immunohistochemistry to detect Bcl-2 and Bcl-X_L. Additional samples were collected and snap frozen for immunoblot analysis.

Morphometric Analysis of Myotubes

All transverse sections were examined under a Nikon ES-400 microscope (60× objective lens). Myotubes were measured after their identification as cells with a large cytoplasm and small central nucleus surrounded by undifferentiated myoblasts. Their nuclei and cytoplasm diameters were measured by 3 investigators using Visilog version 5 (Noesis Vision, Inc, St Lauren, Quebec, Canada). To maximize accuracy of the myotube measurements, we adapted the method of the *lesser diameter*, defined as “the maximum diameter across the lesser aspect of the muscle fiber” described by Dubowitz and Sewry (11). For the cytoplasm diameters, the interclass correlation coefficient among the observations of the 3 investigators was 0.8. Because the values obtained by 2 of the investigators were very similar (interclass correlation coefficient, 0.827), the final result described was the mean. We attempted to measure myotubes in longitudinal sections, although this is more difficult to do accurately than cross-section measurements. To estimate the number of nuclei in longitudinal sections, the distances between nuclei in controls and SMA fibers were compared. All data were collected and analyzed, testing the mean with a 2-way analysis of variance test. Values of $p < 0.01$ were considered significant between the groups (control and SMA samples at 10, 12, and 15 weeks of gestation). Calculations were undertaken with SPSS14.0.

In Situ End-Labeling of Nuclear DNA Fragmentation

To detect cell death by TUNEL staining, we used the ApopTag peroxidase kit (in situ apoptosis detection kit;

Intergen, Purchase, NY), following the supplier's instructions. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. Tissue sections were counterstained with hematoxylin. Brain sections of Sprague-Dawley rats irradiated with a single dose of 2-Gy γ rays at Postnatal Day 3 were used as positive controls. Sections were examined under a 60× objective lens to define the fields for the detection of TUNEL-positive cells.

Immunoblot

Skeletal muscle from control and SMA fetuses was homogenized in Nicholson treatment buffer (125 mM Tris HCl, pH 6.8; 4% sodium dodecyl sulfate; 4 M urea; 5% mercaptoethanol; 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) (12) and then boiled for 5 minutes. The extracts were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis using a mini-protean system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with low-range molecular weight standards (Bio-Rad). Protein analyzed on gel electrophoresis was electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were then washed with PBS (pH 7.4, Sigma, St. Louis, MO) and blocked with PBS containing 5% skim milk for 60 minutes. The membranes were incubated overnight at 4°C with the monoclonal anti-Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:250. After washing, the immunoblots were incubated with rabbit peroxidase–conjugated anti-mouse secondary antibody (1:300 dilution; DAKO, Barcelona, Spain) for 1 hour at room temperature, washed again, and developed with the Super-Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL). Stripping of the membrane and subsequent reprobing with a rabbit polyclonal antibody Bcl-X_L (Transduction Laboratories, Lexington, KY) at a dilution of 1:100 was performed. The secondary antibody was a goat peroxidase–conjugated anti-rabbit (1:1000 dilution, DAKO). A final stripping and subsequent reprobing with a monoclonal β -tubulin antibody were performed.

Densitometric Analyses

Western blot densitometric analyses were performed, scanning and analyzing Bcl-2, Bcl-X_L, and β -tubulin band intensities using the imaging analyzer Quantity One 4.1.1 version (Bio-Rad) to calculate their ratios.

Immunohistochemistry

Dewaxed sections of skeletal muscle of control and SMA fetuses were processed for immunohistochemistry as previously described (8). Briefly, after blocking endogenous peroxidase with hydrogen peroxide and methanol, the sections were treated with sodium citrate buffer 10 mmol/L, pH 6, for 25 minutes at 100°C and left for 1 hour at room temperature. Next, the sections were incubated with normal serum for 2 hours at room temperature (1:5 dilution). They were then incubated at 4°C overnight with a rabbit polyclonal antibody to Bcl-2 [N-19] (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:75 or with anti-Bcl-X_L (Transduction Laboratories) at a dilution of 1:500. For negative-reaction controls, we incubated the sections with the blocking solution

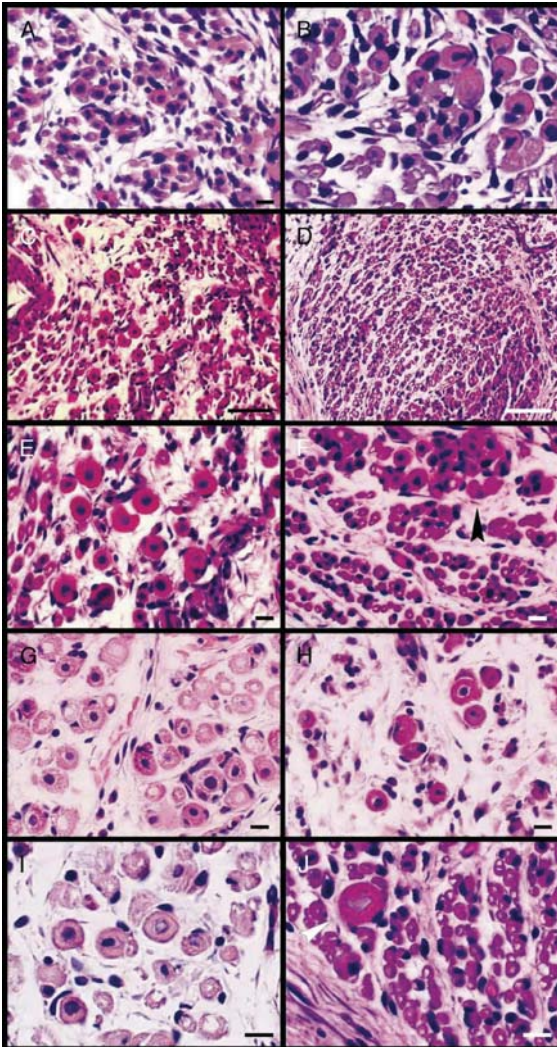


FIGURE 1. Transverse sections of fetal muscle. Control (**A–C, E, G, I**) and spinal muscular atrophy (**D, F, H, J**) muscle at 10 (**A, B**), 12 (**C–F**), and 15 (**G–J**) weeks' gestational age. The black arrowhead in (**F**) indicates a smaller group of myotubes; the white arrowhead in (**J**) indicates an isolated larger myotube. Hematoxylin and eosin. Scale bars = (**A, B, E–J**) 10 μm ; (**C, D**) 50 μm .

only. After incubation, the sections were exposed to the biotinylated secondary antibody for 15 minutes and finally to streptavidin-peroxidase for 15 minutes at room temperature (HRP Rabbit/Mouse/Goat Universal LSAB+Kit, DAKO). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were slightly counterstained with hematoxylin. All the

sections were blindly examined at various magnifications with a Nikon ES-400 microscope.

RESULTS

Histology

In cross sections, the myotubes were larger and more evenly distributed in the control than in the SMA muscle samples (Figs. 1A–J). In some areas of the SMA muscle, small myotubes arranged in clusters with a well-preserved architecture were seen (Figs. 1D, F, H, J). We also detected SMA myotubes that resembled control myotubes in size and were aggregated in clusters (Figs. 1F, H). There were also larger isolated myotubes in SMA muscles close to the smaller myotubes (Fig. 1J). These features were similar at the 2 gestational ages of SMA muscle analyzed (12 and 15 weeks). In longitudinal sections, the myotubes appeared thinner in SMA than in control muscle in some regions (Fig. 2). The appearances of the SMA and control muscles were similar in upper and lower limbs and in proximal and distal segments.

Morphometric Analysis of Myotubes

The mean nuclear diameter of 423 control myotubes in the 3 periods analyzed (10, 12, and 15 weeks) was $4.03 \pm 0.58 \mu\text{m}$ (SD), whereas the mean nuclear diameter for 253 SMA myotubes at 12 and 15 weeks was $3.77 \pm 0.57 \mu\text{m}$ ($p < 0.001$). The mean diameter of the control myotubes was $12.11 \pm 1.98 \mu\text{m}$, whereas for SMA myotubes, it was $9.64 \pm 2.15 \mu\text{m}$ ($p < 0.001$). The differences were statistically significant when the gestational ages of the control and SMA muscles were separately compared (12 weeks, $p < 0.001$; 15 weeks, $p < 0.001$) (Figs. 3A, B). The distributions of the values at 12 weeks were clearly different between the control and SMA groups with some overlap (Fig. 4A). Between 12

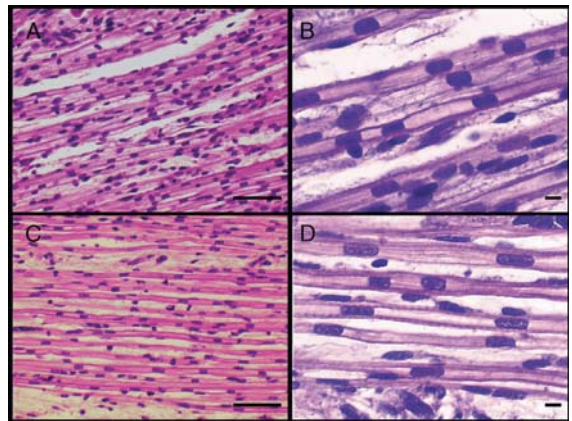


FIGURE 2. Longitudinal sections of fetal muscle. Control (**A, B**) and spinal muscular atrophy (SMA) (**C, D**) longitudinal muscle sections at 12 weeks. Myotubes in SMA tend to be thinner than in the controls, but the distances between nuclei are similar in both groups. Hematoxylin and eosin. Scale bars = (**A, C**) 50 μm ; (**B, D**) 10 μm .

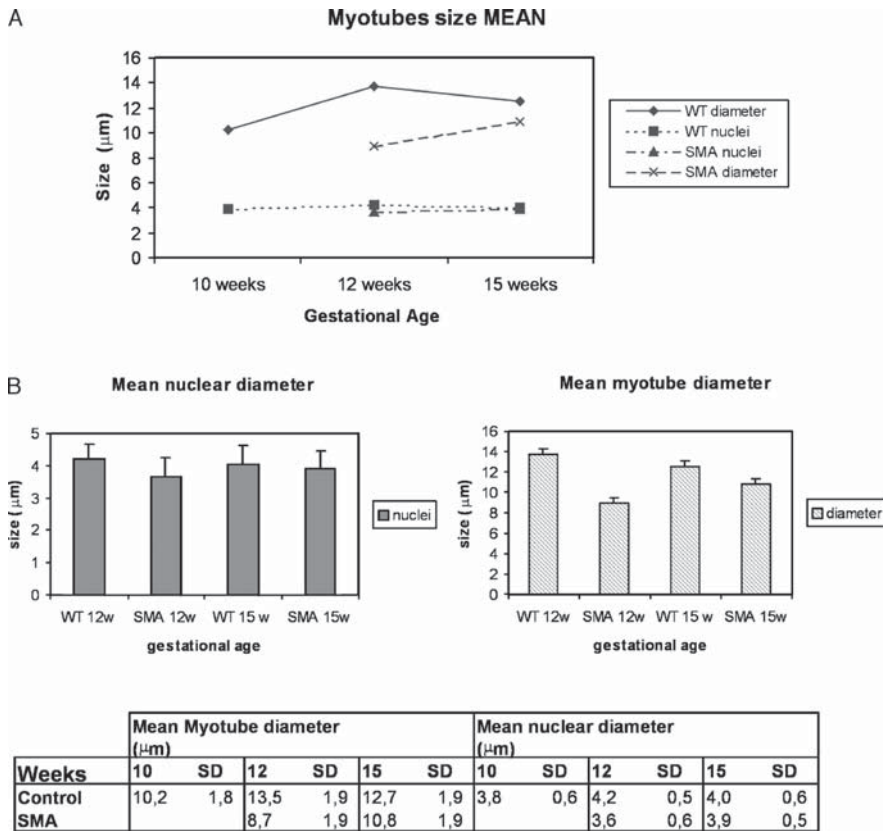


FIGURE 3. Morphometric analysis of myotubes. **(A)** Control (WT) and spinal muscular atrophy (SMA) myotube sizes at 10, 12, and 15 weeks of gestation. **(B)** Myotube sizes in control and SMA fetuses at 12 and 15 weeks. The diameter in control myotubes was significantly higher than that in the SMA myotubes at both gestational ages. Results represent the mean ± SD.

and 15 weeks, no differences were observed in the evolution of the control and SMA myotube nuclear sizes (Figs. 3A, B). The diameter of the control myotubes tended to decrease, however, whereas the diameter of SMA myotubes tended to increase during this period (Fig. 4B). This finding indicates the different behaviors over time in the 2 groups. Inspection of the slope in SMA between 12 and 15 weeks suggests a behavior similar to the slope of controls between 10 and 12 weeks (Fig. 4C). A statistical comparison of both slopes demonstrated a tendency to increase with time. Nevertheless, the value for the control slope was 3.31 ± 0.23 , whereas the SMA slope was 2.07 ± 0.24 ($p < 0.001$). These data indicate that the increase in size of the myotubes in SMA is delayed because at 12 weeks, the SMA myotubes showed values lower than those of the controls at 10 weeks.

The distances between nuclei in longitudinal sections were determined in control and SMA 12-week samples. A total of 403 values (199 in controls and 204 in SMA) was obtained. The mean value for controls was $38.7 \text{ mm} \pm 13.24 \text{ mm}$, whereas in SMA samples, it was $40.1 \text{ mm} \pm 12.79 \text{ mm}$ (t -test, $p = 0.290$).

TUNEL Analysis

A total of 95 control and SMA muscle sections of upper and lower limbs were stained by TUNEL. For control tissues, 212 fields (defined by a 60× objective lens) were studied, and a total of 164 TUNEL-positive cells were detected. The average number of positive cells per field was 0.773. In the SMA sections, we analyzed 165 fields and detected 98 TUNEL-positive cells. The mean value was similar to those of the controls (0.593 positive cells per field). Thus, isolated TUNEL-positive cells were found in both groups, with no qualitative or semiquantitative differences between them identified. The isolated TUNEL-positive cells were detected within groups of clustered and nonclustered myotubes and in connective tissue (Fig. 5).

Bcl-2 and Bcl-X_L Expression

Immunohistochemical studies showed no significant differences between control and SMA muscle with respect to Bcl-2 and Bcl-X_L expression in the 2 sample ages analyzed (12 and 15 weeks). Positive immunostaining was observed mainly in the cytoplasm of the myotubes and myoblasts with

both antibodies. Expression in nuclei was barely detected (Fig. 6A). Immunoblot studies revealed no quantitative differences between control and SMA muscle (Fig. 6B).

DISCUSSION

We systematically analyzed several features of skeletal muscle (one of the most critically affected tissues in SMA) in

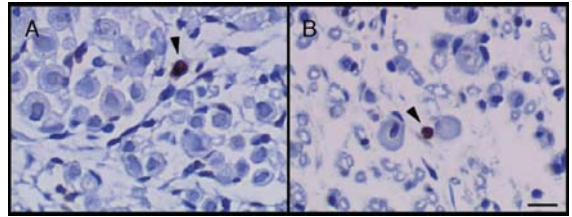
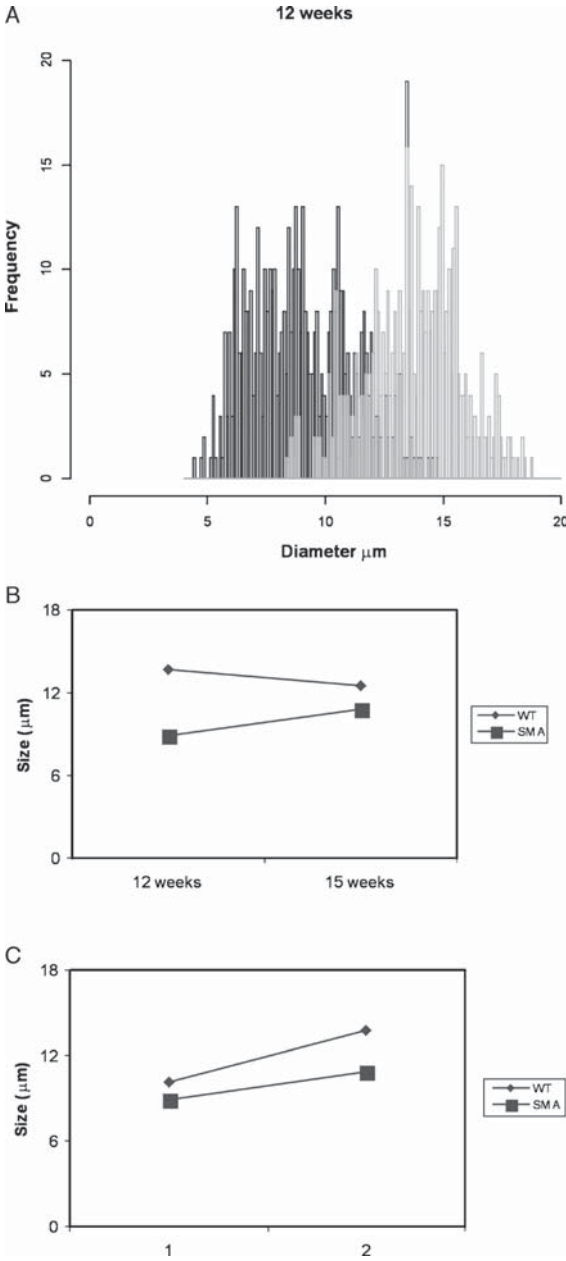


FIGURE 5. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) studies in fetal muscle. The TUNEL staining of cross sections of control (A) and spinal muscular atrophy (B) muscle from 12-week gestational age fetuses. The arrowhead in (A) indicates an isolated TUNEL-positive cell outside a group of myotubes; the arrowhead in (B) indicates an isolated TUNEL-positive cell with apoptotic morphology within the myotube zone. Scale bar = 10 μm.



control and Type I SMA fetuses at 12 and 15 weeks' gestational age. During skeletal muscle development, myoblasts fuse into myotubes (i.e. centrally multinucleated cells) that subsequently become muscle fibers (13). Primary myotubes are usually present by 8 weeks of development and are regarded as classic myotubes with chains of central nuclei. Secondary myotubes with smaller diameters and more widely spaced nuclei usually appear after 13 to 14 weeks (14). Myotube diameters in humans tend to decrease between 12 and 15 weeks of gestation; similarly, this also occurs in mice between Days E18 and E20 (15). We detected a decrease in the overall values of control myotube diameters toward Week 15 that could be attributed to the progressive appearance of smaller secondary myotubes. The increase in myotube diameters in SMA samples at Week 15 suggests that primary myotubes are still very abundant in SMA at this stage.

We also found that the developmental patterns of SMA myotubes differ from those in controls with respect to myotube size, gestational age, and pattern of change over time. The SMA myotubes had significantly smaller nuclei and cytoplasm at all stages analyzed compared with controls. The greatest difference in size between control and SMA myotubes

FIGURE 4. Distribution and progressive changes of the myotube sizes. (A) Control (WT) and spinal muscular atrophy (SMA) muscle size distribution at 12 weeks of gestation. The SMA myotubes (in black) are smaller than controls (in gray). Histogram was made using RGui version 2.6.1. (B) Myotube sizes at 12 toward 15 weeks of gestational age. The mean myotube sizes in WT samples begin to decrease after 12 weeks, whereas SMA myotubes show a gradual increase (values represent the mean). (C) Overlapping of myotube behavior in SMA between 12 and 15 weeks and in controls between 10 and 12 weeks. The no. 1 in the x axis represents the mean of the values at 10 weeks in control and 12 weeks in SMA. The no. 2 in the x axis represents the mean of the values at 12 weeks in control and 15 weeks in SMA. Both slopes tended to increase with time. Note that the values and the slopes of the SMA samples at 12 to 15 weeks are similar to the control slopes at 10 to 12 weeks, but the value for the control slope was higher than the SMA slope ($p < 0.001$).

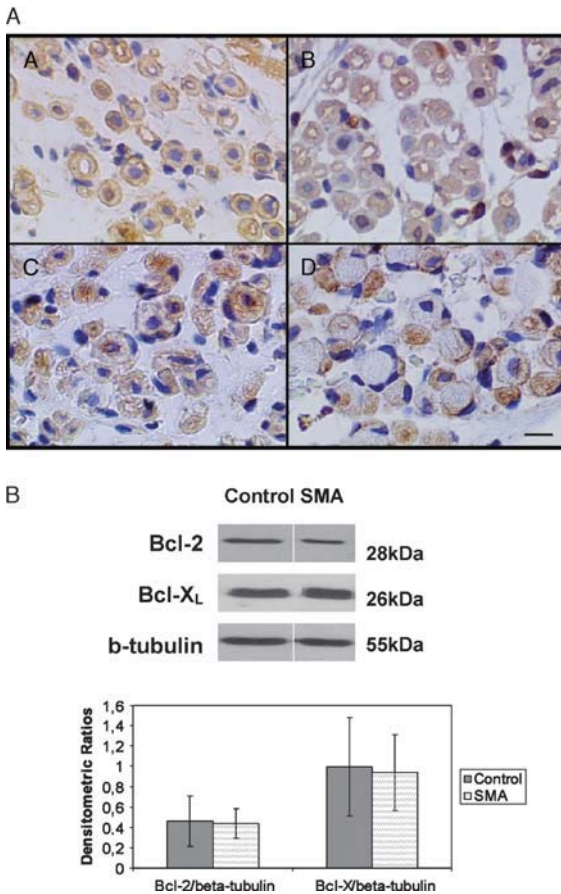


FIGURE 6. Bcl-2 and Bcl-X_L expression in fetal muscle. Immunohistochemical staining of fetal control and spinal muscular atrophy (SMA) muscle. **(A, B)** There is an intense Bcl-2 signal in the cytoplasm of the control **(A)** and SMA **(B)** muscle samples from 12 weeks' gestational age. **(C, D)** Immunohistochemical staining for Bcl-X_L in 15-week fetal muscle. The expression of Bcl-X_L is patchy and irregular in controls **(C)** and SMA **(D)**. Scale bar = 10 μm. **(B)** Immunoblot of Bcl-2 and Bcl-X_L in fetal muscle. The ratios are similar between control (dark gray) and SMA (light gray).

was detected at 12 weeks, a period when primary myotubes are predominant. At this age, the values of SMA myotubes, albeit lower, resembled those of the controls at 10 weeks, indicating a delay in growth and maturation in SMA muscle. The superimposition of the 10- to 12-week values in controls with the 12- to 15-week values in SMA shows similar slopes of the increase in myotube size. The values obtained were even lower in SMA, reinforcing the hypothesis of muscle delay in development (Fig. 4). No significant differences were observed in the distance between nuclei in longitudinal sections, suggesting that myotube elongation is similar between controls and SMA.

Immature cells akin to myotubes have been observed in muscle samples of Type I SMA patients (4), and immature

muscle fibers have been described in Kugelberg-Welander patients (16). Moreover, several developmental proteins (e.g. neural cell adhesion molecule, developmental heavy chain myosin, desmin, and vimentin) have been observed in atrophic muscle fibers from SMA patients (17, 18). Based on observations in these studies of postnatal SMA muscle as well as our present observations in prenatal (i.e. presymptomatic) SMA, it is reasonable to postulate that delayed myogenesis is an early manifestation of SMA during the fetal period.

Apoptosis occurs during normal skeletal muscle histogenesis; at the myotubule stage, undesired cells are eliminated by apoptosis, thereby reducing the total numbers of muscle fibers (19). Unlike previous observations of increased numbers of TUNEL-positive neurons in the spinal cord during development of Type I SMA fetuses (6, 7), we were unable to detect differences in DNA fragmentation between the fetal SMA and control muscle samples using the same TUNEL protocol. These observations suggest that apoptosis is not increased in SMA muscle during early development. The window of development that we studied (from 12 to 15 weeks), however, does not exclude the possibility that the number of apoptotic cells subsequently increases during development in SMA.

Fidzianska et al (3) observed that numerous muscle cells underwent removal by apoptosis in an SMA patient aged 8 weeks and hypothesized that increased apoptosis could be a pathological mechanism in the skeletal muscle of SMA patients. The authors proposed that the elimination of muscle fibers could result in secondary motor neuron death. Other investigators have described an increase in TUNEL-positive cells in muscle fibers of SMA patients (18, 20). This increase may not only indicate apoptosis, but also delayed development of myocytes and the presence of defective innervation (20, 21). All of these studies were carried out in postnatal samples and in the terminal period of the disease in most cases, whereas the present study addresses changes that occur during SMA development in a preclinical stage. Interestingly, in a mouse model in which the *Smn* deletion is targeted to the muscle, no apoptotic cells were observed;

TABLE. Comparison of Spinal Cord and Muscle in Fetal SMA at Approximately 12 to 15 Weeks of Development

Tissue	Histology LM	TUNEL + Cells	Bcl-2/Bcl-X _L
Spinal cord	No detectable differences between SMA and controls MN nuclear size similar to controls	Significantly increased in SMA compared with controls	Downregulation in SMA
Muscle	SMA myotubes smaller than in controls Clusters of small myotubes with isolated larger myotubes in SMA	No differences detected between SMA and controls	No detectable differences between SMA and controls

LM, light microscopy; MN, motor neuron; SMA, spinal muscular atrophy; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling. Compiled from Soler-Botija et al (5, 7, 8) and this work.

the authors did, however, detect necrotic fibers, a low proportion of regenerating myocytes, and a definite muscular dystrophy (22). Furthermore, in a similar mutant mouse, a limited capacity of satellite cells to regenerate skeletal muscle has been shown (23). In these models, the authors did not observe muscle denervation or morphological changes in motor neurons as had been detected in another mouse model, in which the deletion was targeted at motor neurons (24).

We were unable to detect differences in the expression of Bcl-2 and Bcl-X_L, proteins involved in antiapoptotic mechanisms (25). Tews and Goebel (20) found weak Bcl-2 expression in postnatal Type I SMA muscle biopsies and suggested that muscle fibers are unable to express sufficient levels of Bcl-2 because of immaturity. Our finding that Bcl-2 expression in SMA fetal muscle appeared similar to that in controls suggests that Bcl-2 makes a limited contribution to the survival of SMA muscle during development. Dominov et al (26) analyzed the expression of the Bcl-2 family of proteins during muscle development and detected expression in myoblasts, myotubes, and muscle stem cells of embryos, fetuses, and newborns. Our study is the first to describe the pattern of expression of the Bcl-2 proteins in developing SMA muscle.

Based on our earlier reports on spinal cord of fetuses predicted to develop Type I SMA (7, 8), comparison with muscle in the same developmental period reveals some striking differences between the 2 tissue types (Table). The SMA motor neurons show no demonstrable alterations under light microscope examination (7), whereas myotubes of affected fetuses tend to be smaller and arranged in clusters. On the other hand, SMA motor neurons showed greater DNA fragmentation than controls, whereas SMA muscle displays a rate of isolated TUNEL-positive cells similar to that of controls. Moreover, downregulation of Bcl-2 and Bcl-X_L proteins has been observed in SMA spinal cord (8), but here we found no differences from controls in these proteins at the same gestational age (present work). Thus, spinal cord and muscle differ in their pathogenic responses during development in SMA. A study of terminal peripheral nerves and neuromuscular junctions could identify possible pathogenetic links between the 2 tissues (work in progress). In a recent study using embryonic SMA mice, McGovern et al (27) found no defects in axonal formation or outgrowth, but they did find a significant increase in synapses lacking motor axon input.

Our results support the view of SMA as a developmental disorder and the hypothesis that similar to motor neurons, skeletal muscle could play a major role in SMA pathogenesis. In fact, lower amounts of SMN in developing muscle (5) could affect its growth and maturation regardless of denervation. For example, myotube diameters in the murine aneural soleus muscle during development do not differ from those of the myotubes of innervated muscles (15). In rats, it has been demonstrated that immature muscle fibers can survive denervation for longer periods, but their development into mature muscle fibers is dependent on functional innervation (28). It has also recently been reported that the SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disk, and that myofibers from a severe SMA mouse model display morphological defects consistent with Z-disk deficiency

(29). Studies of cocultures of rat embryo spinal cord with muscle from SMA patients have shown that SMA muscle fibers were unable to prevent motor neuron death by apoptosis. Therefore, a defect in the neurotrophic function of SMA muscular cells has been assumed (30). In line with our present results, these authors noted a subtle difference in the size of myonuclei, with those of SMA myotubes appearing smaller (30). Furthermore, cultured muscle cells from SMA patients failed to cluster acetylcholine receptors and presented abnormalities that may affect neuromuscular junction installation (31). Thus, it is reasonable to assume that the dynamic interaction between motor neurons and muscle is disrupted in SMA disease, where lower SMN protein (5) could be involved in dysregulation of developmental changes in motor neurons, neuromuscular junctions, and muscle (32). Based on postnatal studies in mouse SMA models, Kariya et al (33) recently demonstrated that insufficient SMN protein arrests the postnatal development of the neuromuscular junction, impairing maturation of acetylcholine receptor clusters.

In conclusion, our results highlight the need for further research into SMA muscle during development and the need to consider both motor neurons and muscle as targets for early intervention and new therapies (34) in SMA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the consenting parents who made this study possible. The authors also thank Josep Esquerda and Montserrat Balget for helpful comments on the manuscript and Elena Serrano and Maria Jo Barceló for technical help.

REFERENCES

1. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155–65
2. Fidzińska A. Morphological differences between the atrophied small muscle fibres in amyotrophic lateral sclerosis and Werdnig-Hoffmann disease. *Acta Neuropathol* 1976;34:321–27
3. Fidzińska A, Goebel HH, Warlo I. Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain* 1990;113:433–45
4. Fidzińska A, Hausmanowa-Petrusewicz I. Morphology of the lower motor neuron and muscle. In: Gamstorp I, Sarnat HB, eds. *Progressive Spinal Muscular Atrophies*. New York, NY: Raven Press, 1984:55–89
5. Soler-Botija C, Cusco I, Caselles L, et al. Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: Protection or pathological gain of function? *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:215–23
6. Fidzińska A, Rafalowska J. Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol* 2002;104:363–68
7. Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, et al. Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002;125:1624–34
8. Soler-Botija C, Ferrer I, Alvarez JL, et al. Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:420–26
9. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 1996;3:97–110
10. van der Steege G, Grootscholten PM, van der Vlies P, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995;345:985–86

11. Dubowitz V, Sewry A. *Muscle Biopsy. A Practical Approach*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2007:83–84
12. Nicholson LV, Davison K, Falkous G, et al. Dystrophin in skeletal muscle. I. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 1989;94:125–36
13. Kelly AM, Rubinstein NA. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C, eds. *Myology: Basic and Clinical*. New York, NY: McGraw-Hill, 1994:119–33
14. Harris AJ, Duxson MJ, Fitzsimons RB, et al. Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development* 1989;107:771–84
15. Hughes DS, Ontell M. Morphometric analysis of the developing, murine aeneural soleus muscle. *Dev Dyn* 1992;193:175–84
16. Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Niebroj-Dobosz I, et al. Is Kugelberg-Welander spinal muscular atrophy a fetal defect? *Muscle Nerve* 1980;3:389–402
17. Soussi-Yanicostas N, Ben Hamida C, Bejaoui K, et al. Evolution of muscle specific proteins in Werdnig-Hoffman's disease. *J Neurol Sci* 1992;109:111–20
18. Stathas D, Kalfakis N, Kararizou E, et al. Spinal muscular atrophy: DNA fragmentation and immaturity of muscle fibers. *Acta Histochem* 2008; 110:53–58
19. Sandri M, Carraro U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1373–90
20. Tews DS, Goebel HH. DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6:265–73
21. Tews DS, Goebel HH. Apoptosis-related proteins in skeletal muscle fibers of spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56: 150–56
22. Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 2001;152:1107–14
23. Nicole S, Desforges B, Millet G, et al. Intact satellite cells lead to remarkable protection against *Smn* gene defect in differentiated skeletal muscle. *J Cell Biol* 2003;161:571–82
24. Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, et al. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2000;9:849–58
25. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1–6
26. Dominov JA, Dunn JJ, Miller JB. Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J Cell Biol* 1998;142:537–44
27. McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, et al. Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 2008;17: 2900–9
28. Lowrie MB, Vrbova G. Different pattern of recovery of fast and slow muscles following nerve injury in the rat. *J Physiol* 1984;349:397–410
29. Walker MP, Rajendra TK, Saieva L, et al. SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain. *Hum Mol Genet* 2008;17:3399–410
30. Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, et al. Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 2002;25:700–8
31. Arnold AS, Gueye M, Guettier-Sigrist S, et al. Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients. *Lab Invest* 2004;84:1271–78
32. Hausmanowa-Petrusewicz I, Vrbova G. Spinal muscular atrophy: A delayed development hypothesis. *Neuroreport* 2005;16:657–61
33. Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, et al. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2008;17:2552–69
34. Sumner CJ. Therapeutics development for spinal muscular atrophy. *NeuroRx* 2006;3:235–45

6. SYNAPTIC DEFECTS IN TYPE I SPINAL MUSCULAR ATROPHY IN HUMAN DEVELOPMENT.

Rebeca Martínez-Hernández¹, Sara Bernal¹, Eva Also-Rallo¹, Laura Alías^{1,2}, M^aJesús Barceló^{1,2}, Marta Hereu³, Josep E. Esquerda³ and Eduardo F. Tizzano^{1,2}

¹Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and IIB Sant Pau, Av. Sant Antoni Ma. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER U705), Instituto de Salud Carlos III, Spain. ³Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Department of Experimental Medicine, Universitat de Lleida And IRBLleida, Lleida, Spain.



Journal of Pathology. July 2012. doi: 10.1002/path.4080.

RESUMEN

Defectos sinápticos en la atrofia muscular espinal tipo I durante el desarrollo humano

Investigaciones previas y las realizadas en este trabajo de tesis han señalado la importancia del papel de la médula espinal y del músculo en el desarrollo de la atrofia muscular espinal. Por esta razón y por los estudios en modelos animales, se propuso investigar la unión neuromuscular en el desarrollo humano asumiendo que aportaría una valiosa información sobre la interacción de ambos tejidos en este periodo. En este trabajo se ha definido tanto la estructura presináptica como la postsináptica de las uniones neuromusculares en muestras prenatales y postnatales AME, mediante métodos de microscopía confocal y electrónica.

Los resultados tanto cualitativos como cuantitativos del estudio, revelaron diferentes defectos en los fetos AME tipo I como: disgregación de los receptores de acetilcolina, acumulación anormal de vesículas sinápticas en los terminales nerviosos, disminución de zonas activas y terminales axónicos aberrantes con cambios característicos de degeneración nerviosa. Las muestras con AME tipo II no mostraban estos defectos, y su estructura era similar a la de las muestras controles.

En el músculo postnatal tipo I, se observó una persistencia de la subunidad gamma de los receptores de acetilcolina y una dispersión de estos receptores alrededor de fibras musculares no-inervadas, sugiriendo un retraso en la maduración de las uniones neuromusculares.

La conclusión de este trabajo es que la patología en la AME tipo I empieza durante el desarrollo prenatal y que uno de los primeros defectos detectados es la incapacidad de mantener la inervación muscular con la consecuente alteración del aparato sináptico, dando lugar a una disfuncionalidad neuromuscular generalizada.

Synaptic defects in type I spinal muscular atrophy in human development

Rebeca Martínez-Hernández,¹ Sara Bernal,¹ Eva Also-Rallo,¹ Laura Alías,^{1,2} M³Jesús Barceló,^{1,2} Marta Hereu,³ Josep E Esquerda³ and Eduardo F Tizzano^{1,2*}

¹ Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and IIB Sant Pau, Avda Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER U705), Instituto de Salud Carlos III, Spain

³ Unitat de Neurobiologia Cel·lular, Department of Experimental Medicine, Universitat de Lleida and IRBLleida, Lleida, Spain

*Correspondence to: Eduardo F Tizzano, MD, PhD, Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. e-mail: etizzano@santpau.cat

Abstract

Childhood spinal muscular atrophy is an autosomal recessive neuromuscular disorder caused by alterations in the *Survival Motor Neuron 1* gene that triggers degeneration of motor neurons within the spinal cord. Spinal muscular atrophy is the second most common severe hereditary disease of infancy and early childhood. In the most severe cases (type I), the disease appears in the first months of life, suggesting defects in fetal development. However, it is not yet known how motor neurons, neuromuscular junctions, and muscle interact in the neuropathology of the disease. We report the structure of presynaptic and postsynaptic apparatus of the neuromuscular junctions in control and spinal muscular atrophy prenatal and postnatal human samples. Qualitative and quantitative data from confocal and electron microscopy studies revealed changes in acetylcholine receptor clustering, abnormal preterminal accumulation of vesicles, and aberrant ultrastructure of nerve terminals in the motor endplates of prenatal type I spinal muscular atrophy samples. Fetuses predicted to develop milder type II disease had a similar appearance to controls. Postnatal muscle of type I spinal muscular atrophy patients showed persistence of the fetal subunit of acetylcholine receptors, suggesting a delay in maturation of neuromuscular junctions. We observed that pathology in the severe form of the disease starts in fetal development and that a defect in maintaining the initial innervation is an early finding of neuromuscular dysfunction. These results will improve our understanding of the spinal muscular atrophy pathogenesis and help to define targets for possible presymptomatic therapy for this disease.

Copyright © 2012 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: spinal muscular atrophy; neuromuscular junction; acetylcholine receptor; human development

Received 17 February 2012; Revised 12 July 2012; Accepted 22 July 2012

No conflicts of interest were declared.

Introduction

Autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA, OMIM 253300) is the most common neuromuscular disease of childhood, with an incidence of about 1 in 10000 live births and a carrier frequency of ~1 in 50 among Europeans [1]. It is characterized by degeneration and loss of α -motor neurons of the anterior horn of the spinal cord, resulting in symmetrical weakness and wasting of muscles. According to the age of onset and clinical severity, SMA has been divided into three main types: type I (severe form, Werdnig–Hoffmann disease), type II (intermediate form), and type III (mild/moderate form, Kugelberg–Welander disease) [2].

Type I SMA children show severe hypotonia and muscle weakness that affects the limbs and respiratory muscles and becomes evident in the neonatal period or within the first few months after birth. Type II SMA appears before 18 months and patients are able to sit unsupported, although they never walk and

are wheelchair-bound. Type III SMA patients achieve walking abilities but may lose deambulation later in life [3]. Muscle biopsy in SMA patients shows a typical pattern of both hypertrophic type I fibres and atrophic type I and II fibres with a fetal appearance [4,5], and the spinal cord reveals loss of motor neurons and chromatolytic changes in surviving anterior horn cells [6,7]. All forms of SMA are caused by mutations in the *Survival Motor Neuron 1* gene (*SMN1*), indicating a selective vulnerability of the spinal cord and muscle to reduced SMN protein [8]. A highly homologous copy, *SMN2*, is present in all patients and the number of copies of this gene modifies the phenotype [9].

The *SMN* gene encodes a protein that is detected in the cytoplasm and in nuclear Cajal bodies [10], and its expression is ubiquitous. This protein is essential for life and its deficiency endangers motor neurons. SMN is more highly expressed during the prenatal period in comparison with postnatal stages and may be necessary for embryo and fetal development [11]. Since SMN is markedly reduced in SMA even before the onset

of the disease [12,13], it is plausible to hypothesize that SMA is a developmental disorder rather than a postnatal disease [14].

A delayed process of myotube maturation is an early manifestation of SMA during the fetal period [15]. This finding, together with the defective innervation reported in SMA patients [16,17], supports the assumption that the dynamic interaction between motor neurons and muscle is disrupted in SMA disease [18]. Furthermore, abnormal synaptic organization of neuromuscular junctions (NMJs) and defective synaptic neurotransmission have been reported in SMA mouse models [19].

SMA is a devastating disease, with no cure in sight. Thus, it is of utmost importance to define whether treatment should target motor neurons, neuromuscular junctions, muscles, or a combination thereof. Here, we qualitatively and quantitatively analysed the morphology and structure of NMJs in SMA fetuses and postnatal samples using confocal and electron microscopy. Our aim was to define the role played by the NMJ in the pathogenesis of SMA in humans.

Materials and methods

Human samples

This project was approved by the Ethics Committee at Hospital de Sant Pau in accordance with the Declaration of Helsinki. Family consent was obtained in all cases. Fetal material was obtained immediately after elective terminations of pregnancies. Gestational age was determined from the last menstrual period and from ultrasound measurements. In couples who had previous offspring with type I or type II disease, prenatal SMN tests in present pregnancies [20] identified fetuses predicted to develop SMA (Table 1). The quality of all tissue samples was rigorously assessed through visual and histological examination, and only well-conserved samples were selected for study. Samples included three control fetuses of 10, 14, and 18 weeks' gestation; four type I SMA specimens of 12 ($n = 2$) and 14 ($n = 2$) weeks' gestation; and one SMA type II of 14 weeks. Intercostal muscle and muscle from the diaphragm and upper and lower limbs were collected.

Postnatal material was obtained from intercostal and quadriceps muscle (controls = 3; type I SMA = 2) and was processed following the same protocol as that for fetal samples.

Immunofluorescence

Freshly dissected muscles were embedded in tissue freezing medium, snap-frozen in nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C . Unfixed cryostat serial sections (15 or 50 μm thick) were collected on gelatine-coated slides and dried at room temperature before immunostaining. Serial sections of muscle

were fixed in acetone and permeabilized with 0.1% Triton X-100 PBS. After blocking for non-specific binding, sections were incubated with the primary antibody overnight at 4°C . The primary antibodies used were mouse anti-gamma acetylcholine receptors (AChR γ) (1/100; Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-synaptophysin (SyPhy) (1/100; Abcam), and mouse anti-SMN (1/300; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA). After three washes, slides were incubated for 1 h with Cy3-labelled goat anti-mouse IgG (1/500; Jackson, Newmarket, UK) and Alexa-488-labelled goat anti-rabbit IgG or Alexa-647-labelled goat anti-rabbit IgG (1/500; Invitrogen, Oregon, USA). Sections were then immunolabelled using an Alexa Fluor 488-conjugated anti-neurofilament (NF) (1/250; Millipore, Billerica, MA, USA) or alternatively using an Alexa Fluor 555-conjugated α -bungarotoxin (1/500; Invitrogen) to identify postsynaptic AChRs. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; invitrogen) for nuclear localization. As a negative control, sections were incubated omitting primary antibodies. Normal spinal cord and muscle were used as positive controls of the primary antibodies. Images were obtained using an SP5 Leica confocal microscope. Z-stack projections were made from serial scanning every 0.5 μm to reconstruct the NMJ. Three-dimensional (3D) projections were blindly examined at various magnifications.

Electron microscopy

An ultrastructural comparison between control and SMA samples was undertaken at 14 weeks of gestational age in diaphragm and intercostal muscles. These muscles are densely innervated, facilitating the finding of NMJs in an electron microscope. Slices were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4, for 24 h. The samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, block-stained with uranyl acetate, dehydrated, and embedded in Embed 812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA). Semi-thin sections (1 μm) were cut on an ultramicrotome and stained with toluidine blue. Regions containing NMJs and intramuscular nerve fibres were examined by light microscopy for further ultra-thin sectioning. Ultra-thin sections (60–90 nm) were taken from selected areas, counterstained with lead citrate, and observed with a Zeiss EM 910 electron microscope.

NMJ measurements

For all quantitative and morphometric studies in NMJs, we used Nikon NIS-Elements Documentation imaging software (version 3.03). In transversal immunofluorescence images, we determined the proportion of myotube perimeter that corresponded to positive acetylcholine receptor (AChR) signal in a total of 740 NMJs. Data were statistically analysed with one-way ANOVA followed by *post-hoc* Scheffé pairwise comparison ($p < 0.05$). We also analysed the maximum peak ratio between SyPhy and AChR,

Synaptic defects in spinal muscular atrophy

by measuring the fluorochrome signals along a line (10 μm) drawn across the presynaptic and postsynaptic membrane to delimit their intensity profiles. Mean ratios \pm SEM were analysed using the Kruskal–Wallis test ($n = 155$ NMJs) ($p < 0.05$, CI = 95%).

On electron micrographs, measurements were taken from motor endplates. They included synapsing and non-synapsing presynaptic boutons, synapsing and non-synapsing abnormal boutons, active zones, nerve terminal areas, and synaptic vesicles per terminal (Table 2). The density of synaptic vesicles was determined as the ratio of the number of synaptic vesicles per nerve terminal area. Using Fisher's exact test, we examined the association between two variables in a 2×2 contingency table with a level of significance of $p < 0.05$. For ratio measures, we used the t -test to compare the mean values of controls versus SMA vesicles per μm^2 . All statistical analyses were conducted using SPSS18.

Results

Confocal microscopy studies

Pattern of NMJ development in controls

AChRs are composed of various subunits, and the gamma subunit (fetal type) switches to the epsilon subunit (adult type) later during development [21,22]. We therefore performed an expression analysis of the AChR γ together with SyPhy and NF at several stages of development (Figure 1). At 10 weeks of fetal development, AChR γ started to cluster in the myofibres in proximal and distal limbs. A group of axons which innervated these clustered AChRs was visualized by means of NF labelling. SyPhy stain localized in close opposition to AChR clusters and revealed weak expression in preterminal nerves. Around 14 weeks, aggregation of AChRs consolidated, forming a plaque at the postsynaptic

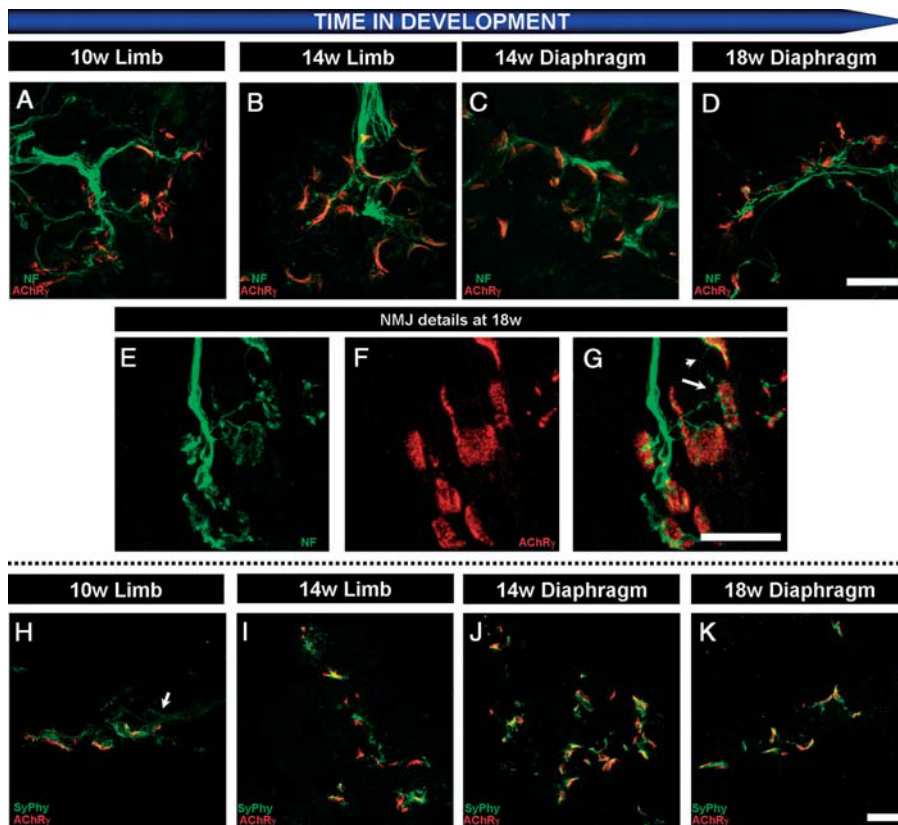


Figure 1. Pattern of NMJ structure in controls. Confocal microscope images of double fluorescent-labelled NMJs in control samples, at 10 (A, H) 14 (B, C, I, J) and 18 weeks (D–G, K). Panels A–G: Postsynaptic receptors were immunostained with a monoclonal antibody against the gamma subunit of AChRs (AChR γ in red) and nerve cytoskeleton using neurofilament (NF in green). (A) Early clusterization of AChRs was demonstrated at 10 weeks apposed to NF. (B, C) Comparison of the NMJ in limb and diaphragm at 14 weeks. No differences can be seen between the two muscles. (D) At 18 weeks, AChRs become more compact and the complexity of the innervation pattern decreases as development progresses. (E–G) Higher magnification of nerves and NMJ at 18 weeks. The arrow in G indicates what appears to be an individual axon innervating a plaque. The arrowhead denotes a small axonal sprout. Panels H–K: IF of AChR γ in red and synaptophysin (SyPhy) in green. The degree of SyPhy co-localization with AChRs increases from 10 to 18 weeks. (H) AChR plaques were apposed to SyPhy that was also weakly expressed in preterminal nerves (arrow). (I, J) SyPhy was concentrated and apposed to AChRs. (K) SyPhy borders tend to sharpen. Scale bar = 20 μm .

apparatus that was in contact with multiple axonal branches. Positive SyPhy was concentrated at the endplates and overlapped with AChRs (see Supplementary Figures 1A–1D). At 18 weeks, NMJs were well defined; SyPhy was apposed to AChR clusters; and the innervation pattern was simplified in comparison to earlier stages. In some NMJs, we observed what appeared to be individual axons innervating a plaque. No remarkable differences were observed between the different muscles analysed.

NMJ findings in SMA

A variable degree of changes was observed in AChR patterning in fetuses with severe SMA (Figure 2). At 12 weeks, in some areas of SMA muscle we found early disassembly of postsynaptic receptors innervated by multiple axons. Normal-like appearance of postsynaptic receptors was also observed (see Supplementary Figure 2). SyPhy stain revealed zones with an increased density of presynaptic vesicles. These

vesicles accumulated in distal nerve branches near synaptic sites and were not observed in proximal regions and intramuscular nerve trunks. This was in clear contrast with control samples in which synaptic vesicles were localized in highly immunoreactive spots facing the clustered postsynaptic AChRs (Figure 1 and Supplementary Figure 1). At 14 weeks, however, AChRs showed a disaggregate distribution around the myotubes compared with the well-defined postsynaptic sites with densely packed AChRs seen in controls. The severely fragmented AChR clusters were usually associated with presynaptic terminals visualized after SyPhy and NF immunostaining (Supplementary Figures 1 and 3). Multiple axons were observed in contact with these dispersed AChRs, sometimes showing irregular branching in comparison with controls. SyPhy was expressed at the end of these terminals and we also observed that vesicles were accumulated in preterminal zones. At this level of detection, we were unable to observe clear differences between SMA fetuses with one *SMN2* copy and those with two *SMN2* copies

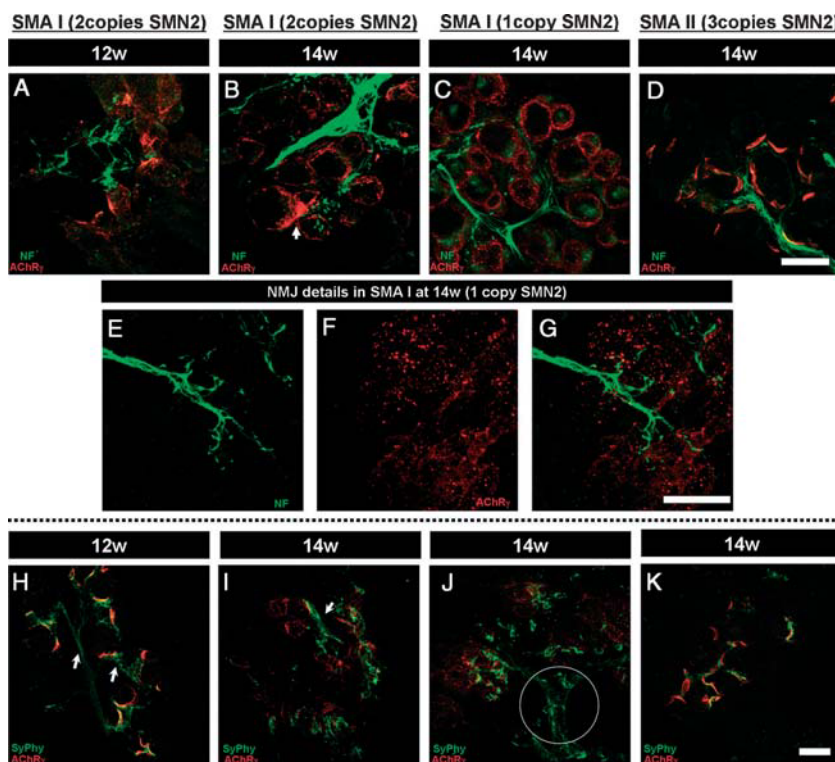


Figure 2. Morphology of NMJs in SMA fetuses. Representative confocal micrographs of NMJs of the diaphragm and limbs of type I SMA at 12 weeks (A, H), type I SMA with two copies of *SMN2* at 14 weeks (B, I), type I SMA with one copy of *SMN2* at 14 weeks (C, E–G, J), and type II SMA with three copies of *SMN2* at 14 weeks (D, K). Panels A–G: IF of AChRy in red and NF in green. (A) Dispersion of AChRs apposed to NF. (B) An isolated AChR cluster (arrowhead) is observed in type I SMA with two copies of *SMN2*. (C) In this sample, expression of AChRs is predominantly detected around the myotubes. Note the degree of changes in AChRs in severe SMA fetuses according to developmental time and *SMN2* copies. (D) In type II SMA, the pattern of AChRs and NF is in clear contrast to type I SMA samples, but similar to controls (see Figure 1). (E–G) Higher magnification of NMJs in SMA at 14 weeks showing the severe fragmentation of AChRs and the poor arborization of terminal nerves. Panels H–K: Details of SyPhy expression in SMA fetuses immunostained in green and AChRy in red. (H) A 'normal-like' appearance of AChR clusters with accumulation of SyPhy in preterminal nerves (arrows) at 12 weeks. (I, J) Density of vesicles was also high at 14 weeks (arrow in I), where a nerve can be recognized with SyPhy staining (circle in J). (K) No abnormal expression of SyPhy was seen in SMA type II samples. Scale bar = 20 μ m.

Synaptic defects in spinal muscular atrophy

Table 1. Gestational age, phenotype, and genetic status of the fetal samples analysed, and clinical data regarding previous SMA children in each family. Note that SMA fetuses were collected from pregnancy terminations after confirming a homozygous deletion of exons 7 and 8 of the *SMN* gene

Sample	Weeks	Phenotype	<i>SMN1</i> exon 7–8	<i>SMN2</i> copies*	Previous child with SMA	
					Onset	Death
1	10	Control	+/+	2	na	na
2	14	Control	+/+	2	na	na
3	18	Control	+/+	2	na	na
4	14	SMA I	-/-	2	1 m	7 m
5	14	SMA I	-/-	1	Birth	14 d
6	12	SMA I	-/-	2	1 m	7 m
7	12	SMA I	-/-	2	2 m	8 m
8	14	SMA II	-/-	3	14 m	No

**SMN2* copies were identical in the respective affected child. na = not applicable; d = days; m = months.

Table 2. Ultrastructural analysis of the NMJ from control and SMA diaphragm and intercostal muscles at 14 weeks. The first group of data included a set of general parameters describing morphometry of nerve endings in a total of 666 control nerve terminals (from 48 NMJs) and 547 SMA nerve terminals (from 46 NMJs). The second group reflects data extracted from individual axon terminals containing synaptic vesicles (from a total of 357 control and 310 SMA nerve terminals). Axon terminals in contact with the muscle membrane were considered as synapsing boutons, while axon terminals containing vesicles per total presynaptic terminals were considered vesicle-filled boutons. The active zone was defined as a cluster of synaptic vesicles associated with focal presynaptic membrane densification. Aberrant boutons were considered as dark axoplasm containing an accumulation of synaptic vesicles and electron-dense material, as described in neonatal rat muscle fibres [53]. Morphometric results are expressed as percentages. Note that all boutons in controls have a normal appearance and that aberrant terminals are basically observed in SMA cases. Abnormal terminals are also seen when boutons are in contact with the muscle membrane. The number of vesicle-filled abnormal terminals was also significantly higher in SMA

	Diaphragm			Intercostal		
	Control	SMA	<i>p</i> -Value	Control	SMA	<i>p</i> -Value
<i>General MEP morphology</i>						
Synapsing boutons	(73/237) 30.8%	(58/247) 23.5%	0.082	(94/429) 21.9%	(80/300) 26.7%	0.158
Active zones	(32/73) 43.8%	(12/58) 20.7%	0.006*	(38/94) 40.5%	(22/80) 27.5%	0.081
Abnormal boutons	(0/237) 0%	(59/247) 23.9%	<0.001*	(8/429) 1.8%	(113/300) 37.7%	<0.001*
Abnormal synapsing boutons	(0/73) 0%	(18/58) 31.0%	<0.001*	(0/94) 0%	(29/80) 36.2%	<0.001*
<i>Detailed nerve terminal morphology</i>						
Vesicle-filled boutons	(45/122) 36.9%	(37/95) 38.9%	0.779	(92/235) 39.1%	(74/215) 34.4%	0.328
Abnormal vesicle-filled boutons	(0/45) 0%	(16/37) 43.2%	<0.001*	(1/92) 1.1%	(39/74) 52.7%	<0.001*
Synapsing vesicle-filled boutons	(22/45) 48.9%	(22/37) 59.4%	0.380	(37/92) 40.2%	(29/74) 39.2%	1.000
Abnormal synapsing vesicle-filled boutons	(0/22) 0%	(8/22) 36.3%	0.004*	(0/37) 0%	(12/29) 41.4%	<0.001*

*Statistical significance.

(Supplementary Figure 1). However, in some sections of the sample with one *SMN2* copy, we observed a tendency towards a more pronounced disaggregation of AChRs. It is worth mentioning here that most type I cases reported in the literature have two *SMN2* copies [23,24], as did two of our SMA fetal samples (Table 1) and our two postnatal SMA samples (see below).

NF labelling was intense in intramuscular nerves in both control and SMA samples and often vanished in SMA SyPhy-rich nerve terminals. Furthermore, we observed swellings in diaphragm intramuscular nerves and in ramifying terminal nerves. These axonal beads were rarely observed in controls (Figure 3).

Interestingly, in the sample predicted to develop type II SMA, that is, the sample carrying three *SMN2* copies (Table 1), the shape and topography of NMJs were similar to those observed in controls (Figure 2 and Supplementary Figure 3).

Quantitative measurements of the distribution of the AChR signal in myotube membrane surfaces showed a significant difference between controls and type I SMA

NMJs ($p < 0.0001$) but not between controls and SMA type II NMJs ($p < 0.521$) (Figure 4A). Maximum peak ratios between SyPhy and AChR fluorescence signals of the densitometric analysis were significantly different between controls and SMA at 14 weeks ($p < 0.05$) (Figures 4B and 4C).

Analysis of postnatal samples

Based on the defects found in SMA development, we analysed the NMJs in controls and postnatal type I SMA samples. In controls, innervated motor endplates (MEPs) stained with α -bungarotoxin had the appearance of mature NMJs with few isolated fibres expressing remnants of AChR γ (Figures 5A–5D). In postnatal SMA samples, we observed the known pattern of large groups of atrophic fibres intermixed with fascicles of hypertrophic fibres in both innervated and non-innervated regions (Figures 5E–5H). Non-innervated NMJs showed a broad and persistent expression of AChR γ , and a simplified synaptic apparatus without

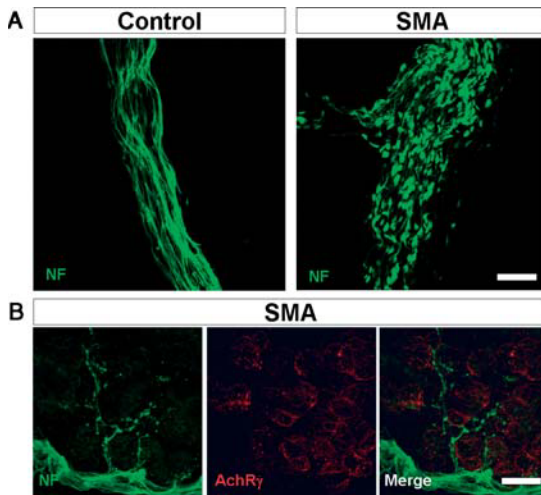


Figure 3. Axonal swellings and preterminal beads observed in severe SMA fetuses. (A) Comparison of intramuscular nerves in control and type I SMA samples. Axonal swellings are often present in severe SMA. (B) Terminal beads observed in SMA NMJs together with the consistent finding of disaggregated AChRs (see matching controls in Figure 1). Scale bar = 20 μ m.

traces of staining for SyPhy or NF (Supplementary Figure 4). Several groups of fibres showed remnants of AChRs surrounding the muscle fibre. In innervated regions, axons reached simplified postsynaptic receptors and some were retracted with a swollen end appearance. We also observed abnormal NF aggregates.

SMN expression

To investigate whether SMN is involved in NMJs of prenatal and postnatal samples, every stack of confocal micrographs was carefully analysed. In control samples, SMN was detected in the cytoplasm and nucleus, and was intensely stained in nuclear gems. In prenatal control muscle, no clear co-localization of SMN was shown with presynaptic or postsynaptic markers, but dot-like structures were present in cytoplasm (Supplementary Figure 5). SMN expression was higher in prenatal muscle than in postnatal muscle and lower in SMA than in controls (data not shown). In some postnatal NMJs, positive SMN immunostaining was detected co-localizing with α -bungarotoxin (Supplementary Figure 6).

Electron microscopy studies

Ultrastructure pattern of NMJ development in controls

At 14 weeks, myotubes were innervated by multiple nerve terminals in contact with the muscle membrane (Figures 6A–B and 6E–F). Some of these terminals were incompletely surrounded by a single Schwann cell. Within the light axoplasm of presynaptic boutons, we observed vesicles that formed active zones, a few mitochondria (some showed artefactual disruption), and numerous neurofilaments. At this stage,

we observed a few myotubes that appeared to form primary synaptic clefts and other myotubes without depression in their surface. Myotubes were surrounded by a rudimentary basal lamina.

Intramuscular nerves were characterized by unmyelinated axons enclosed by Schwann cells. These axons presented light axoplasm which contained numerous neurofilaments and occasional mitochondria with a dark matrix (Figures 7A–7C).

NMJ ultrastructure in SMA

As observed in control samples, SMA motor endplates at 14 weeks consisted of several terminal axons filled with synaptic vesicles and a few of these boutons were in contact with the postsynaptic membrane. However, a proportion of these terminals showed electron-dense material that had dark axoplasm compared with the light axoplasm seen in controls. Furthermore, we observed a condensation of synaptic vesicles that was rarely observed in controls (Figures 6C–D and 6G–H).

Some intramuscular nerves showed abnormal axons bearing varicosities and other axons with accumulation of tubulovesicular structures and electron-dense material (Figures 7D–7F). These results were compatible with the swellings seen in confocal studies. These features were rarely observed in controls.

At 12 weeks, the aspect of SMA NMJs resembled that of controls (Figures 8A–8C). However, an abnormal accumulation of synaptic vesicles was observed in electron-lucent axoplasm, particularly in presynaptic boutons which were not in contact with the muscle cell (Figures 8D–8F). The dense aggregation observed in dark and electron-lucent cytoplasm in SMA was in agreement with the preterminal accumulation of vesicles seen in our immunofluorescence (IF) studies.

Morphometric analysis of control and SMA NMJs

Table 2 summarizes the morphometric results. It provides a general description of the MEP organization and a detailed report of individual nerve terminal ultrastructure including synaptic vesicles. The number of presynaptic terminals and the proportion of terminals in contact with the postsynaptic membrane were similar in controls and SMA. Very few nerve terminals in controls displayed signs of abnormal ultrastructure, while a higher percentage of SMA terminals—including those contacting postsynaptic membrane—appeared aberrant ($p < 0.05$). The number of abnormal terminals containing vesicles was also significantly higher in SMA. The number of active zones was clearly lower in SMA.

The mean number of vesicles and the mean area of nerve terminals were similar in control and SMA samples. However, the ratio between the mean number of vesicles and the mean area per terminal was higher in SMA samples (control ratio = 63.95 versus SMA ratio = 95.13) ($p < 0.05$). These results indicate a higher density of vesicles in SMA terminals.

Synaptic defects in spinal muscular atrophy

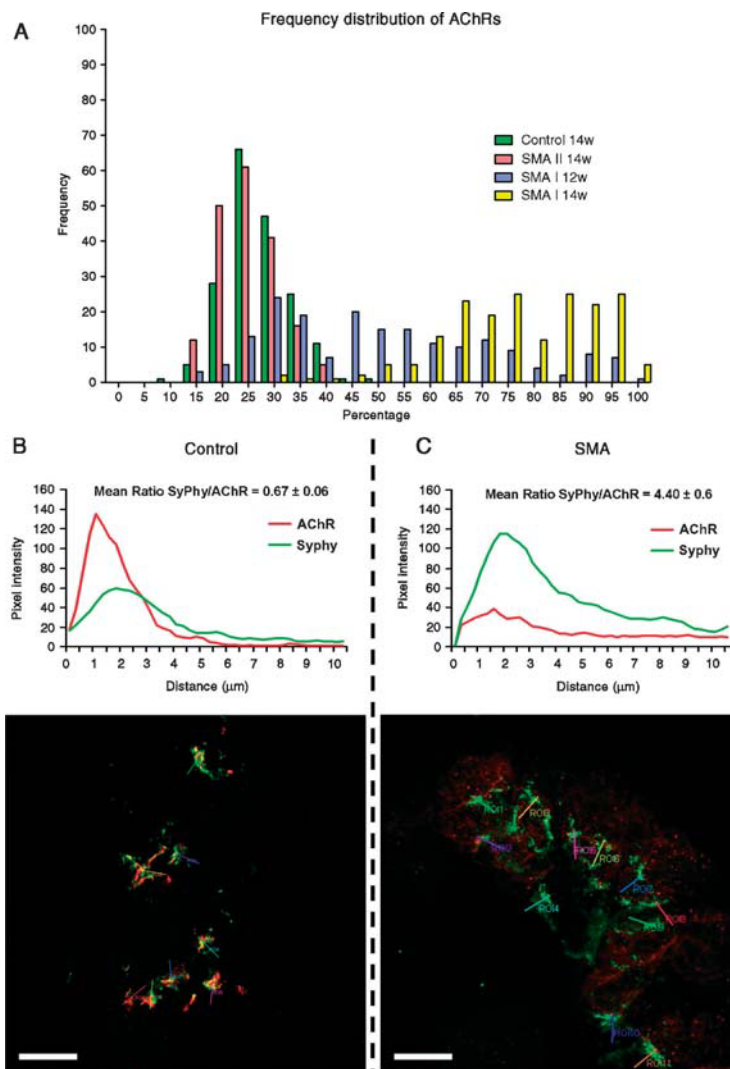


Figure 4. Quantitative studies of NMJs. (A) Histogram showing the frequency distribution of AChRs in control and SMA fetuses (GraphPad Prism Software). Values are expressed as a percentage of AChR occupancy around the perimeter of the myotubes. Controls and type II SMA samples show a similar distribution of percentages. In type I SMA at 12 weeks, the distribution of AChR overlaps with those of controls and type I SMA at 14 weeks. Note that in type I SMA at 14 weeks, the percentages of AChRs distributed along the myotube perimeter are significantly higher than controls. Panels B and C: Intensity profiles of SyPhy (in green) and AChR (in red) obtained after measuring the fluorochrome signals along a line (10 μm) crossing presynaptic and postsynaptic membrane in controls (B) and SMA (C) samples. Note the high intensity peak of AChR in controls and the flat distribution in SMA, which is compatible with dispersion of AChRs. In contrast, SyPhy signal is lower in controls but markedly high in SMA, reflecting presynaptic accumulation of vesicles. The mean ratio \pm SEM of SyPhy/AChRs was clearly different between controls and SMA NMJs. The images in the lower part of panels B and C illustrate the different lines drawn in the NMJs (ROI = region of interest). Scale bar = 20 μm .

We did not detect significant differences between the diaphragm and intercostal muscles in SMA fetuses.

Discussion

In this systematic analysis of control and SMA human fetuses, we found novel histological evidence of early maturation defects in NMJs in type I SMA disease during development. In SMA fetal samples, the defects

observed in IF studies were reflected as ultrastructural alterations in NMJs. The main findings were alterations in AChR clustering, misplacement and accumulation of synaptic vesicles far from release sites, and terminal nerve abnormalities.

AChR clusters are more susceptible to disassembly after denervation during development than in postnatal life [25]. During development, although pre-patterned AChRs appear to be nerve-independent, motor axons are essential to localize, maintain, augment, and

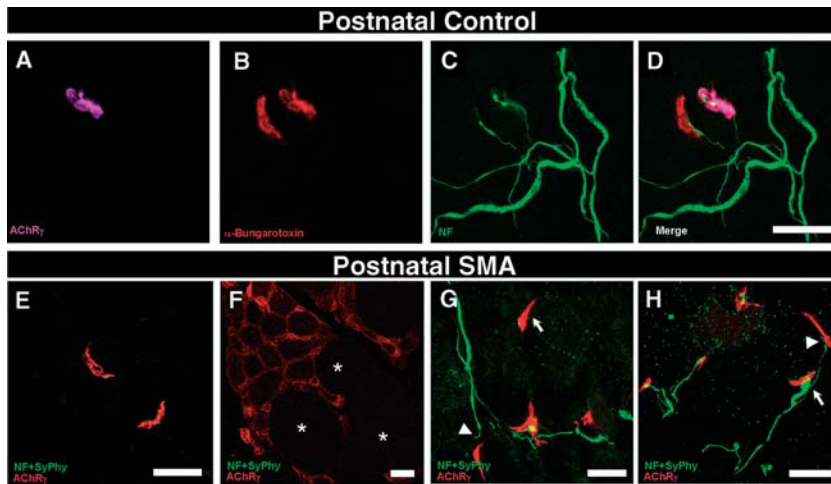


Figure 5. Postnatal NMJs in control and SMA samples. Panels A–D: Control infant NMJs immunolabelled for AChR γ (in fuchsia), α -bungarotoxin (in red), and NF (in green). Expression of the fetal subunit of AChRs was barely observed in isolated NMJs. Panels E–H: Representation of NMJ morphologies and shapes immunolabelled for AChR γ (in red) and NF and SyPhy (in green) in postnatal SMA samples (less than 1 year of age). (E, F) Non-innervated MEPs. (E) Atrophic fibres with a 'control fetal-like' NMJ appearance. (F) Disperse expression of AChRs around muscle fibres. No expression was observed in hypertrophic fibres (*). (G, H) Innervated MEPs. (G) An isolated non-innervated MEP (arrow) and an axon that terminates in a 'retraction-bulb' close to a cluster of AChRs (arrowhead). (H) A retracting thin axon close to a cluster of AChRs (arrowhead) is seen near a MEP that has an abnormally high accumulation of NF (arrow). Scale bar = 20 μ m.

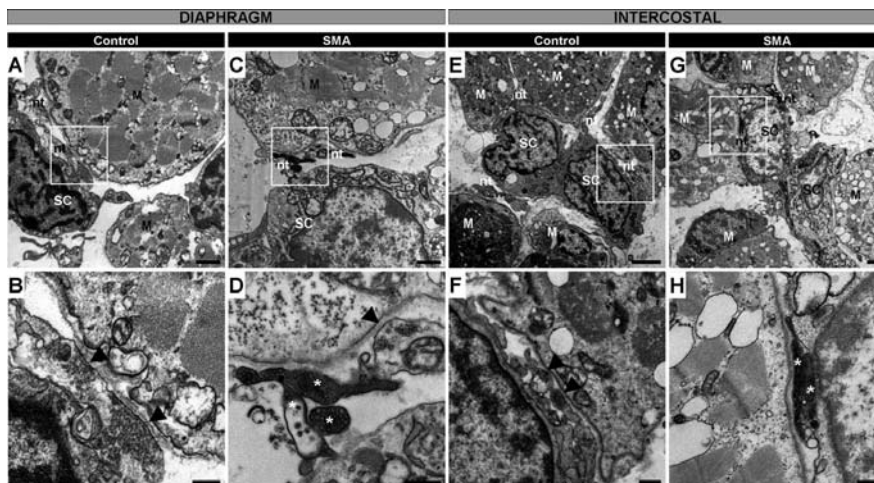


Figure 6. Defects in terminal nerves in severe SMA. Electron microphotographs of NMJs in diaphragm (A–D) and intercostal muscles (E–H) in control (A, B, E, F) and type I SMA samples (C, D, G, H), at 14 weeks of development. (A, E) In control samples, nerve terminals are close to the postsynaptic muscle membrane, representing polyaxonal innervation at this stage of development. (E) Note that various myotubes are innervated by the same nerve bundle. (B, F) Higher magnification of NMJ from the squares outlined in A and E; dense synaptic vesicles form active zones apposed to a myotube membrane (arrowheads). (C, G) Appearance of NMJs in SMA at lower magnification. Note the darkness in terminal zones compared with controls, suggesting degeneration of terminals. (D, H) NMJ details from C and G (squares); the arrowhead in D indicates a 'normal-like' bouton with active zones. Abnormal terminals are characterized by dark axoplasm and accumulation of synaptic vesicles (*). M = myotube; nt = nerve terminal; SC = Schwann cell. Scale bars = 1 μ m (A, C), 5 μ m (E, G), 0.3 μ m (B, D), and 0.5 μ m (F, H).

stabilize the postsynaptic apparatus at the site of nerve contact, preventing dispersion of their components and promoting local expression of synaptic proteins [25,26]. In this study, type I SMA samples at 12 weeks showed the co-existence of clustered and dispersed AChRs. However, at 14 weeks we observed a major dispersion of these postsynaptic receptors. It is thus

reasonable to assume that destabilization of NMJs may occur in SMA once the axons reach their muscle target.

The accumulation of synaptic vesicles in preterminal axons of severe SMA fetuses was detected by histological analysis and confirmed by ultrastructure studies. Morphometric comparison of control and SMA muscles revealed an increase in aberrant terminals, a higher

Synaptic defects in spinal muscular atrophy

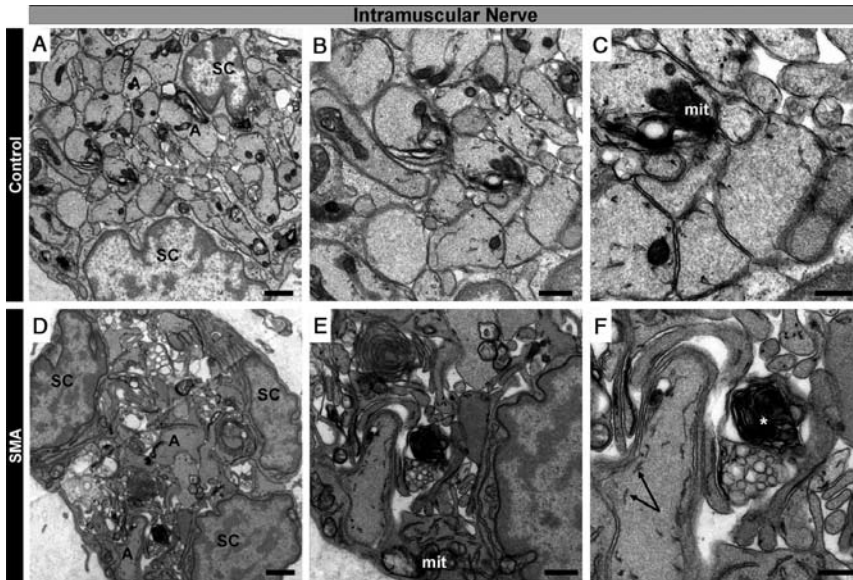


Figure 7. Intramuscular nerve morphology. Different magnifications of an intramuscular nerve in control (A–C) and type I SMA (D–F). (A–C) Bundles of axons are surrounded by Schwann cells. (D–F) A darker intramuscular nerve with axons presenting tubulovesicular structures (arrows in F) and an abnormal structure compatible with a degenerated axon close to normal-like axons (* in F). A = axon; SC = Schwann cell; mit = mitochondria. Scale bars = 1 μm (A, D), 0.5 μm (B, E), and 0.3 μm (C, F).

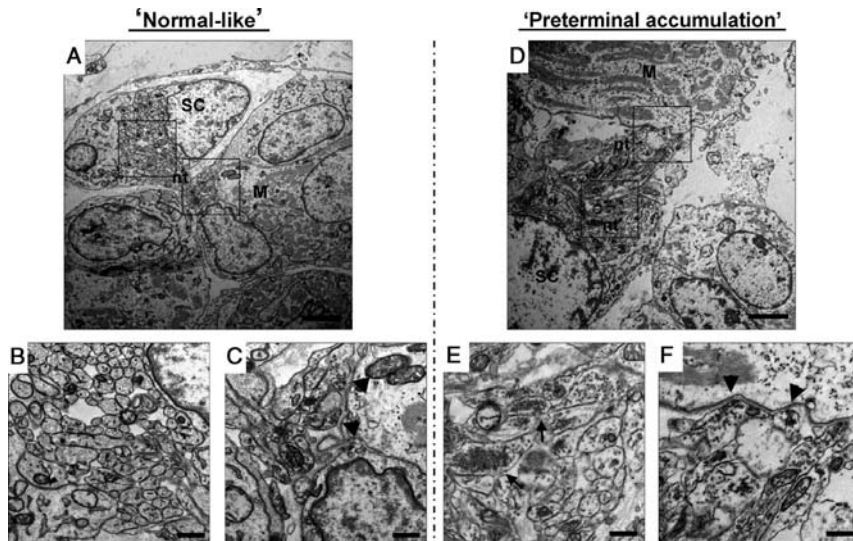


Figure 8. Electron micrographs of type I SMA at 12 weeks. Panels A–C: ‘Normal-like’ NMJ. (A) Lower magnification showing the components of the NMJ. (B) higher magnification from the upper square in A showing preterminal nerves without accumulation of synaptic vesicles. (C) Higher magnification from the lower square in A showing the active zones (arrowheads) apposed to the muscle membrane. Panels D–F: NMJ with preterminal accumulation of vesicles. (D) Lower magnification of an NMJ. (E) Higher magnification from the lower square in D showing accumulation of synaptic vesicles in preterminal nerves (arrows). (F) Higher magnification from the upper square in D; a few nerve terminals filled with vesicles are in touch with the muscle membrane. Regions of nerve terminals immediately in front of the myotube form active zones (arrowheads). M = myotube; nt = nerve terminal; SC = Schwann cell. Scale bars = 5 μm (A) and 0.5 μm (B, C).

density of vesicles, a reduction of active zones, and the presence of abnormal axons in intramuscular nerves in SMA, suggesting early degeneration of the motor unit in SMA. Defects in the release of synaptic vesicles have been reported in severe SMA mice, such as

an abnormal distribution of synaptic vesicles within presynaptic terminals [27], fewer active zones related to a down-regulation of voltage-gated calcium channels [28], and a decrease in the quantal release of neurotransmitter [27,29,30]. Together with the abnormal

preterminal accumulation of vesicles found in our fetal SMA samples, these findings suggest that impaired synaptic vesicle release is a major problem in SMA, supporting the importance of NMJ pathology in this disease.

Besides presynaptic and postsynaptic defects, we observed axonal swellings. These were most marked in diaphragm SMA samples and barely detected in control samples. This suggests that even though axonal swellings may be present in normal development, they are much more predominant in SMA. Swollen axons in SMA were first described in biopsies from patients [31] but they have also been described in neuropathies such as spastic paraplegia [32]. They are characterized by abnormal accumulation of organelles and cytoskeletal components. Although their role in SMA pathogenesis is unknown, their presence may reflect defects in axonal transport [32]. Indeed, axonal transport has been proposed as a function for SMN in neuronal cells [33,34]. Interestingly, the type II SMA fetus with three *SMN2* copies showed none of the synaptic defects observed in the severe SMA cases that harboured one or two *SMN2* copies. These novel data confirm that type I SMA is a developmental disorder resulting from a lower amount of SMN protein and that type II cases, which develop disease later, have no conspicuous neuromuscular pathology at 14 weeks of development.

In the SMA postnatal scenario, non-innervated muscle fibres showed a fetal-like appearance. Clustered AChRs resembled those in control fetuses and dispersed AChRs surrounding the muscle fibres resembled those in SMA fetuses. Similar AChR γ expression has been observed in atrophic fibres of other human neuromuscular disorders [35]. According to Hesselmanns *et al*, transition from fetal to adult-type AChRs occurs in humans from 31 weeks onwards [21]. Isolated NMJs expressing AChR γ were observed in our infant control samples. In contrast, the broad and persistent expression of AChR γ in postnatal SMA supports delayed development and maturation in these structures. In this respect, abnormalities in AChR aggregation have been reported in muscle cells from type I SMA patients [36]. In addition, we observed innervated regions where some axons reached postsynaptic receptors but others apparently did not. It is unclear whether these latter axons are an on-going denervation or a process of re-innervation from a collateral sprouting of the surviving nerves. We also observed abnormal aggregates of neurofilament proteins in some of these terminals, as previously described [37]. All of these findings are supported by cumulative evidence of synaptic defects found in SMA mouse models. These defects include accumulation of neurofilament proteins in distal axons and motor nerve terminals [38,39], early breakdown of NMJs [40,41], persistence of AChR γ transcripts in muscle, and delay in the 'plaque to pretzel' process of the NMJ maturation [27,37]. Down-regulation of presynaptic proteins and

a simplified presynaptic organization have also been recently reported [28].

SMN localization in NMJs was difficult to determine due to the ubiquitous SMN expression and the abundance of nuclei. While the presence of gems and dot-like structures [11,42,43] was obvious and definite in our prenatal samples, co-localization of SMN with presynaptic and postsynaptic markers could not be clearly distinguished. However, some postnatal NMJs showed a tendency to co-localize SMN with AChRs, as has been reported previously in mice [44]. Consistent with previous findings, the expression in SMA samples was lower than in controls [11,13].

To better define the role of SMN in NMJs and its pathogenesis in SMA, further detailed analyses of other muscle types during other developmental periods are needed. Such studies are hindered, however, due to the limited supply of human tissues suitable for high-resolution studies.

It is reasonable to assume that NMJs in severe SMA undergo a dynamic process of denervation–reinnervation during human development. The occurrence of early AChR clusters in developing muscles at 10–12 weeks in both control and type I SMA samples suggests that pre-patterned and nerve-independent AChR clustering is not affected by the disease. However, as normal development proceeds, the nerve-dependent mechanisms that are needed for further maintenance, refinement, and stabilization of AChR clusters at the vicinity of the nerve seem to fail in SMA. The altered organization of presynaptic nerve terminals and disaggregated AChRs observed at 14 weeks together with the immature appearance of these AChRs in postnatal samples would support this interpretation. Indeed, Ling *et al* [39] recently reported that loss of innervation in SMADelta7 mice may be attributed to defects in synapse maintenance. Insufficiency of secreted factors from motor neuron axons at the presynaptic apparatus may be at the core of the changes that we described in SMA. *SMN* may play an important role by regulating the axonal transport of molecules that are relevant for nerve–muscle interaction during the formation and maintenance of the NMJ. Immature motor neurons are prone to die after axonal injury. When axonal interruption occurs in immature animals, the resulting lack of neurotrophic signals induces programmed cell death or apoptosis [45–47]. Thus, if nerve terminals are unable to efficiently maintain functional NMJs, a dying-back process leading to motor neuron loss may start. This would explain previous findings in type I SMA fetuses, such as the increase of apoptotic neurons in the spinal cord [48–50] and the delay in muscle maturation [15]. On the other hand, SMA fetuses are able to form active synapses, express choline acetyltransferase [51], and perform muscle movements indistinguishable from control fetuses [52]. These facts, which are in apparent contradiction with our present results, could be explained by several factors, such as polyaxonal innervation, sprouting, a liquid fetal environment, an exquisite sensitivity of the

fetus to respond to stimuli, or other unknown mechanisms that may partially compensate for the innervation defects in SMA at this stage of development.

Our study shows that pathology in severe SMA starts in fetal development and that a defect in maintaining the initial innervation is an early finding of neuromuscular dysfunction. Further research is warranted to develop strategies to reverse the process of denervation, maintain activity of the NMJ, and improve maturity of the motor endplates.

Acknowledgment

We thank Ignasi Gich for help with statistics; Victoria Cusr, Cecilia Jiménez, and Nuria Torán for providing postnatal samples; Carme Casal and Eva Companys for technical support with confocal microscope imaging; and Carolyn Newey for her invaluable help in editing the manuscript. We also thank the consenting parents who made this study possible. This work was supported by the GENOME Project from Fundación Genoma España and Fundación Atrofia Muscular Espinal (FUNDAME), and by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria, FIS 08-0729/11-2606) to EFT and grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 2008-03001) to JEE. RMH is a recipient of predoctoral fellowship from FIS (PFIS 09/00023).

Abbreviations

AChR γ	gamma subunit of acetylcholine receptors
AChRs	acetylcholine receptors
IF	immunofluorescence
IgG	immunoglobulin G
MEP	motor endplate
NF	neurofilament
NMJ	neuromuscular junctions
PB	phosphate buffer
PBS	phosphate buffer saline
SEM	standard error of the mean
SMA	spinal muscular atrophy
<i>SMN1</i>	<i>Survival Motor Neuron 1</i> gene
<i>SMN2</i>	<i>Survival Motor Neuron 2</i> gene
SyPhy	synaptophysin

Author contribution statement

RMH conceived, carried out experiments, analysed data, generated figures, and wrote the manuscript. SBN contributed to the study design, analysed data, and wrote the paper. EAR, LA and MJB contributed to study design and data collection. MH helped to carry out experiments on electron microscope studies. JEE contributed to the study design and data interpretation. EFT was primarily responsible for this work, carried out study design and data interpretation, and wrote the manuscript.

References

1. Cusin V, Clermont O, Gerard B, *et al.* Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling. *J Med Genet* 2003; **40**: E39.
2. Munsat TL, Davies KE. International SMA consortium meeting (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 1992; **2**: 423–428.
3. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 1995; **52**: 518–523.
4. Fidzianska A. Ultrastructural changes in muscle in spinal muscular atrophy. Werdnig–Hoffmann’s disease. *Acta Neuropathol* 1974; **27**: 247–256.
5. Fidzianska A. Morphological differences between the atrophied small muscle fibres in amyotrophic lateral sclerosis and Werdnig–Hoffmann disease. *Acta Neuropathol* 1976; **34**: 321–327.
6. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 1996; **3**: 97–110.
7. Lippa CF, Smith TW. Chromatolytic neurons in Werdnig–Hoffmann disease contain phosphorylated neurofilaments. *Acta Neuropathol* 1988; **77**: 91–94.
8. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; **80**: 155–165.
9. Brahe C. Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better. *Neuromuscul Disord* 2000; **10**: 274–275.
10. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 1996; **15**: 3555–3565.
11. Burlet P, Huber C, Bertrand S, *et al.* The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1927–1933.
12. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, *et al.* The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1205–1214.
13. Soler-Botija C, Cusco I, Caselles L, *et al.* Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function? *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 215–223.
14. Hausmanowa-Petrusewicz I, Vrbova G. Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis. *Neuroreport* 2005; **16**: 657–661.
15. Martinez-Hernandez R, Soler-Botija C, Also E, *et al.* The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; **68**: 474–481.
16. Lewelt A, Krossschell KJ, Scott C, *et al.* Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 2010; **42**: 703–708.
17. Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, *et al.* Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol* 2005; **57**: 704–712.
18. Greensmith L, Vrbova G. Disturbances of neuromuscular interaction may contribute to muscle weakness in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 1997; **7**: 369–372.
19. Sleight JN, Gillingwater TH, Talbot K. The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Dis Model Mech* 2011; **4**: 457–467.
20. van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, *et al.* PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995; **345**: 985–986.
21. Hesselmann LF, Jennekens FG, Van den Oord CJ, *et al.* Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors. *Anat Rec* 1993; **236**: 553–562.

22. Liu Y, Padgett D, Takahashi M, *et al.* Essential roles of the acetylcholine receptor gamma-subunit in neuromuscular synaptic patterning. *Development* 2008; **135**: 1957–1967.
23. Cusco I, Barcelo MJ, Rojas-García R, *et al.* SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in sibs. *J Neurol* 2006; **253**: 21–25.
24. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, *et al.* Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 358–368.
25. Sanes JR, Lichtman JW. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Rev Neurosci* 2001; **2**: 791–805.
26. Witzemann V. Development of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* 2006; **326**: 263–271.
27. Kong L, Wang X, Choe DW, *et al.* Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 2009; **29**: 842–851.
28. Dachs E, Hereu M, Piedrafita L, *et al.* Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011; **70**: 444–461.
29. Ling KK, Lin MY, Zingg B, *et al.* Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 2010; **5**: e15457.
30. Ruiz R, Casanas JJ, Torres-Benito L, *et al.* Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 2010; **30**: 849–857.
31. Coërs C, Woolf AL. *The Innervation of Muscle. A Biopsy Study.* Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1959.
32. Tarrade A, Fossier C, Courageot S, *et al.* A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 3544–3558.
33. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, *et al.* Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 2003; **163**: 801–812.
34. Zhang H, Xing L, Rossoll W, *et al.* Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* 2006; **26**: 8622–8632.
35. Gattenlohner S, Schneider C, Thamer C, *et al.* Expression of foetal type acetylcholine receptor is restricted to type I muscle fibres in human neuromuscular disorders. *Brain* 2002; **125**: 1309–1319.
36. Arnold AS, Gueye M, Guettier-Sigrist S, *et al.* Reduced expression of nicotinic AChRS in myotubes from spinal muscular atrophy I patients. *Lab Invest* 2004; **84**: 1271–1278.
37. Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, *et al.* Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 2552–2569.
38. Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, *et al.* Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1439–1447.
39. Ling KK, Gibbs RM, Feng Z, *et al.* Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 185–195.
40. Mcgovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, *et al.* Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 2900–2909.
41. Murray LM, Comley LH, Thomson D, *et al.* Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 949–962.
42. Lefebvre S, Bulet P, Liu Q, *et al.* Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nature Genet* 1997; **16**: 265–269.
43. Young PJ, Le TT, Dunckley M, *et al.* Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN. *Exp Cell Res* 2001; **265**: 252–261.
44. Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1605–1614.
45. Casanovas A, Ribera J, Hukkanen M, *et al.* Prevention by lamotrigine, MK-801 and N omega-nitro-L-arginine methyl ester of motoneuron cell death after neonatal axotomy. *Neuroscience* 1996; **71**: 313–325.
46. Lowrie MB, Vrbova G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: review and hypothesis. *Trends Neurosci* 1992; **15**: 80–84.
47. Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990; **345**: 440–441.
48. Fidzianska A, Rafalowska J. Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol* 2002; **104**: 363–368.
49. Soler-Botija C, Ferrer I, Alvarez JL, *et al.* Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 420–426.
50. Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, *et al.* Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002; **125**: 1624–1634.
51. Soler-Botija C, Cusco I, Lopez E, *et al.* Choline acetyltransferase expression does not identify early pathogenic events in fetal SMA spinal cord. *Neuromuscul Disord* 2005; **15**: 253–258.
52. Parra J, Martínez-Hernández R, Also-Rallo E, *et al.* Ultrasound evaluation of fetal movements in pregnancies at risk for severe spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2011; **21**: 97–101.
53. Rosenthal JL, Taraskevich PS. Reduction of multi-axonal innervation at the neuromuscular junction of the rat during development. *J Physiol* 1977; **270**: 299–310.

SUPPORTING INFORMATION ON THE INTERNET

The following supporting information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Comparison of AChR clustering (AChR γ in red), innervation (NF in green), and synaptophysin expression (SyPhy in fuchsia) between controls (A–D) and SMA type I with two *SMN2* copies (E–H) and one *SMN2* copy (I–L).

Figure S2. Details of the different NMJ appearances observed in type I SMA fetuses at 12 weeks.

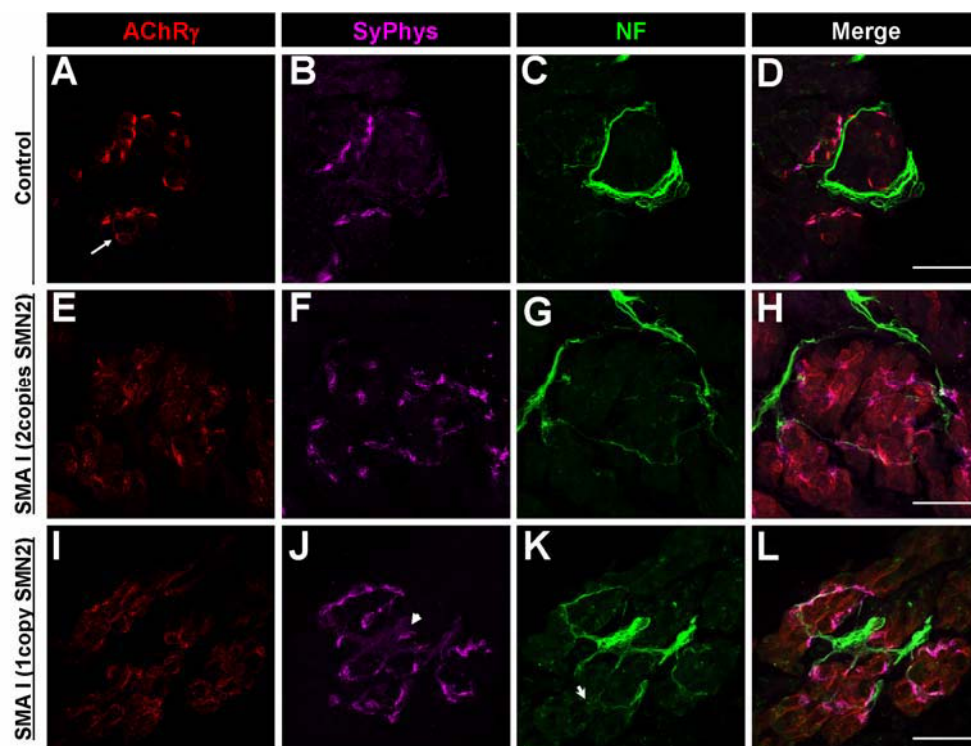
Figure S3. Comparison of fetal NMJ aspects in controls (A–D), SMA type II samples (E–H), and type I SMA (I–L) at lower magnification.

Figure S4. Comparison of control (A–D) and SMA (E–L) NMJ in postnatal samples.

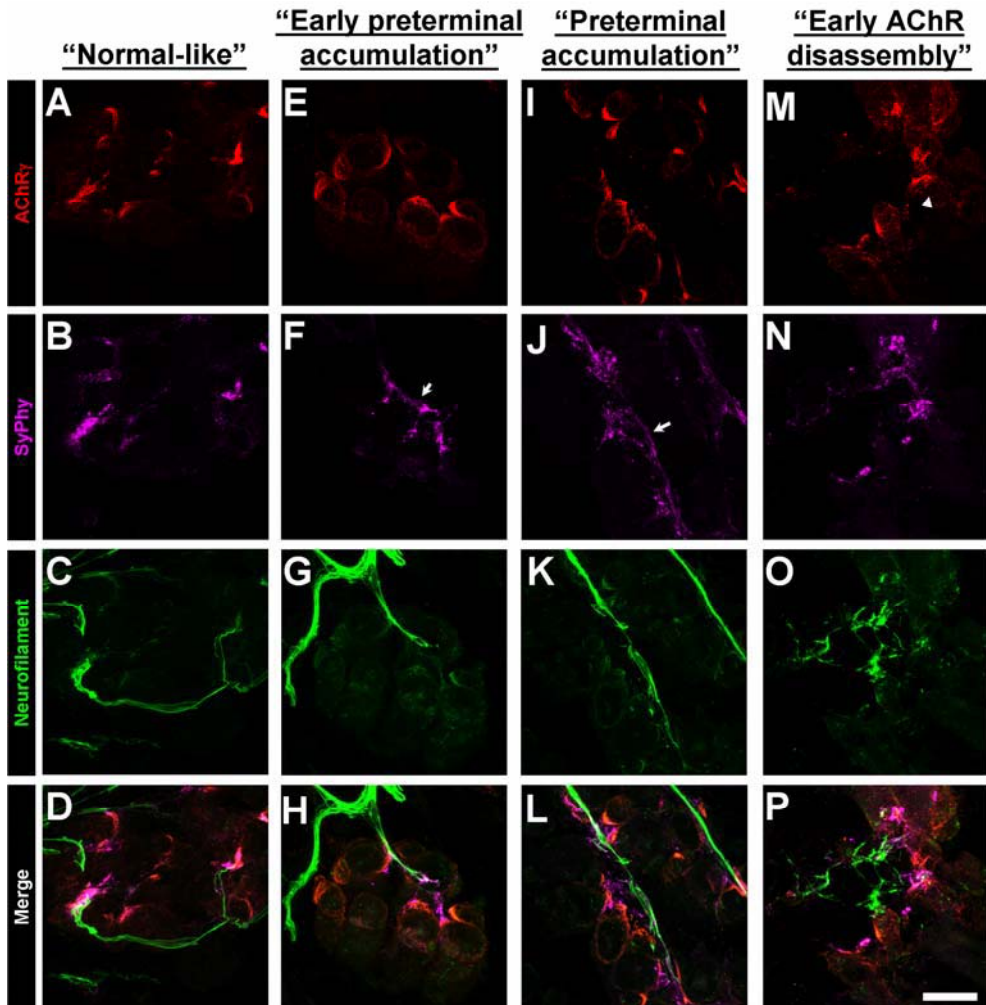
Figure S5. SMN expression in fetal samples.

Figure S6. SMN expression in postnatal samples.

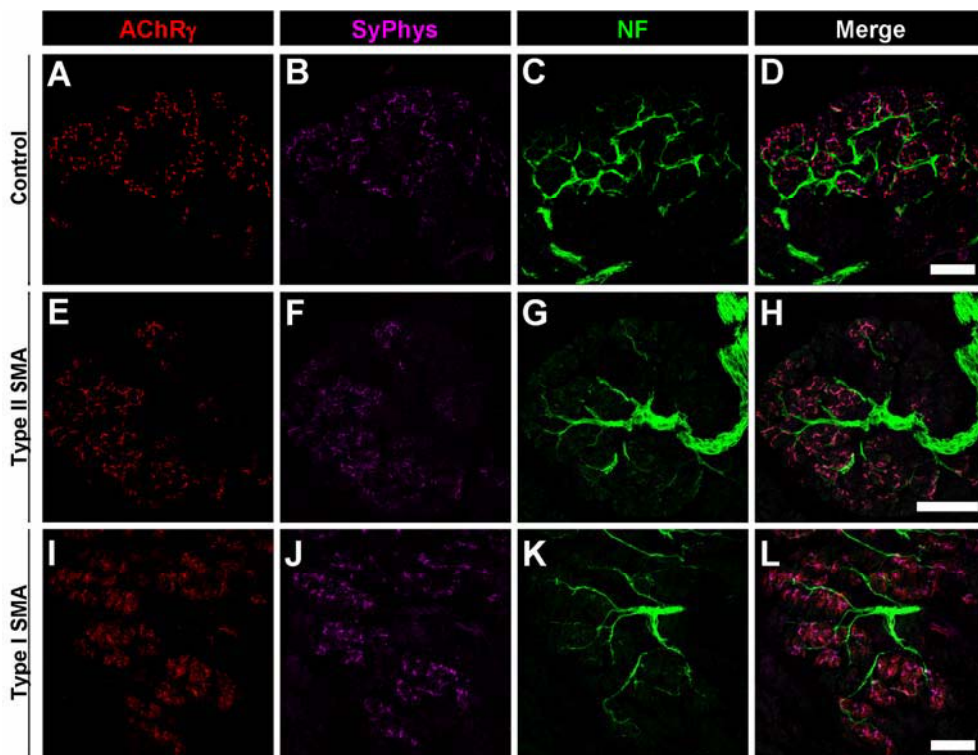
ONLINE SUPPORTING INFORMATION



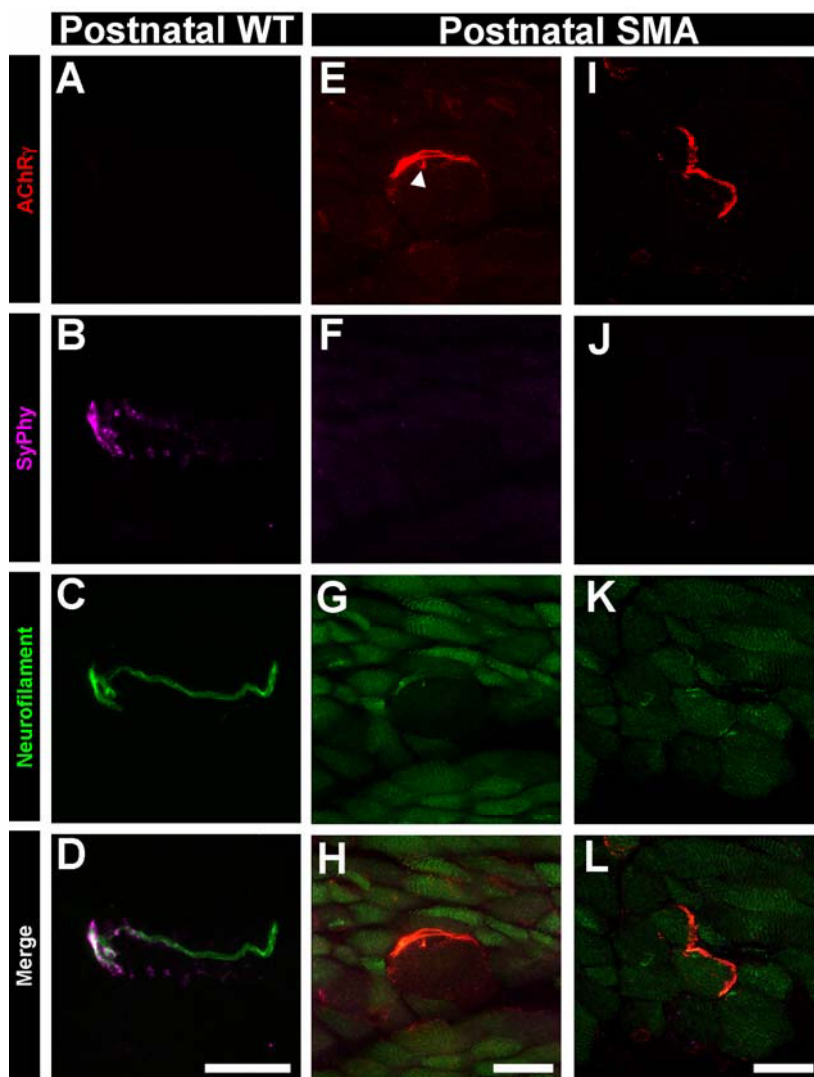
Supplementary Figure 1. Comparison of AChR clustering (AChR γ in red), innervation (NF in green) and synaptophysin expression (SyPhy in fuchsia) between controls (A-D) and SMA type I with two SMN2 copies (E-H) and one SMN2 copy (I-L). Arrow in A shows a non-innervated AChR cluster related with a secondary myotube. Arrowhead in J indicates accumulation of synaptic vesicles in the most distal part of preterminal nerves. Note that NF vanishes at the end of the terminal in panel K (arrow). Scale bar 20 μ m.



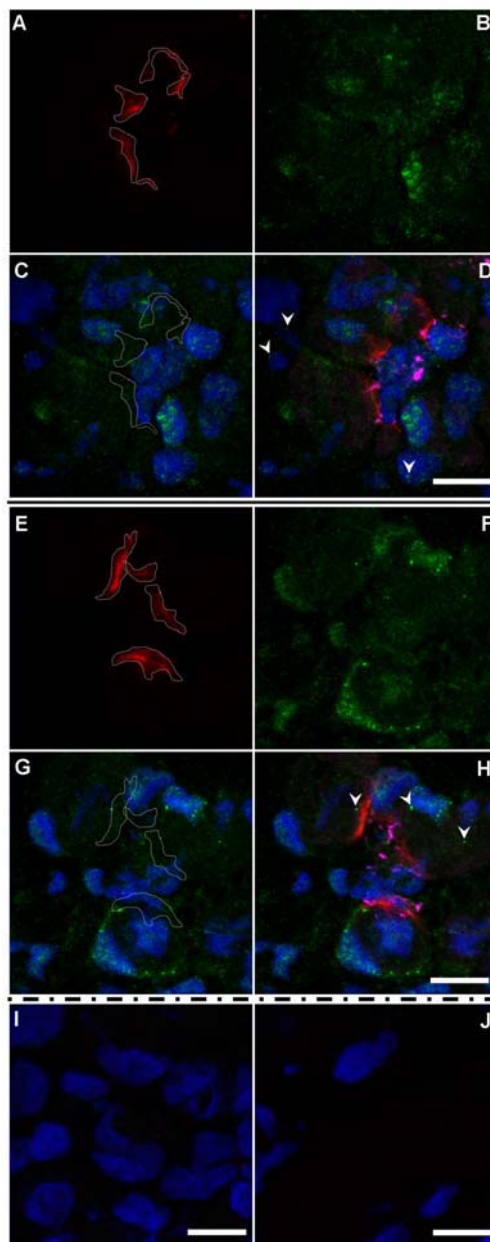
Supplementary Figure 2. Details of the different NMJ appearances observed in type I SMA fetuses at 12 weeks. Triple fluorescent-labeled NMJs were immunostained with AChR γ in red; SyPhy in fuchsia and NF in green. (A-D) “Normal-like” appearance. (E-H) “Early preterminal accumulation”. SyPhy remains in preterminal zones (arrow in F) that colocalize with NF. (I-L) “Preterminal accumulation”. A higher expression of SyPhy merged with nerve terminals is visualized (arrow in J). (M-P) “Early AChR disassembly”. Arrowhead in M indicates early disorganization of AChRs clustering followed by an early aggregation of presynaptic vesicles (N). Scale bar: 20 μ m.



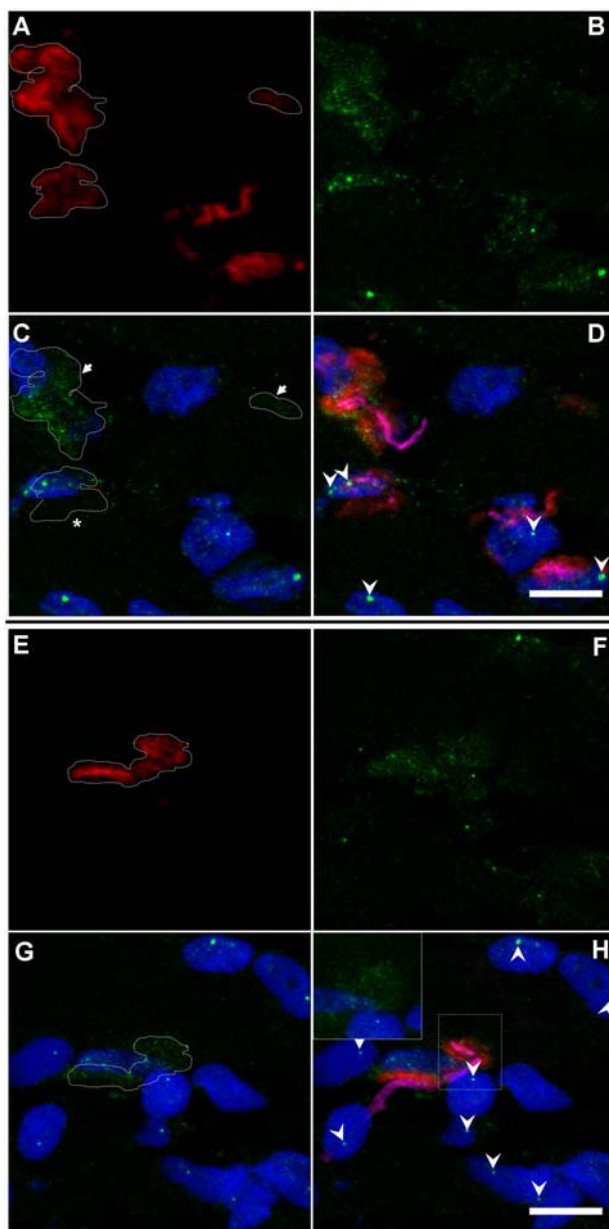
Supplementary Figure 3. Comparison of foetal NMJ aspects in controls (A-D), SMA type II samples (E-H) and type I SMA (I-L) at lower magnification. Control and type II NMJ pattern show similar appearance. In type I SMA the most significant findings include preterminal accumulation of vesicles revealed by SyPhy (in fuchsia) and postsynaptic disaggregation detected by AChR γ (in red). Scale bar: 100 μ m.



Supplementary Figure 4. Comparison of control (A-D) and SMA (E-L) NMJ in postnatal samples. Triple fluorescent-labeled NMJs were immunostained with AChR γ in red; SyPhy in fuchsia and NF in green. Note the absence of AChR γ (A) and the presence of SyPhy (B) at the end of the terminal in the control sample in comparison with the persistence of AChR γ (E and I) in SMA samples without traces of SyPhy (F and J). Scale bar: 20 μ m.



Supplementary Figure 5. SMN expression in foetal samples. NMJs of control samples immunolabelled for SMN (in green), α -bungarotoxin (in red), NF (in fuchsia) and DAPI. Nuclear gems and cytoplasmic dot-like structures (arrowheads in D and H) are present. No co-localization with AChRs was observed (see selected regions of white dotted lines in A, C, E and G). Negative controls omitting the primary antibody are included (I for prenatal samples and J for postnatal samples). Scale bar: 10 μ m

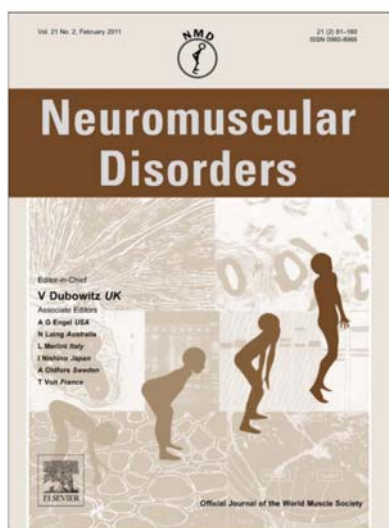


Supplementary Figure 6. SMN expression in postnatal samples. NMJs of control samples immunolabelled for SMN (in green), α -bungarotoxin (in red), NF (in fuchsia) and DAPI. Nuclear gems are present (arrowheads in D and H). In some NMJs positive SMN staining was detected co-localizing with α -bungarotoxin (large arrows in selected regions by dotted lines in C and in image G) whilst in others expression was undetectable (asterisk in C). Note in H SMN expression in NMJ at higher magnification (square). The negative control is included in Supplementary Figure 5. Scale bar: 10 μ m.

7. ULTRASOUND EVALUATION OF FETAL MOVEMENTS IN PREGNANCIES AT RISK FOR SEVERE SPINAL MUSCULAR ATROPHY

Juan Parra¹, Rebeca Martínez-Hernández^{2,3}, Eva Also^{2,3}, Laura Alias^{2,3}, María Jesús Barceló^{2,3}, María Amenedo¹, Carmen Medina¹, Raquel Senosiain¹, Joaquim Calaf¹, Montserrat Baiget^{2,3}, Sara Bernal^{2,3}, and Eduardo F. Tizzano^{2,3*}.

Departments of Obstetrics and Gynecology (1) and Genetics (2), Hospital Sant Pau, and CIBERER (3), Barcelona, Spain.



Neuromuscular Disorders. February 2011. doi: 10.1016/j.nmd.2010.09.010

RESUMEN

Evaluación de los movimientos fetales mediante ultrasonido en gestantes con riesgo de atrofia muscular espinal grave.

Para observar si los defectos encontrados en músculo y unión neuromuscular se reflejan en la funcionalidad motora, en este trabajo se quiso identificar mediante ultrasonido obstétrico 2D algún tipo de alteración en los movimientos fetales en la AME en comparación con fetos normales.

Se estudiaron 29 gestantes de 11-14 semanas con alto riesgo de tener hijos con AME antes de realizar el diagnóstico prenatal. Se registraron por videograbación los movimientos generales, movimientos aislados de piernas y brazos, movimientos de la cabeza y sobresaltos de estos fetos. Se realizó luego una evaluación ciega para determinar la presencia o ausencia de estos movimientos. Posteriormente se agruparon por diagnóstico de afectados, sano portador y sano no portador.

En este periodo gestacional no se encontraron diferencias cualitativas significativas de los movimientos fetales entre los grupos control y AME analizados. La conclusión de este trabajo es que en esta etapa del desarrollo, deben existir mecanismos que compensan los defectos encontrados en la inervación de la AME, tales como: la plasticidad neuronal, la inervación poliaxonal, el *sprouting*, el líquido amniótico en que se desenvuelve el feto, la sensibilidad del feto en la respuesta a estímulos u otros mecanismos desconocidos que podrían generar una funcionalidad motora aparentemente normal.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Neuromuscular Disorders 21 (2011) 97–101

www.elsevier.com/locate/nmd

Ultrasound evaluation of fetal movements in pregnancies at risk for severe spinal muscular atrophy

Juan Parra^a, Rebeca Martínez-Hernández^{b,c}, Eva Also-Rallo^{b,c}, Laura Alias^{b,c},
 María Jesús Barceló^{b,c}, María Amenedo^a, Carmen Medina^a, Raquel Senosiain^a,
 Joaquim Calaf^a, Montserrat Baiget^{b,c}, Sara Bernal^{b,c}, Eduardo F. Tizzano^{b,c,*}

^a Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain

^b Department of Genetics, Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain

^c CIBERER U-705, Barcelona, Spain

Received 28 April 2010; received in revised form 6 August 2010; accepted 21 September 2010

Abstract

We studied spinal muscular atrophy (SMA) during human development to identify possible delays or alterations in fetal movements detectable by ultrasound. We evaluated 29 pregnancies at risk for severe SMA performing 2D-ultrasound around 11–14 weeks, prior to prenatal molecular testing of the SMN1 gene. We charted the occurrence of generalized body movements, isolated movements of arms and legs, head movements, startle and hiccup. Fetuses were diagnosed as healthy ($n = 12$), carriers ($n = 10$) or affected ($n = 7$) according to the SMN1 molecular testing results obtained. SMN2 copies were also tested in the seven affected fetuses, six of whom showed two SMN2 copies and one a unique SMN2 copy. The movements under study were observed in all recordings, regardless of group and the SMN2 copies. At the gestational age examined, we did not observe a qualitative early limitation of movements in fetuses with SMA, even in cases predicted to develop a severe neonatal form.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Spinal muscular atrophy; Prenatal diagnosis; Fetal movements; SMN2 gene

1. Introduction

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder characterized by degeneration and loss of alpha-motor neurons in spinal cord anterior horn cells. It has an incidence of approximately 1/6,000–1/10,000 live births and carrier frequency is approximately 1/40–1/60 [1]. SMA patients can be classified into three groups based on age at onset, achieved milestones and life span [2,3]. Type I SMA (Werdnig-Hoffmann disease) is the severe form with clinical onset generally before the age of 6 months. Those affected

cannot sit without support and most die around two years. Type II SMA is the intermediate form with onset before 18 months. Patients never walk and are wheelchair-bound. Type III SMA (Wohlfart-Kugelberg-Welander disease) is the mild form of the disease with onset after the age of 18 months. Patients are able to walk but may lose their ambulatory capacity later in life. All three clinical forms are caused by the homozygous absence of the survival motor neuron 1 gene (SMN1) located at 5q13 [4]. Outliers of this classical classification are type 0 SMA [5], with severe manifestations already present at birth, and type IV SMA that appears in adult life. The SMN2 gene, a highly homologous copy of SMN1, is located in the same locus as part of a repeated region and it is always present in SMA patients. Most of the type I cases have two SMN2 copies whereas type II and III cases usually present 3 copies [6,7]. The availability of a useful molecular test for SMA has facilitated the

* Corresponding author at: Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria. Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 291 9361; fax: +34 93 291 9494.

E-mail addresses: etizzano@santpau.cat, etizzano@hsp.santpau.es (E.F. Tizzano).

diagnosis of the disease and the performance of prenatal testing in couples at high risk [8]. In our experience, the majority of prenatal tests are performed at the request of couples whose previous child had severe SMA.

The first spontaneous movements of the fetus are detected by ultrasound at around 7 weeks post-menstrual age. The number and frequency of fetal movements increase from 10 weeks onward and are related to the development of neuronal connections. In a normal gestation mothers usually first perceive fetal quickening towards the end of the second trimester. Despite reports of diminished fetal movements during the third trimester in severe SMA cases [9], where occasionally a mother may notice the cessation of previous movements in utero [5], there are no specific studies on movement patterns in SMA fetuses during the first and the early second trimester of pregnancy.

To extend our knowledge about the developmental implications of the disease we performed an ultrasound evaluation between 11–14 weeks in fetuses predicted to develop severe SMA. In particular, our aim was to determine whether the normal pattern of fetal movements was affected during early prenatal development.

2. Methods

This work was conducted jointly by the Department of Obstetrics and Gynecology and the Department of Genetics at our hospital, which is a referral center for prenatal evaluation of pregnancies and SMA diagnosis in Spain.

We performed an ultrasound evaluation in pregnancies of 29 SMA carrier couples with a history of at least one previous child with severe SMA who were referred to our center for prenatal testing. We ideally perform transabdominal chorionic villus sampling (CVS) between 11 and 12 weeks of gestational age but may carry out the procedure early in the second trimester in cases of later consultation. All patients signed an informed consent document. Available information indicated all pregnancies were natural conceptions. Before CVS was performed, a 2D-ultrasound examination was carried out using a convex transabdominal transducer (Toshiba Power Vision 6000-SSA 370, Tokyo, Japan; Siemens Sonoline Antares US machine; and Voluson E8, GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). A video recording of spontaneous fetal movements was performed in all 29 cases. We investigated the presence or absence of five specific fetal movements (described in Table 1) normally present during this developmental stage [10–12]. The duration of each recording depended on the fetal activity observed. The observation was prolonged up to 15 min (a period in which virtually all fetuses show different phases of activity) [12] or until general movements were detected. A blind evaluation of all recordings was made by two observers (JP and EFT).

Chromosomal and DNA analyses were performed in all fetuses. Cases were finally classified as healthy, carrier or affected in relation to molecular results, as reported previously [8,13]. Deletions in the SMN1 gene were detected

Table 1

Fetal movements evaluated in this work (modified from references [10–12]).

GENERALIZED MOVEMENTS

Series of general body movements with variable speed and amplitude, without distinctive patterning of body parts. Duration varies from a few seconds to about a minute.

ISOLATED ARM OR LEG MOVEMENTS

Rapid or slow movements that may involve extension, flexion, external or internal rotation, or abduction and adduction of a limb.

ISOLATED HEAD MOVEMENTS

Retroflexions, rotations and anteflexions of the head, not associated with generalized movements. Usually slow, but they can also be fast and jerky.

STARTLE

Quick generalized movement, starting in the limbs, spreading to the neck and trunk, and lasting only about one second.

HICCUP

Quick generalized movement, starting in the diaphragm, spreading to the neck and trunk, and lasting only about one second.

with the qualitative PCR-RFLP assay. For carrier diagnosis we used two multiallelic microsatellite markers, C272 (Ag1-CA) and C212 located upstream of the 5' region of the SMN genes, to define the at-risk haplotypes. Given that the SMN2 gene is considered a phenotypic modifier of the disease, SMN2 copy number investigation was carried out in the affected fetuses as previously described [7].

3. Results

Our observations are summarised in Tables 2 and 3. With respect to fetal movements, 2-D ultrasound examination showed that all cases in our series were active. Isolated movements of upper and lower limbs were observed in all fetuses and head movements, general movements, startle and hiccup were detected in the vast majority of cases (Table 2). Genetic analysis showed that 12 of the 29 fetuses were healthy, 10 were carriers and 7 were affected. Table 3 summarises the genetic status and movements observed in the 7 affected cases, and shows data concerning the severe SMA children from the respective families.

All affected fetuses showed a homozygous absence of *SMN1* and two copies of the *SMN2* gene, with one exception (case 7 in Table 3) that had one *SMN2* copy. Carriers inherited only one of the at-risk haplotypes defined by the C272 (Ag1-CA) and C212 markers. Healthy cases were determined by the co-inheritance of a non-risk haplotype from each parent. Chromosomal results were also normal in all studied cases.

No morphological anomalies were detected in any ultrasound studies with the exception of case 7, where the first scan at week 13 + 6 (crown-rump-length of 84 mm) showed a nuchal translucency of 4.98 mm (>99th percentile) and findings compatible with hypoplastic left heart. These results were later confirmed at necropsy. In the family of this fetus, a previous affected child presented severe hypotonia and arthrogryphosis at birth (Table 3). This infant was considered type 0 SMA and died on day 14 of life.

Table 2
Presence of fetal movements in 29 pregnancies at risk for severe SMA.

Status	(n)	GM	IUL	ILL	Head	Startle/hiccup
Healthy	12	11 (91.6%)	12 (100%)	12 (100%)	11(91.6%)	10 (83.3%)
Carrier	10	9 (90%)	10 (100%)	10 (100%)	9 (90%)	6 (60%)
Affected	7	6 (86%)	7 (100%)	7 (100%)	6(86%)	6 (86%)

GM = generalized movements; IUL = Isolated upper limbs; ILL = Isolated lower limbs.

Table 3

Genetic status and movements in the 7 affected fetuses, and clinical data on the previous SMA children in each family. Note that the only case with one SMN2 copy manifested the disease at birth and died at 14 days.

Affected fetuses									Previous child with severe SMA		
Family	Fetal karyotype	SMN1 Exon7–8	SMN2 copies*	GM	IUL	ILL	Head	Startle/hiccup	Gender	Onset	Death
1	46,XY	-/-	2	+	+	+	+	-	M	2 m	6 m
2	46,XX	-/-	2	+	+	+	+	+	F	1 m	7 m
3	46,XY	-/-	2	+	+	+	+	+	F	4 m	19 m
4	46,XX	-/-	2	+	+	+	-	+	M	3 m	6 m
5	46,XY	-/-	2	-	+	+	+	+	M	1 m	7 m
6	46,XX	-/-	2	+	+	+	+	+	M	3 m	6 m
7	46,XX	-/-	1	+	+	+	+	+	M	Birth	14d

IUL = Isolated upper limb; ILL = isolated lower limb; GM = generalized movements. + = observed; - = not observed. m = months; d = days. M = Male; F = female.

* SMN2 copies were identical in the respective affected child.

No specific information was available concerning the presence of congenital heart disease.

4. Discussion

Movements in human fetuses can first be discerned around the 7th week of gestation and they coincide fairly well with the establishment of neuromuscular junctions in various muscles. Subsequently, neuronal connections through axonal in-growth, synaptogenesis and dendrite proliferation develop until around week 16, when gross movements decrease in frequency. Movements then become more specific and involve hands and fingers [14,15]. The number of spontaneous movements tends to decrease after the 32nd week [16] (see Table 4). Several fetal conditions, such as hypoxia, fetal akinesia deformation sequence (FADS) [17] and SMA [9], have been related with a reduc-

tion of movements. Although the early fetus (1st–2nd trimester) does not possess the whole range of movements that it will have as an older fetus and as a newborn infant, the emerging movements closely resemble those observed in pre-term and full-term newborns [11] and may represent a useful parameter to study early manifestations in SMA.

We present the first prospective study to investigate fetal movements by ultrasound evaluation in fetuses at risk for SMA. These ultrasound recordings were made in early pregnancy (11–14 weeks), and the vast majority of normal, carrier and SMA fetuses showed all the patterns of movements under study (Table 2) without noticeable differences between the three groups. In families 1–6, all SMA fetuses and also their respective previous SMA children had two SMN2 copies. In these latter cases, SMA disease manifested in the first months of life. In contrast, in family 7, the previous affected child with one SMN2 copy manifested the disease at birth. This finding is in line with observations that one or two SMN2 copies chiefly influence the development of the severe forms of the disease [18]. In a genetic context, the presence of a single SMN2 copy appears to be related to very severe congenital SMA forms (type 0 SMA) [5,9,19], and to cardiac defects in a subgroup of SMA newborns[20–22]. The hypoplastic left heart is a severe cardiac malformation that could be suspected on the first trimester scan. Indeed this malformation has been associated with severe SMA patients [20,21]. Our findings support the view of other authors that the risk of association of SMA with congenital heart disease is high when one SMN2 copy is present [21].

A third trimester reduction in fetal activity has been reported and is a well recognized early sign of SMA

Table 4

Outline of movements during the human fetal period. The developmental stage studied in this work is represented in bold. Further explanation in the Section 4. Compiled from references [10–12], [14–16].

Weeks	Type of movements
7–8	Flexion and extension of the trunk
11–15	Generalized movements, isolated movements of limbs, head movements, startle and hiccup.
16	Fewer gross movements, more complex hand movements. Thumb-sucking.
20	More bilateral movements
26–32	Independent movements of arms and legs to any part of the uterus and to specific body parts.
37–38	Fewer fetal movements. Hands often on occiput or resting on uterine wall.

[9,23]. It should be kept in mind, however, that maternal perceptions on fetal movements during pregnancy are subjective and may be elusive in relation to outcome. To our knowledge, the present work is the first to study fetal movements in SMA during early development. Our observations indicate that SMA does not hamper the performance of any of the movements investigated in this fetal stage. Moreover, fetal movements were preserved and differences in speed and amplitude were not found even in the case with one SMN2 copy (case 7, Table 3).

In a time window between 12 and 15 weeks of human development, we have shown that motor neurons in SMA fetuses, as in controls, express choline acetyltransferase (ChAT), a marker of neuronal viability and distress. This suggests that the surviving motor neurons in SMA fetuses could have a cholinergic function akin to that of controls [24]. In other studies comparing type I SMA fetuses and controls during this period we found that in SMA, DNA fragmentation in neurons of the spinal cord was significantly increased [25], and that myotubes were significantly smaller [26]. These findings suggest greater sensitivity of neurons to programmed cell death and a delay in muscle maturation in SMA fetuses. Moreover, studies in severe SMA mice embryos have shown axonal swelling and intercostal motor endplates without occupation of acetylcholine receptors [27]. All these findings provide support for the existence of early pathologic features in the presymptomatic stage in type I SMA. As we observed a wide spectrum of fetal movements in our SMA cases we hypothesize that neuromuscular connections, including motor neuron, axon outgrowth, endplates and muscle response, are functionally sufficient or compensated during this stage of development. However, our study does not pinpoint the time of loss of movements given that all the affected pregnancies in our series were terminated. More advanced research using techniques such as 4D-ultrasound to quantify activity may refine our knowledge about the integrity of fetal movements in the early development of SMA.

5. Conclusions

Using 2D ultrasound, we did not observe a qualitative early limitation of movements in fetuses with SMA, even in cases predicted to develop a neonatal severe form.

Funding

This work was partially supported by GENAME Project (RM, SB), FIS05-2416 (EA), CIBERER U-705 (LA), and FIS 08-0729, Spain.

Acknowledgements

We wish to thank the consenting couples who made this study possible. We are indebted to Carolyn Newey for her

contribution in the final edition and revision of this manuscript.

References

- [1] Pearn J. Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1980;1:919–22.
- [2] Munsat TL, International Davies KE, MA S. Consortium meeting. (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 1992;2:423–8.
- [3] Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 1995;52:518–23.
- [4] Lefebvre S, Burglen L, Reboulet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995;80:155–65.
- [5] Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol* 1999;3: 49–51.
- [6] Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 2002;70:358–68.
- [7] Cusco I, Barcelo MJ, Rojas-Garcia R, Illa I, Gamez J, Cervera C, et al. SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings. *J Neurol* 2006;253:21–5.
- [8] Cusco I, Barcelo MJ, Soler C, Parra J, Baiget M, Tizzano E. Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy. *BJOG* 2002;109:1244–9.
- [9] MacLeod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol* 1999;3:65–72.
- [10] de Vries JI, Visser GH, Precht HF. The emergence of fetal behaviour I. Qualitative aspects. *Early Hum Dev* 1982;7:301–22.
- [11] Einspieler C, Precht HF, Ferrari F, Cioni G, Bos AF. The qualitative assessment of general movements in preterm, term and young infants—review of the methodology. *Early Hum Dev* 1997;50:47–60.
- [12] Kurjak A, Andonotopo W, Stanojevic M, Milenkovic D, Azumendi G, Hafner T, et al. Longitudinal study of fetal behavior by four-dimensional sonography. *Ultrasound Rev Obstet Gynecol* 2005;5:259–74.
- [13] Alias L, Barcelo MJ, Gich I, Estape M, Parra J, Amenedo M, et al. Evidence of a segregation ratio distortion of SMN1 alleles in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 2007;15:1090–3.
- [14] Flower MJ. Neuromaturation of the human fetus. *J Med Philos* 1985;10:237–51.
- [15] Visser GH, Mulder EJ, Precht HF. Studies on developmental neurology in the human fetus. *Dev Pharmacol Ther* 1992;18:175–83.
- [16] Salihagic-Kadic A, Kurjak A, Medic M. Neurophysiology of fetal behaviour. *Ultrasound Rev Obstet Gynecol* 2004;2:11.
- [17] Donker ME, Eijkelhof BH, Tan GM, de Vries JI. Serial postural and motor assessment of Fetal Akinesia Deformation Sequence (FADS). *Early Hum Dev* 2009;85:785–90.
- [18] Cobben JM, Lemmink HH, Snoeck I, Barth PA, van der Lee JH, de Visser M. Survival in SMA type I: a prospective analysis of 34 consecutive cases. *Neuromuscul Disord* 2008;18:541–4.
- [19] Garcia-Cabezas MA, Garcia-Alix A, Martin Y, Gutierrez M, Hernandez C, Rodriguez JI, et al. Neonatal spinal muscular atrophy with multiple contractures, bone fractures, respiratory insufficiency and 5q13 deletion. *Acta Neuropathol* 2004;107:475–8.
- [20] Menke LA, Poll-The BT, Clur SA, Bilardo CM, van der Wal AC, Lemmink HH, et al. Congenital heart defects in spinal muscular atrophy type I: a clinical report of two siblings and a review of the literature. *Am J Med Genet A* 2008;146A:740–4.

- [21] Rudnik-Schoneborn S, Heller R, Berg C, Betzler C, Grimm T, Eggermann T, et al. Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 2008;45:635–8.
- [22] Sarnat HB, Trevenen CL. Motor neuron degeneration in a 20-week male fetus: spinal muscular atrophy type 0. *Can J Neurol Sci* 2007;34:215–20.
- [23] Pearn JH. Fetal movements and Werdnig-Hoffmann disease. *J Neurol Sci* 1973;18:373–9.
- [24] Soler-Botija C, Cusco I, Lopez E, Clua A, Gich I, Baiget M, et al. Choline acetyltransferase expression does not identify early pathogenic events in fetal SMA spinal cord. *Neuromuscul Disord* 2005;15:253–8.
- [25] Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF. Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002;125:1624–34.
- [26] Martinez-Hernandez R, Soler-Botija C, Also E, Alias L, Caselles L, Gich I, et al. The developmental pattern of myotubes in spinal muscular atrophy indicates prenatal delay of muscle maturation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:474–81.
- [27] McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, Burghes AH. Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 2008;17:2900–9.

V. DISCUSIÓN

En esta tesis el objetivo principal que se ha planteado es averiguar, mediante estudios histopatológicos, el papel del músculo y la unión neuromuscular en la atrofia muscular espinal durante el desarrollo humano. Además se ha intentado correlacionar estos resultados histológicos con el estudio de los movimientos fetales en el mismo periodo gestacional. Esta discusión se divide en tres subapartados principales teniendo en cuenta los resultados expuestos: defectos musculares, defectos sinápticos y movimientos fetales, seguidos de una conclusión general y perspectivas.

Defectos Musculares

Como se ha mencionado anteriormente (ver apartado 3.1) , durante el desarrollo del músculo esquelético, los mioblastos se fusionan para formar miotubos que posteriormente darán lugar a las fibras musculares (Kelly and Rubinstein 1994). Los miotubos primarios normalmente se forman a las 8 semanas de desarrollo, y se caracterizan como miotubos clásicos con cadenas de núcleos centrales. Los miotubos secundarios tienen un diámetro más pequeño y aparecen normalmente a partir de las 13-14 semanas de desarrollo (Harris et al. 1989). El diámetro de los miotubos en humanos, tiende a disminuir entre las 12-15 semanas de gestación, lo mismo ocurre en ratones entre los días E18 y E20 (Hughes and Ontell 1992). En el primer trabajo de esta tesis se analizaron distintas características del músculo esquelético (uno de los mayores tejidos afectados en la AME) en fetos de 12 a 15 semanas de gestación controles y AME tipo I. En este análisis se detectó una ligera disminución del diámetro de los miotubos control sobre las 15 semanas de gestación que puede estar atribuida a la progresiva aparición de pequeños miotubos secundarios. Sin embargo, el patrón del tamaño de los miotubos en las muestras AME tendía a aumentar a las 15 semanas, sugiriendo que los miotubos primarios aún están presentes de forma abundante en este periodo.

También se observó que el patrón de desarrollo de los miotubos AME difería de los controles en relación al tamaño, periodo de gestación, y patrón en el tiempo. La mayor diferencia respecto al tamaño se detectó a las 12 semanas, periodo en el que los miotubos primarios son predominantes. En esta etapa, el tamaño de los miotubos AME era similar o incluso menor al de los controles a las 10 semanas de gestación, indicando un retraso en el crecimiento y maduración del músculo AME. La superposición de los valores control de 10-12 semanas con los AME de 12-15 semanas mostraba un comportamiento similar del incremento del tamaño de los miotubos. Sin embargo estos valores eran siempre menores en los AME, reforzando la hipótesis del retraso durante el desarrollo muscular.

Otro aspecto investigado fue la muerte celular programada o apoptosis del músculo. La apoptosis es un proceso que ocurre en condiciones normales durante la histogénesis del músculo esquelético; en los primeros estadios de la formación de miotubos las células no deseadas son eliminadas por apoptosis, reduciendo así el número total de fibras musculares (Sandri and Carraro 1999). A diferencia de investigaciones previas donde se encontró un incremento de células TUNEL positivas en neuronas de la médula espinal durante el desarrollo de fetos AME tipo I (Soler-Botija et al. 2002), no se observaron diferencias en la fragmentación de DNA entre los músculos AME y control analizados. Estos resultados sugieren que la apoptosis no está aumentada en músculo AME en esta etapa. Sin embargo, el periodo analizado que se ha estudiado (de 12 a 15 semanas), no excluye la posibilidad de que el número de células apoptóticas aumente a medida que progresa el desarrollo fetal.

Estudios previos realizados en muestras postnatales AME, observaron que numerosas células musculares son eliminadas por apoptosis, suponiendo que el aumento de la misma podría ser un defecto patológico en el músculo esquelético de estos pacientes. Los autores propusieron que la eliminación de fibras musculares podría ser el resultado de la muerte de neuronas motoras (Fidzianska

et al. 1990; Kelly and Rubinstein 1994; Tews and Goebel 1996; Stathas et al. 2008). Este aumento, no sólo indicaba muerte celular, sino también un retraso en la maduración de miocitos y la presencia de innervación defectuosa (Tews and Goebel 1996; Tews and Goebel 1997). Todos estos estudios se llevaron a cabo mediante muestras postnatales en el periodo terminal de la enfermedad, mientras que en esta tesis el estudio se dirigió a cambios durante el desarrollo de la AME en un estadio preclínico.

En un modelo murino en el cual la delección de *Smn* estaba dirigida a músculo no se observaron células apoptóticas, aunque si se detectaron fibras necróticas, regeneración de miocitos y distrofia muscular (Cifuentes-Diaz et al. 2001). Además, en un modelo de ratón AME similar, se observó una capacidad limitada de las células satélite para regenerar el músculo esquelético (Nicole et al. 2003). En estos modelos, los autores no observaron denervación muscular ni cambios morfológicos en neuronas motoras, tal y como se detectaron en otro modelo murino, en el que la delección del *Smn* se hizo específicamente en neuronas motoras (Frugier et al. 2000). En un estudio reciente con el modelo más grave de ratón AME, se demostró un incremento de células apoptóticas en las células satélite relacionada con una interrupción en el crecimiento de las fibras musculares lo que afectaría la formación de miotubos secundarios (Dachs et al. 2011).

En cuanto a la expresión de proteínas implicadas en mecanismos antiapoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-X (Reed 1994), tampoco se detectaron diferencias entre controles y AME. Estudios previos realizados en biopsias musculares de AME tipo I mostraron una baja expresión de Bcl-2, sugiriendo que las fibras musculares eran incapaces de expresar suficientes niveles de esta proteína debido a la inmaduración de las fibras. El hecho de que la expresión de Bcl-2 en músculo fetal AME sea similar al control, sugiere que esta proteína antiapoptótica, tiene una contribución limitada en la supervivencia del músculo AME durante el desarrollo.

Tal y como se ha descrito anteriormente, las biopsias musculares AME muestran células inmaduras parecidas a miotubos (Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1980; Fidzianska and Hausmanowa-Petrusewicz 1984). Además estas fibras revelan cambios en la expresión de distintas proteínas del desarrollo (NCAM, miosinas, vimentina etc.) (Soussi-Yanicostas et al. 1992; Stathas et al. 2008) (ver apartado 1.7.2). En el Anexo II de esta memoria se describe el estudio de la expresión de los diferentes tipos de miosinas, desmina, vimentina y pax7. Los resultados preliminares obtenidos refuerzan la idea de que en el periodo fetal exista un retraso en la maduración y desarrollo muscular y que esto pueda ser una manifestación temprana de la AME durante dicho periodo.

Por lo tanto el músculo jugaría un papel importante en la patogénesis de la AME. De este modo, además del efecto per se de la denervación, la baja expresión de SMN en el músculo en desarrollo afectaría su crecimiento y maduración. Por ejemplo, el diámetro de los miotubos del músculo de ratón aneural no se diferencia de los miotubos inervados (Hughes and Ontell 1992). Además, se ha demostrado que fibras musculares inmaduras pueden sobrevivir sin inervación durante largos periodos de tiempo, aunque el desarrollo final a fibras musculares maduras es dependiente de la inervación funcional (Lowrie and Vrbova 1984). Recientemente se ha demostrado que los complejos SMN se localizan en las bandas Z del sarcómero del músculo, y que las miofibras de un modelo grave de ratón AME tienen defectos morfológicos consistentes en una deficiencia de las bandas Z (Walker et al. 2008; Dachs et al. 2011). Estudios hechos en cocultivos de médula espinal de rata con músculo de pacientes AME, mostraron que las fibras musculares AME fueron incapaces de prevenir la muerte neuronal por apoptosis; de esta forma se asumió que podría haber un defecto neurotrófico en estas células musculares. Además, estos investigadores vieron diferencias en cuanto al tamaño de los mionúcleos y de los miotubos (Guettier-Sigrist et al. 2002). En otro estudio, con células musculares de pacientes AME en cultivo, se observaron fallos en la

agrupación de receptores de acetilcolina que podrían afectar la formación de la unión neuromuscular (Arnold et al. 2004). Por todo esto, sería razonable asumir que la interacción entre las neuronas motoras y el músculo está alterada en la atrofia muscular espinal, donde una baja expresión de SMN podría estar implicada en la alteración del desarrollo de las neuronas motoras, el músculo y la unión neuromuscular (Hausmanowa-Petrusewicz and Vrbova 2005).

En conclusión, estos resultados destacan la necesidad de la investigación del músculo AME durante el desarrollo y la necesidad de considerar tanto músculo como neuronas motoras como dianas para posibles intervenciones tempranas y nuevas terapias de la atrofia muscular espinal.

Defectos Sinápticos

Asumiendo que el desarrollo de la unión neuromuscular es dependiente de señales del músculo y del nervio, y que los estudios previos demuestran defectos en ambos tejidos en el desarrollo de la AME, se procedió a hacer un estudio inmunohistoquímico y ultraestructural de las placas motoras durante la primera etapa del segundo trimestre gestacional humano en muestras controles y AME tipo I y II. Este estudio se realizó en colaboración con un grupo experto en ultraestructura de la unión neuromuscular dirigido por el Dr. Josep Esquerda de la Facultad de Medicina de la Univesidad de Lleida.

Teniendo en cuenta que el estudio sobre la inervación muscular durante el desarrollo humano es escaso, y en función de las muestras óptimas disponibles, se comenzó realizando una descripción entre las 10 y las 18 semanas de gestación en muestras controles mediante microscopia confocal y de 14 semanas mediante microscopia electrónica. Posteriormente se procedió a compararlas con las muestras AME disponibles. Se añadieron al estudio algunos casos postnatales controles y de AME tipo I, para estudiar la evolución de la organización de la unión neuromuscular en las placas motoras una vez establecida la enfermedad.

Discusión

Los resultados obtenidos mediante microscopia confocal y electrónica, demostraron defectos en etapas muy iniciales del desarrollo en las muestras AME tipo I (entre las 12 y 14 semanas de gestación). Estos defectos se caracterizaron por: dispersión de los receptores musculares de acetilcolina, retención de vesículas sinápticas en terminales nerviosos y degeneración de terminales nerviosos con una disminución de sinapsis activas.

Como ya se ha comentado en la introducción, la generación de AChRs es nervio-independiente, sin embargo la inervación es importante para mantener y estabilizar el aparato postsináptico con el contacto nervioso y prevenir la dispersión de estos receptores (ver apartado 3.3.2). Los resultados a las 12 semanas indican que el músculo AME es capaz de generar y formar placas de AChR. A partir de las 14 semanas es evidente que este mismo músculo es incapaz de mantener estas estructuras con la consiguiente disgregación de los receptores. Sin embargo ya a las 12 semanas se observa acumulación anómala de vesículas sinápticas que sugiere la existencia de un defecto primario proveniente de los terminales nerviosos, previo a la disgregación de los receptores postsinápticos. La acumulación de vesículas sinápticas se corroboró mediante los estudios ultraestructurales. La comparación morfométrica entre las NMJs de los músculos control y AME revelaron un incremento de terminales nerviosos aberrantes, un aumento en la densidad de vesículas, una reducción de zonas activas y la presencia de axones anormales en nervios intramusculares. Estos defectos indican que en este periodo existe una degeneración temprana de la unidad motora en la AME.

En modelos AME de ratón se han encontrado distintos defectos relacionados con la liberación de vesículas sinápticas, como por ejemplo: una distribución anómala de vesículas dentro del terminal nervioso, una disminución de zonas activas relacionada con una regulación a la baja de canales de calcio dependientes de voltaje y una disminución de la liberación cuántica de neurotransmisores (Kong et al. 2009; Ling et al. 2010; Ruiz et al. 2010). De este modo, la acumulación anómala

de vesículas sinápticas halladas en nuestras muestras prenatales junto con los resultados en los modelos de ratón, podrían sugerir que la liberación de vesículas en el terminal nervioso es un defecto en la AME, afirmando la importancia de la función de la NMJ en esta enfermedad.

Además de los defectos presinápticos y postsinápticos, se encontraron un mayor número de *swellings* axonales en los nervios intramusculares AME comparado con los controles. Esto implica que aunque estos *swellings* se pueden encontrar en el desarrollo normal, son mucho más predominantes en los casos AME. Este tipo de *swellings* ya fueron descritos en biopsias de pacientes AME (ver apartado 1.7.2), y en otras neuropatías (Tarrade et al. 2006). Estas anomalías se caracterizan por la acumulación anómala de orgánulos y componentes del citoesqueleto. Aunque su papel en la patogénesis de la AME es desconocido, su presencia puede reflejar defectos en el transporte axonal, función que ya se ha asociado a SMN en células neuronales.

Un aspecto muy interesante es la observación de ausencia de defectos sinápticos en los fetos que se predice desarrollarán AME tipo II. Esto indica que en esta etapa gestacional, en la AME tipo II debe existir suficiente proteína SMN capaz de lograr el buen funcionamiento y maduración de la unión neuromuscular.

A nivel postnatal, se encontraron placas no invadas que mantenían la expresión de la subunidad fetal de los AChRs y estaban dispersos alrededor de las fibras musculares. Las placas motoras invadas mostraban defectos en los terminales nerviosos, tales como acumulación de neurofilamento en el terminal, o lo que en algunos casos parecía una retracción axonal. Todos estos hallazgos apoyarían la hipótesis del retraso en la maduración de las uniones neuromusculares y de posibles defectos en el mantenimiento de esta estructura. Esta hipótesis está respaldada además por todas las evidencias de defectos sinápticos encontrados en los modelos animales AME (Cifuentes-Diaz et al. 2002; Kariya et al. 2008;

McGovern et al. 2008; Murray et al. 2008; Kong et al. 2009; Ling et al. 2010; Dachs et al. 2011).

La expresión de SMN en las NMJs en las muestras prenatales era mucho mayor que en las muestras postnatales, como ya se había descrito anteriormente (Lefebvre et al. 1997; Burlet et al. 1998) aunque solo en pocas NMJs postnatales se pudo observar una tendencia de colocalización de SMN con los AChRs.

La conclusión de este estudio es que la patología en los casos más graves de la enfermedad se manifiesta durante el desarrollo fetal y que los defectos en el mantenimiento de la inervación es uno de los primeros síntomas de la disfunción neuromuscular. De este modo revertir el proceso de denervación, mantener la actividad de la NMJ y la maduración de las placas motoras serían una buena estrategia terapéutica en la AME tipo I.

Movimientos Fetales

Los primeros movimientos fetales (MF) en humanos se pueden distinguir mediante ultrasonido sobre las 7 semanas de gestación (ver apartado 4), periodo en que las uniones neuromusculares se empiezan a establecer en varios músculos. A medida que avanza el desarrollo, estas conexiones neuronales se van perfeccionando hasta las 16 semanas de gestación, cuando los MF generales son menos frecuentes. Posteriormente estos movimientos se vuelven más específicos, viéndose ya involucradas las manos y los dedos (Flower 1985; Visser et al. 1992). Los movimientos espontáneos tienden a disminuir a partir de la semana 32 (Salihagic-Kadic et al. 2004). La reducción de MF se ha visto asociada a varias condiciones fetales, como la hipoxia, la deformación por acinesia fetal y en la AME (MacLeod et al. 1999; Donker et al. 2009). Aunque entre el primer y el segundo trimestre de gestación los fetos no poseen todo el rango de movimientos como los fetos de mayor edad gestacional, los MF que aparecen en esta etapa también se observan

en fetos pre término y neonatos representando un buen parámetro para estudiar posibles manifestaciones tempranas de esta enfermedad (Einspieler et al. 1997).

En este trabajo se estudiaron los MF mediante ultrasonido entre las 11 y 14 semanas de gestación, donde tanto los fetos normales como los portadores y los afectados mostraban todo el patrón de movimientos estudiados, sin manifestar grandes diferencias entre los tres grupos.

En estudios previos, se encontraron casos de reducción de la actividad fetal en el tercer trimestre gestacional, siendo una manifestación reconocida en las AME (Pearn 1973; MacLeod et al. 1999). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la percepción de los MF para las gestantes es en muchos casos subjetiva y difícil de interpretar. El trabajo de esta tesis ha sido el primer estudio de MF realizado mediante ultrasonido 2D en fetos AME entre el primer y segundo trimestre gestacional. Nuestras observaciones mostraron que en la AME no hay dificultades en la realización de movimientos y no difieren ni en la velocidad, ni en la amplitud. Es importante mencionar aquí que este estudio ha sido cualitativo, es decir, se limitó a investigar si alguno de los movimientos no estaba presente en la AME. Las nuevas técnicas de ecografía 3-4 D posiblemente permitan realizar una apreciación cuantitativa de los MF a fin de descubrir defectos menos evidentes en la ecografía 2D o para confirmar la indemnidad de los movimientos en estos casos.

Conclusión general:

Los resultados obtenidos del estudio muscular en el desarrollo de la enfermedad, favorecen la hipótesis de que el músculo y la unión neuromuscular puedan jugar un papel importante en la patogénesis de la AME y refuerzan el hecho de que la AME sea considerada como una enfermedad del desarrollo. Así, la baja expresión de SMN en el músculo en desarrollo podría afectar su crecimiento y maduración. SMN podría tener una función importante en el transporte de moléculas relevantes para la interacción del nervio y el músculo durante la formación y el mantenimiento de

la unión neuromuscular. Así, si los terminales nerviosos son incapaces de mantener el funcionamiento de las uniones neuromusculares durante el desarrollo de la enfermedad, podría empezar un proceso de muerte retrógrada (*“dying back process”*) dando lugar a la pérdida de neuronas motoras a nivel de la médula espinal (**Figura 14**). Esto explicaría descripciones previas en muestras fetales con AME tipo I como el incremento de neuronas apoptóticas en la médula espinal (Fidzianska and Rafalowska 2002; Soler-Botija et al. 2002).

Los primeros defectos se comienzan a observar a las 12 semanas, aunque la limitación de obtener muestras AME en etapas previas del desarrollo no excluye que estas alteraciones se manifiesten con anterioridad. Por un lado, los signos de degeneración de los terminales nerviosos muestran un posible defecto en el mantenimiento de la unión neuromuscular. El retraso en la maduración del músculo, podría ser debido a este defecto nervioso, sin embargo, muchos estudios han demostrado la capacidad nervio-independiente del crecimiento muscular.

A pesar de los defectos neuromusculares observados, la capacidad de los fetos AME para generar movimientos cualitativamente similares a los fetos normales sugiere que en esta etapa del desarrollo podría existir una compensación que luego en el período perinatal y postnatal no sería ya efectiva. Por lo tanto los terminales nerviosos continuarían degenerándose y retrayéndose más de lo normal, dando lugar a una disfunción motora, atrofia muscular y las primeras manifestaciones clínicas de debilidad y arreflexia.

Es importante mencionar que los resultados obtenidos proceden de muestras estudiadas desde finales del primer trimestre y hasta el comienzo del segundo trimestre del desarrollo, período donde se realizan la mayoría de los diagnósticos prenatales de la enfermedad. Dada las limitaciones en cuanto a la obtención y disponibilidad de las muestras fetales humanas en otras etapas del embarazo, las conclusiones expuestas se limitan a este periodo gestacional.

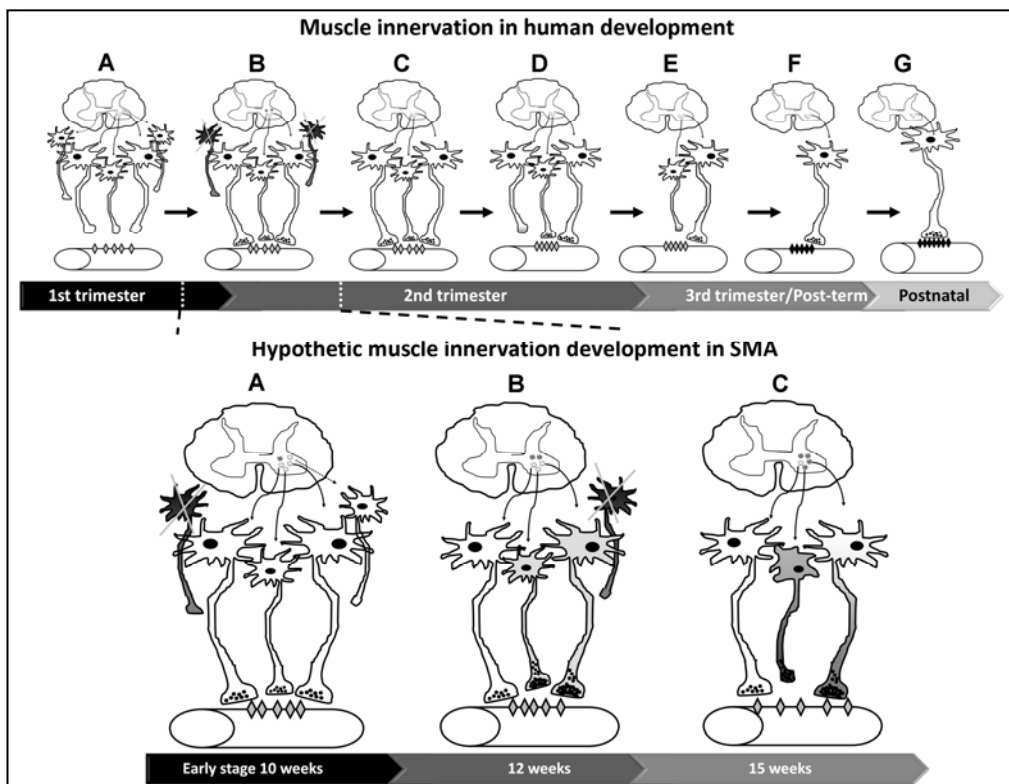


Figura 14: Arriba: Esquema de la inervación durante el desarrollo humano normal. **A:** Comienzo de la inervación; varias neuronas motoras se acercan hacia el músculo para inervarlo. Los AChRs se expresan en la membrana muscular independientemente de la inervación. **B:** Establecimiento de una placa motora poliinervada con AChRs agrupándose. Muerte programada de las neuronas motoras sobrantes que no hacen contacto. **C:** Placa motora poliinervada con AChRs agrupados. **D:** Inicio de la retracción axonal por eliminación sináptica. La placa de AChRS madura. **E:** Retracción axonal completa. Las neuronas motoras que se han retraído inervarán las fibras musculares adyacentes. **F:** Establecimiento sináptico con único axón. Cambio de la subunidad fetal a la adulta de los AChRs. **G:** Unión neuromuscular totalmente desarrollada. **Abajo:** Esquema hipotético de la inervación en el desarrollo de la AME de las 10 a las 15 semanas de gestación, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis. **A:** Establecimiento de una placa motora poliinervada con AChRs agrupándose. Inicio de la muerte programada de las neuronas motoras sobrantes que no hacen contacto (esta etapa sería similar a las etapas A y B del esquema superior). **B:** Acumulación de vesículas sinápticas en los terminales axónicos, los AChRs se empiezan a desagrupar. Continúa la muerte neuronal natural. **C:** Degeneración de los terminales nerviosos y como consecuencia, muerte de la neurona motora por disfunción sináptica y por defectos en el mantenimiento de la unión neuromuscular. Disgregación de los AChRs de la placa motora.

Perspectivas:

Estos estudios pueden contribuir a una mejor definición de la neuropatología de la enfermedad durante el desarrollo humano, y a conocer los mecanismos fisiopatológicos de la AME en el comienzo de las manifestaciones clínicas. Hay muy pocas publicaciones sobre estos aspectos de la enfermedad en humanos dada la poca disponibilidad de las mismas pero el trabajo realizado determina que el músculo y la unión neuromuscular son dianas importantes para poder encontrar un posible tratamiento en el futuro.

A la luz de los resultados obtenidos, para continuar con esta línea de trabajo y ampliar los aspectos neuropatológicos de la AME, se plantean diversas investigaciones:

- Obtener muestras de fetos AME de otras edades gestacionales y pacientes con otros tipos de AME (II y III) para definir la evolución y diferencias de los cambios patológicos observados en la unión neuromuscular.
- Realizar un análisis completo de las proteínas musculares y marcadores de células satélite para definir la función de estas células durante el desarrollo de la enfermedad.
- Estudiar la ultraestructura en 3D de la unión neuromuscular para poder definir extensivamente las estructuras sinápticas durante el desarrollo humano.
- Diferenciar células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) procedentes de fibroblastos de pacientes a neuronas motoras, para estudiar la función de SMN en este tipo celular, definir fenotipos de comportamiento y desarrollo neuronal y co-cultivarlas con células musculares.
- Estudiar las sinapsis neuronales de la médula espinal para definir el papel de la glia y las neuronas sensoriales en el desarrollo de la enfermedad

- Profundizar en los estudios de movimientos fetales de manera cuantitativa por medio de ecografía 3-4D a fin de demostrar o descartar su afectación temprana en la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. El tamaño de los miotubos AME tipo I entre las 12 y 15 semanas de gestación es significativamente menor que el de los controles, lo que sugiere un retraso en la maduración muscular.
2. A diferencia de lo descrito previamente en médula espinal, no se observó en músculo fetal AME un aumento de la muerte celular programada ni una disminución de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X, sugiriendo que las neuronas motoras de la médula espinal y el músculo esquelético sufren distintos procesos patogénicos durante el desarrollo de la enfermedad.
3. En los fetos AME tipo I existen defectos presinápticos constituidos por acumulaciones anómalas de vesículas sinápticas en los terminales nerviosos y defectos postsinápticos traducidos en una disgregación de los receptores de acetilcolina. Dado que la disgregación de dichos receptores es posterior al establecimiento de la inervación, se postula que en la AME existiría un defecto en el mantenimiento y maduración de las placas motoras.
4. A diferencia de la AME tipo I, en la AME tipo II no se observaron defectos neuromusculares evidentes con la metodología utilizada, lo que indica la existencia de suficiente proteína SMN capaz de lograr el adecuado funcionamiento y maduración de la unión neuromuscular en el período de desarrollo estudiado.
5. La mayor presencia de *swellings* en los axones de muestras AME tipo I que en controles son compatibles con defectos en el transporte axonal, función que ya se había propuesto a SMN en células neuronales.
6. Los hallazgos ultraestructurales de la unión neuromuscular AME en comparación con los controles incluyen: terminales nerviosos con características típicas de degeneración, disminución de zonas activas relacionadas con una disminución de sinapsis funcionales y acumulación anómala de vesículas sinápticas.

Conclusiones

en los terminales. Todos estos hallazgos se corresponden con los resultados de la microscopia confocal.

7. En las muestras postnatales AME tipo I, la persistencia del receptor fetal de acetilcolina y su disgregación alrededor de las fibras musculares no-inervadas son signos postnatales que corroboran el retraso de maduración y la falta de mantenimiento de la unión neuromuscular.

8. Los movimientos fetales entre el primer y segundo trimestre gestacional de los AME tipo I son cualitativamente similares a los fetos controles de su misma edad.

9. La neuropatología descubierta en los fetos con AME tipo I no se correlaciona con la presencia de movimientos fetales normales en ese mismo grupo. Esto indica que en la AME deben existir mecanismos compensatorios durante el desarrollo que enmascaran las posibles consecuencias funcionales de la degeneración y falta de mantenimiento de la unión neuromuscular y del retraso en la maduración muscular. Estos mecanismos compensatorios desaparecerían más tarde dando lugar a las graves manifestaciones de la enfermedad en las etapas perinatal y neonatal.

10. La falta de mantenimiento de las uniones neuromusculares durante el desarrollo de la enfermedad, justificaría el inicio de un proceso de muerte retrograda ("*dying back process*") dando lugar a una excesiva pérdida de neuronas motoras en la médula espinal. Este sería uno de los mecanismos básicos iniciales de la enfermedad durante el desarrollo humano.

CONCLUSIONS:

1. Type I SMA myotubes at around 12 and 15 weeks of development are smaller than those of controls, indicating a delay in muscle growth and maturation.
2. Conversely to previous observations in spinal cord, in foetal SMA muscle there is neither an increase in programmed cell death nor a decrease in the expression of antiapoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-X). These results suggest that spinal cord and skeletal muscle undergo different pathogenetic processes in SMA during development.
3. In type I SMA fetuses, presynaptic defects consisted of accumulation of synaptic vesicles in terminal nerves. Postsynaptic defects showed dispersion in AChRs surrounding muscle fibers. Given that the alteration in AChRs clustering is subsequent to the establishment of innervation, we propose that a defect in maintaining the initial innervation is an early finding of neuromuscular dysfunction in SMA.
4. In contrast to the defects observed in type I SMA samples, type II SMA at the same gestational age did not show detectable neuromuscular defects. This indicates that in type II SMA fetuses, sufficient SMN protein is available to achieve an adequate development of NMJs.
5. Abnormal swellings in intramuscular nerves are more numerous in type I SMA than in controls. This is compatible with defects in axonal transport, a function that has been proposed for SMN in neuronal cells.
6. Ultrastructural findings in SMA NMJs include an increase in aberrant terminals, a higher density of vesicles, a reduction of active zones, and the presence of abnormal axons in intramuscular nerves. All these results corroborate the synaptic defects observed using confocal microscopy.

7. Postnatal type I samples showed persistent expression and dispersion of gamma-AChRs surrounding non-innervated muscle fibres, corroborating the prenatal delay in the maintenance and maturation of the NMJ.

8. Foetal movements between the first and second trimester in type I SMA are qualitatively similar to those observed in controls at the same gestational age.

9. The neuropathological defects observed in type I SMA fetuses do not correlate with the finding of adequate foetal movements in the same group. Thus, at the gestational age investigated, several factors that partially compensate the defects in the maintenance of the NMJ and the delay in muscle maturation may be present.

10. If nerve terminals are unable to efficiently maintain functional NMJs during the progress of the disease, a dying-back process may appear, leading to an increase in motor neuron loss in the spinal cord. This might be one of the basic mechanisms of the disease during human development.

VII. ANEXOS

ANEXO I:

Consentimiento Informado para la obtención de muestras y aspectos éticos de la investigación realizada.

El consentimiento informado y los aspectos éticos de la investigación realizada fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Sant Pau para la obtención de muestras del proyecto de investigación GENAME "*Defining targets for therapeutic strategies in SMA*", cuyo coordinador fue Eduardo Tizzano. El informe favorable de dicho Comité fue emitido en junio de 2006 y fue aplicado para todas las muestras investigadas en este trabajo de tesis.



ESTUDIO DE MUESTRAS DE TEJIDOS DE PACIENTES FALLECIDOS AFECTADOS DE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL Y DE MUESTRAS DE TEJIDOS DE MATERIAL FETAL CON AFECTACION DEL GEN SMN1

INFORMACION A LOS FAMILIARES y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los tejidos más afectados de la AME, la médula espinal y los músculos son un material muy valioso en el que pueden realizarse investigaciones neurobiológicas y farmacológicas para conocer mejor la enfermedad y hallar alguna alternativa terapéutica. Como parte del proyecto multicéntrico GENAME (financiado por GENOMA ESPAÑA y FUNDAME) que tiene por finalidad crear un banco de tejidos con afectación AME y estudiar las muestras obtenidas, solicitamos su colaboración en calidad de (marcar lo que corresponda): (padre, tutor, familiar) del paciente:

Muestras de músculo y médula espinal obtenidas de autopsia.

Muestras fetales en las que se ha constatado la alteración del gen SMN1 (disponibles luego de la interrupción voluntaria de un embarazo).

El objetivo de este estudio es disponer de muestras para realizar un banco de tejidos y procesarlos a medida que sea necesario.

Grado de identificación de las muestras y duración del almacenamiento de las mismas

Las muestras serán manejadas en los laboratorios de manera codificada. El donante de las muestras podrá ser identificado a través de un código cuyo acceso estará restringido a los Investigadores principales de los cuatro centros, que las recogerán y procesarán : Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), Hospital Sant Joan de Deu (Barcelona), Institut de Bioquímica Clínica (Barcelona), Hospital Valle Hebrón (Barcelona) Hospital Ramón y Cajal (Madrid), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital La Fe (Valencia).

Una de las tareas del proyecto es crear un Banco nacional de materiales biológicos de pacientes AME, por lo que una vez estudiadas, las muestras serán almacenadas por tiempo indefinido en los Centros donde trabajan los investigadores (Ver Anexo con los grupos de investigación).

¿Cómo se protegerá la confidencialidad?

Los datos se manejarán y estarán protegidos de acuerdo a la Ley orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter personal. Las bases de datos de trabajo en los laboratorios no contendrán datos personales que permitan la identificación de los participantes en el estudio. Los datos obtenidos solo podrán ser hechos públicos de forma anónima y agregada, es decir en forma de datos sin identificación del participante y nunca de manera individual.

Doy el consentimiento para guardar indefinidamente la muestra y sus derivados que podrán ser usados para investigación

- SI NO

En el caso de que haya contestado afirmativamente, exprese su preferencia en relación con la renovación de este consentimiento para un uso futuro de las mismas:

Deseo que me pidan la renovación escrita del consentimiento cuando vayan a utilizar mis muestras en cualquier otro proyecto sobre AME

Solo quiero que me informen de los proyectos en los que se utilicen mis muestras, pero no necesito que me pidan autorización previa para hacerlo.

No necesito que me informen de los proyectos a realizar en los que sean usadas las muestras que ahora dono

El proyecto GENAME, esperamos que tenga continuidad después de estos tres años y es muy posible que entren nuevos grupos de investigadores o que se renueven los actuales, le pedimos su consentimiento para seguir investigando en la muestras que hayan quedado almacenadas. ¿Da usted su consentimiento para ello?

- SI NO

¿Cuáles son mis derechos como participante?

La participación en el estudio es voluntaria. Usted puede escoger no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento. El retirarse del estudio no le representará ninguna penalidad o pérdida de beneficios potenciales a los que tiene derecho.

Si en algún momento desea retirar sus muestras del laboratorio o la información recogida en el registro, podrá hacerlo, sin tener que dar explicación alguna, pero le aconsejamos que hable primero con su investigador y su médico.

Para ello debe ponerse en contacto con el investigador que firma el presente consentimiento que lo comunicará a los investigadores que custodian sus datos y almacenen sus muestras.

¿Recibiré algún beneficio por participar en el estudio?

Esta donación es altruista y por lo tanto no conlleva ningún beneficio económico para la persona que dona las muestras.

Si usted acepta participar en este estudio, puede que obtenga o no beneficios médicos directos. Esperamos que la información que se obtenga como resultado de este estudio beneficie en el futuro la calidad de vida de las actuales y futuras generaciones de pacientes con AME.

Si está de acuerdo en colaborar para esta investigación, le rogamos que complete y firme abajo.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: Creación de un banco de tejidos de pacientes y muestras fetales con alteración del gen SMN1, responsable de la atrofia muscular espinal como parte del proyecto GENAME.

NOMBRE y APELLIDOS PACIENTE:

FECHA DE NACIMIENTO:

DIRECCION y TELEFONO DE CONTACTO:

Yo, (Nombre y apellidos padre/madre o afectado) -----

- He leído la hoja de información que se me ha entregado

- He podido hacer preguntas sobre el estudio

- He recibido suficiente información sobre el estudio

- He hablado con: (nombre del investigador) -----

Comprendo que mi participación es voluntaria y presto libremente mi conformidad para la obtención de las muestras.

Firma del Padre/Madre

Firma del investigador

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

ANEXO II:

Trabajo en preparación

En el transcurso de la tesis, se ha realizado un estudio de marcadores musculares durante el desarrollo humano, para observar las consecuencias del retraso en la maduración muscular y los defectos sinápticos observados en las muestras prenatales AME. Los resultados son parte de un trabajo todavía en preparación y se describen a continuación.

RESUMEN

Estudio de diferentes proteínas musculares y marcadores de células satélite en la atrofia muscular espinal durante el desarrollo humano.

Dentro del estudio de la maduración muscular en la AME, se ha caracterizado la expresión de diferentes proteínas del desarrollo muscular.

En estudios previos de músculo AME postnatal se han observado cambios en la expresión de proteínas musculares como diferentes isoformas de la cadena pesada de la miosina (MHC), troponina, tropomiosina, NCAM, vimentina y desmina. Además, en estudios realizados con modelos de ratón también observan defectos en el patrón de ciertas miosinas musculares y en células satélite. El objetivo fue entonces realizar un estudio comparativo de las isoformas rápida, lenta y del desarrollo de las miosinas, vimentina y desmina, y PAX7 como marcador de células satélite, tanto en muestras prenatales AME y controles.

Los resultados indicaron que la miosina lenta se expresaba en niveles más bajos en las muestras AME. La miosina rápida, en cambio tenía un patrón similar al observado en los controles. La desmina y la vimentina mostraron una expresión similar entre controles y AME, aunque en muestras postnatales ya se había demostrado un aumento de expresión de la vimentina en las fibras musculares atroficas. Por otro lado, se observó un ligero aumento de células Pax7 positivas en el tejido intersticial muscular de AME. Estos resultados preliminares aportarían nuevas evidencias de que el músculo AME sigue un patrón de maduración distinto al músculo control. Así la baja expresión de miosina lenta reflejaría una disminución de formación de miotubos primarios en esta etapa del desarrollo. Por otro lado el aumento de células Pax7 positivas en el exterior de las fibras musculares podría representar una disminución de la fusión de mioblastos, dando lugar a un retraso en la maduración muscular.

A COMPARATIVE STUDY OF DEVELOPMENTAL MUSCLE PROTEINS AND SATELLITE CELLS MARKERS IN PRENATAL TYPE I SMA MUSCLES

Rebeca Martínez-Hernández, Sara Bernal, Laura Alias and Eduardo F. Tizzano.

Department of Genetics, IIB Sant Pau Research Institut, Hospital de Sant Pau and CIBERER, Barcelona, Spain

SUMMARY

To further expand our knowledge about SMA during human development we aimed to obtain evidence of primary muscle involvement in the disease. We previously reported a morphometric analysis of fetal SMA muscle, showing a significant decrease in the size of myotubes and pointing to a delayed maturation of muscle in SMA. In the present work, we analyzed the expression of muscle cytoskeleton components such as slow, fast and developmental myosin, vimentin and desmin during human development in control and SMA samples. Furthermore, we studied the expression of Pax7 positive cells as a marker of satellite cells. At 12 to 14 weeks of gestational age, slow myosin was detected in most primary myotubes, whereas the expression was lower in SMA. Fast myosin appeared to be located in secondary myotubes and satellite cells, whereas developmental myosin was expressed throughout muscle tissue. Desmin and vimentin were highly expressed at prenatal stages without notable differences between control and SMA samples. However, at postnatal stages, both proteins showed a positive immunostaining in SMA atrophic fibers. Pax7 positive cells were present on the surface of myotubes and outside muscle fibers in the surrounding endomysium and perimysium. In SMA samples, a significant increase was found in the total number of Pax7 positive cells, with a tendency to predominate outside the basal lamina of myotubes. All these findings support the idea of a delay in maturation in SMA muscle in prenatal stages of development.

INTRODUCTION

Muscle denervation in SMA patients results from motor neuron dysfunction. However, the role of muscle in SMA pathogenesis is still unknown. Our aim was to extend the study of SMA during human development in order to find evidence of primary muscle involvement in SMA.

Myosins are a group of motor proteins known for their role in muscle contraction and their involvement in a wide range of other eukaryotic motility processes. Myosin II is generated in skeletal muscle and consists of four light chains and two heavy chains. Myosin heavy chains (MHC) exist in several isoforms that are regulated in a tempo-spatial specific manner. During development, MHC isoforms are expressed sequentially. Early primary myotubes express an embryonic form that is later replaced by fast or slow forms which will define the profile of muscle fibers. Most primary myotubes take on the profile of slow fibers and express only slow myosin beyond the neonatal period. Secondary myotubes, however, are hybrid fibers and can express variable combinations of fetal/neonatal, fast and slow myosin. In postnatal human muscle, most fibers express either slow or fast MHC isoforms, corresponding to the histochemical type 1 and 2 fiber types, respectively (Dubowitz and Sewry 2007).

Expression of vimentin and desmin is found in fetal fibers and in immature myotubes. During muscle maturation, the expression of vimentin progressively disappears and desmin becomes reorganized at the Z line (Dubowitz and Sewry 2007).

Satellite cells (SCs), located between the sarcolemma and the basal lamina of muscle fibers, are muscle stem cells, and they represent the major regenerative population in skeletal muscle. SCs are usually identified by the expression of Pax7 and proliferate during early development. Later in development, SCs withdraw from the cell cycle and become quiescent. In the prenatal period, these myogenic

cells accumulate on the surface of myotubes even before a basal lamina forms. Furthermore, SCs seem to be able to migrate across the basal lamina in a variety of conditions (Bischoff and Franzini-Armstrong 2004).

Expression of MHC isoforms, vimentin and desmin has been reported in postnatal SMA muscle (Soussi-Yanicostas et al. 1992; Soubrouillard et al. 1995; Stathas et al. 2008; Stevens et al. 2008). However, no reports of the developmental expression of these proteins are available. In the present work we analyzed the expression of muscle cytoskeleton components such as slow, fast and developmental myosin, vimentin and desmin in control and SMA prenatal samples. Furthermore, we studied the expression of Pax7 positive cells, as a marker of SCs.

MATERIAL AND METHODS

Human samples

The project was approved by the Ethics Committee and the Research Institute at Hospital de Sant Pau in accordance with the Declaration of Helsinki. Family consent was obtained in all cases. Material from the second trimester of gestation was obtained immediately after elective terminations of pregnancy. Gestational age was determined from the last menstrual period and from ultrasound measurements. Prenatal SMN tests performed around 11 to 13 weeks of postmenstrual age allowed us to identify fetuses predicted to develop SMA in families with a previous patient affected by type I or type II disease. SMA fetuses were collected from therapeutic abortions after DNA analysis of chorionic villi confirmed a homozygous deletion of exons 7 and 8 of the SMN gene. In view of the possible damage present in this setting, all material was carefully evaluated for quality and only well conserved samples were selected for this study. The collected samples included: 3 control fetuses and 4 type I SMA specimens. Muscle from upper and lower limbs was isolated, snap frozen in nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C. Unfixed cryostat serial sections of 15 µm thickness were

collected on gelatine-coated slides and dried at room temperature before immunostaining. Intercostal and quadriceps muscle was obtained from four postnatal specimens (control=2; type I SMA=2). Immunohistochemical procedures were performed following the same protocol as for fetal samples.

Immunofluorescence

Serial sections of skeletal muscle were processed for immunofluorescence as previously described (Martínez-Hernández, 2012). For double immunofluorescence, sections were incubated overnight at 4°C with mouse anti-myosin for fast (MHCf), slow (MHCs) or developmental (MHCd) isoforms (Novocastra, Newcastle, UK), or alternatively using mouse anti-Pax7 (DSHB, Iowa) and rabbit anti-laminin (Sigma, MO, USA) antibodies. After incubation, sections were washed and incubated for 1 hour in Cy3-labelled goat anti-mouse IgG (Jackson, Newmarket, UK) and Alexa-488-labelled goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Oregon, USA). For single labeling, samples were incubated with mouse anti-desmin or mouse anti-vimentin antibodies (DAKO, Barcelona, Spain), and Cy3 goat anti-mouse as secondary antibody. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, Oregon, USA) for nuclear localization. Slides were then washed and mounted in Fluoprep (Biomerieux, Madrid, España). All sections were blindly examined at various magnifications with a Nikon ES-400 microscope and an SP5 Leica confocal microscope.

Expression analysis of myotubes

Transverse sections were examined at various magnifications under a Nikon ES-400 microscope and an SP5 Leica confocal microscope. For MHCf and MHCs expression analysis, a total of ~9000 myotubes were counted. For Pax7 we evaluated a total of ~1200 nuclei. According to the results, fast myosin expression was classified into three levels: double positive (++), positive (+) and negative (-). Slow myosin was classified as positive (+) or negative (-). All data were collected and analyzed by

testing the mean with a two-way and one-way ANOVA test. *P* values <0.05 were considered significant between SMA and control samples. . Calculations were undertaken with SPSS18.

RESULTS AND COMMENTS

Decreased expression of slow myosin in SMA prenatal samples

Table 1 shows a summary of results. In control foetuses, developmental myosin (MHCd) was expressed throughout muscle tissue (data not shown). Fast myosin (MHCf) was detected in secondary myotubes and satellite cells (**Figure 1A**), whereas slow myosin (MHCs) was found in primary myotubes (**Figure 1B**). Slow myosin was detected in fewer myotubes in SMA muscle than in controls (48% in controls versus 27% in SMA, $p<0.05$). Furthermore, double-positive fast-MHC myotubes were significantly higher in SMA than in controls (33% in SMA vs 27 % in controls, $p<0.05$) (**Figure 1C**). The decrease of slow myosin may reflect a reduction in the number of primary myotubes. The increase in double positive MHCf could be attributed to the appearance of new secondary myotubes at this stage. These findings strengthen the idea of a delay in maturation of foetal muscle in SMA disease.

Desmin and vimentin have normal expression in prenatal SMA

No differential expression of desmin or vimentin was observed in control and SMA prenatal muscle. The intermediate filament vimentin was expressed in cells of mesodermal origin: fibroblasts and endothelial and smooth muscle cells of blood vessels (**Figure 2**). In postnatal SMA muscle, no categorical differences were observed in desmin expression in comparison with controls. Vimentin shows immunoreactivity mainly in the smaller myofibers of SMA muscle (**Figure 2**), pointing to a failure of reorganization of myofibers during maturation.

Increase of Pax7 positive cells in interstitial tissue

Pax7 positive cells were observed in two locations: in nuclei inside the basal lamina of the myotube, and in the surrounding endomysium and perimysium outside the basal lamina (**Figure 3A**). The proportion of total Pax7 positive cells was increased in SMA samples (23% in controls vs 29% in SMA, $p < 0.05$). The proportion of Pax7 positive cells inside myotubes tended to be smaller in SMA than in controls (75% in controls vs 68% in SMA) (**Figure 3B**). Conversely, the proportion outside myotubes tended to be higher in SMA than in controls (24% in controls vs 31% in SMA). These findings suggest a dysfunction in myoblast fusion in SMA muscle development.

Table 1: Expression of several muscle proteins in control and prenatal and postnatal SMA muscle. For MHC and Pax 7 results: + denotes low expression (lower number of cells); ++ denotes high expression (higher number of cells).

	<u>Prenatal</u>		<u>Postnatal</u>	
	Control	SMA	Control	SMA
Slow MHC	Primary myotubes ++	Primary myotubes +	Mosaic pattern (depending of muscle type) ++	Hypertrophic fibers ++ Atrophic fibers ++
Fast MHC	Secondary myotubes ++	Secondary myotubes ++	Mosaic pattern (depending of muscle type) ++	Atrophic fibers ++
Developmental MHC	All myotubes +++	All myotubes +++	Not expressed	Atrophic fibers ++
Desmin	Intense generalized expression in all myotubes	Intense generalized expression in all myotubes	Sarcolemma	Subsarcolemma of atrophic fibers
Vimentin	Mesodermal cells	Mesodermal cells	Blood vessels	Blood vessels and subsarcolemma of atrophic fibers
Pax7	Satellite cells inside and outside basal lamina ++	Satellite cells inside and outside basal lamina ++	Satellite cells inside basal lamina +	Experiments ongoing

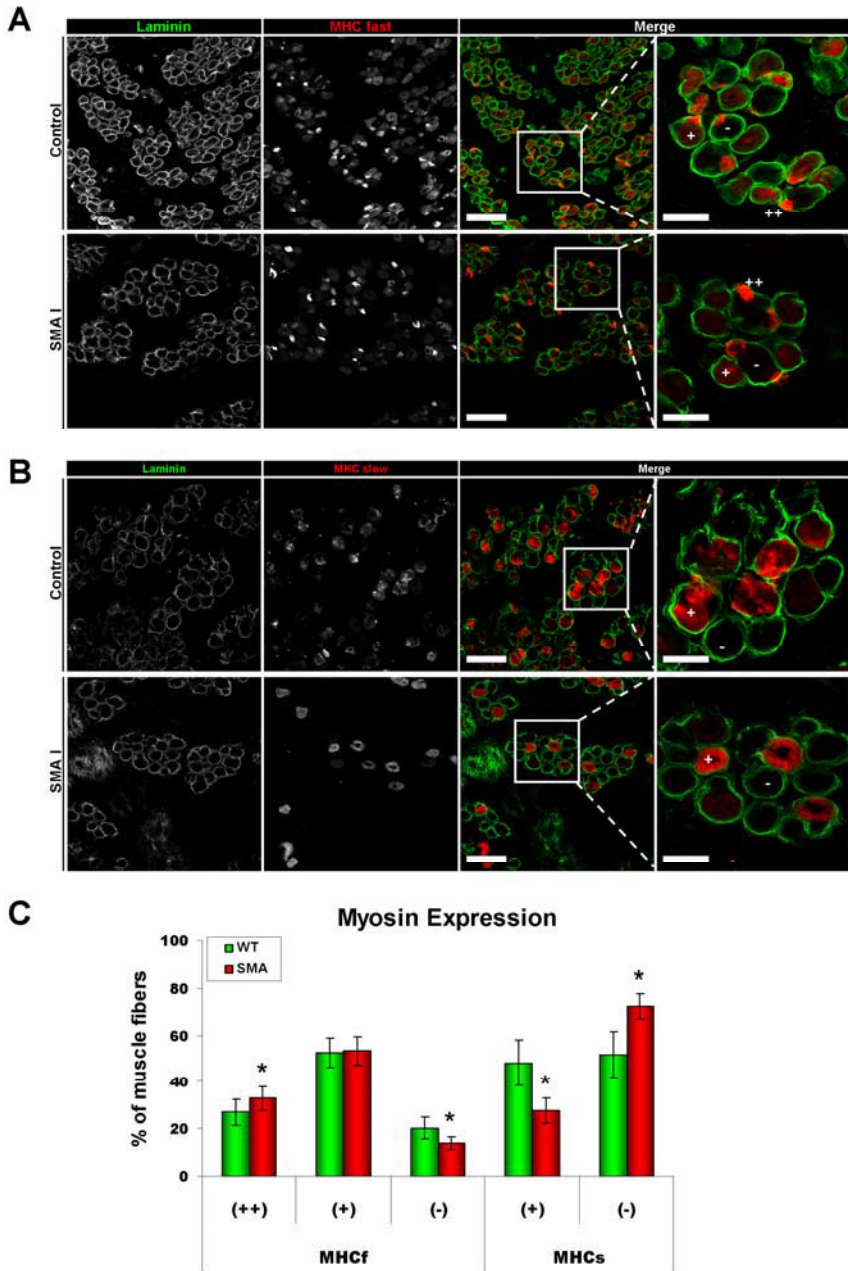


Figure 1: **A:** Expression of fast isoform of myosin heavy chain (MHCf). Detection was classified in three levels: positive (++), low expression (+) and negative (-). Most positive fibers are secondary myotubes or satellite cells, usually localized next to a primary myotube. **B:** Expression of slow myosin heavy chain (MHCs) classified as positive (+) or negative (-). Positive fibers in these samples correspond to primary myotubes. **C:** Percentage of positive and negative MHCf and MHCs fibers in control and SMA muscle. Note the decrease of MHCs+ cells ($p < 0.05$). Scale bar: 50 and 20 μm .

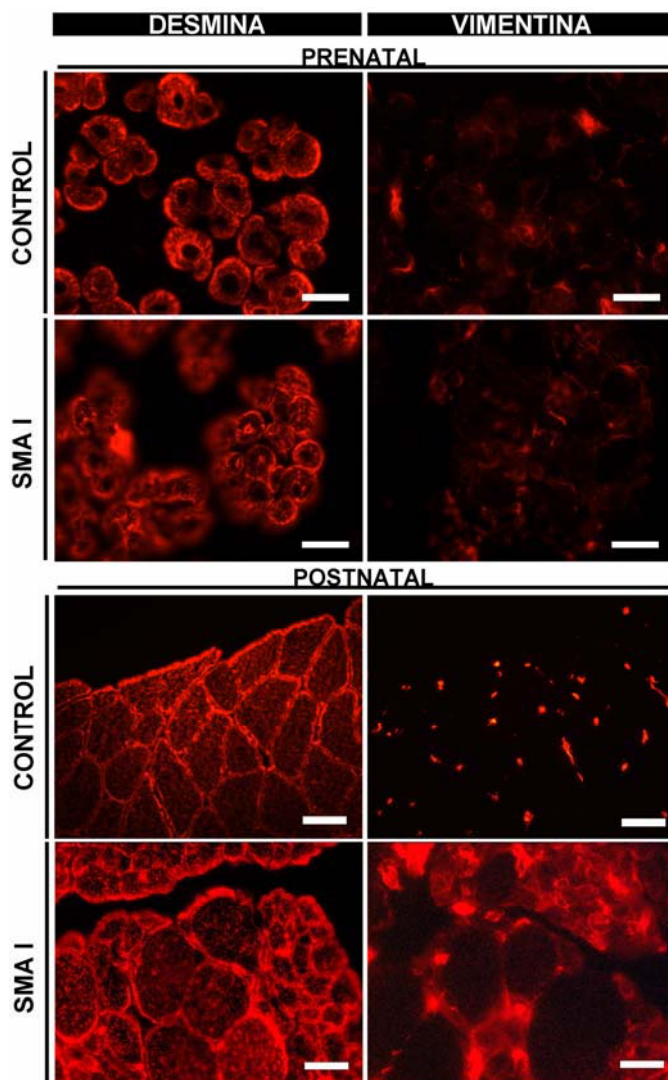


Figure 2: Expression of desmin and vimentin in prenatal and postnatal samples of control and SMA muscle. No differences were observed in control and SMA prenatal samples of either protein. In SMA postnatal samples, vimentin was highly expressed in atrophic fibers. Scale bar: 20 and 50 μm .

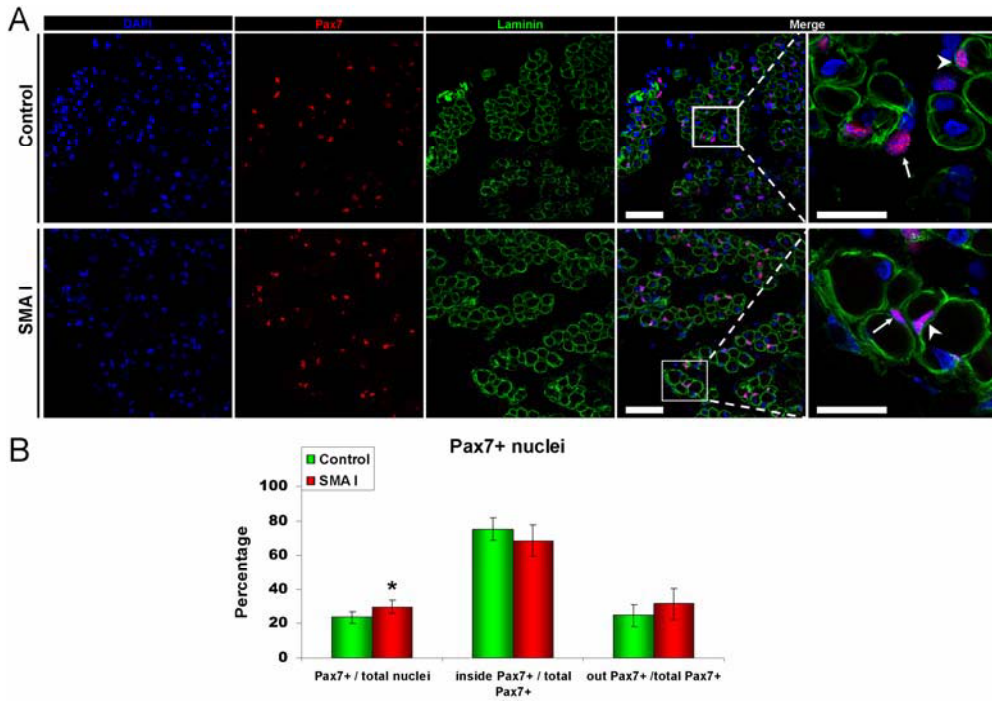


Figure 3: A: Double immunofluorescence of laminin (green), Pax7 (red) and DAPI for nuclear staining (blue) in developing muscle. Two populations of Pax7+ cells were identified: one located inside the basal lamina (arrowhead) and the other outside muscle fibers in the interstitial muscular tissue (arrow). **B:** Quantification of Pax7 positive cells. Note the small increase of positive cells outside muscle fibers in SMA, denoting possible defects in myoblast fusion ($p < 0.05$). Scale bar: 50 and 20 μm .

VIII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alias, L., S. Bernal, M. J. Barcelo, E. Also-Rallo, R. Martinez-Hernandez, F. J. Rodriguez-Alvarez, C. Hernandez-Chico, M. Baiget and E. F. Tizzano (2011). "Accuracy of marker analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction, and multiple ligation-dependent probe amplification to determine SMN2 copy number in patients with spinal muscular atrophy." Genet Test Mol Biomarkers **15**(9): 587-94.
- Alias, L., S. Bernal, P. Fuentes-Prior, M. J. Barcelo, E. Also, R. Martinez-Hernandez, F. J. Rodriguez-Alvarez, Y. Martin, E. Aller, E. Grau, A. Pecina, G. Antinolo, E. Galan, A. L. Rosa, M. Fernandez-Burriel, S. Borrego, J. M. Millan, C. Hernandez-Chico, M. Baiget and E. F. Tizzano (2009). "Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene." Hum Genet **125**(1): 29-39.
- Also-Rallo, E., L. Alias, R. Martinez-Hernandez, L. Caselles, M. J. Barcelo, M. Baiget, S. Bernal and E. F. Tizzano (2011). "Treatment of spinal muscular atrophy cells with drugs that upregulate SMN expression reveals inter- and intra-patient variability." Eur J Hum Genet **19**(10): 1059-65.
- Andreassi, C., J. Jarecki, J. Zhou, D. D. Coovert, U. R. Monani, X. Chen, M. Whitney, B. Pollok, M. Zhang, E. Androphy and A. H. Burghes (2001). "Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients." Hum Mol Genet **10**(24): 2841-9.
- Angelozzi, C., F. Borgo, F. D. Tiziano, A. Martella, G. Neri and C. Brahe (2008). "Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells." J Med Genet **45**(1): 29-31.
- Anhuf, D., T. Eggermann, S. Rudnik-Schoneborn and K. Zerres (2003). "Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology." Hum Mutat **22**(1): 74-8.
- Arabin, B. (2004). "Two-dimensional real-time ultrasound in the assessment of fetal activity in single and multiple pregnancy." Ultrasound Rev Obstet Gynecol **4**: 37-45.
- Arkblad, E. L., N. Darin, K. Berg, E. Kimber, G. Brandberg, C. Lindberg, E. Holmberg, M. Tulinius and M. Nordling (2006). "Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy." Neuromuscul Disord **16**(12): 830-8.
- Arnold, A. S., M. Gueye, S. Guettier-Sigrist, I. Courdier-Fruh, G. Coupin, P. Poindron and J. P. Gies (2004). "Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients." Lab Invest **84**(10): 1271-8.

- Balabanian, S., N. H. Gendron and A. E. MacKenzie (2007). "Histologic and transcriptional assessment of a mild SMA model." Neurol Res **29**(5): 413-24.
- Baumer, D., O. Ansorge, M. Almeida and K. Talbot (2010). "The role of RNA processing in the pathogenesis of motor neuron degeneration." Expert Rev Mol Med **12**: e21.
- Bebee, T. W., C. E. Dominguez and D. S. Chandler (2012). "Mouse models of SMA: tools for disease characterization and therapeutic development." Hum Genet **131**(8): 1277-93.
- Bernal, S., L. Alias, M. J. Barcelo, E. Also-Rallo, R. Martinez-Hernandez, J. Gamez, E. Guillen-Navarro, J. Rosell, I. Hernando, F. J. Rodriguez-Alvarez, S. Borrego, J. M. Millan, C. Hernandez-Chico, M. Baiget, P. Fuentes-Prior and E. F. Tizzano (2010). "The c.859G>C variant in the SMN2 gene is associated with types II and III SMA and originates from a common ancestor." J Med Genet **47**(9): 640-2.
- Bernal, S., E. Also-Rallo, R. Martinez-Hernandez, L. Alias, F. J. Rodriguez-Alvarez, J. M. Millan, C. Hernandez-Chico, M. Baiget and E. F. Tizzano (2011). "Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) sibilings." Neuromuscul Disord **21**(6): 413-9.
- Bevan, A. K., S. Duque, K. D. Foust, P. R. Morales, L. Braun, L. Schmelzer, C. M. Chan, M. McCrate, L. G. Chicoine, B. D. Coley, P. N. Porensky, S. J. Kolb, J. R. Mendell, A. H. Burghes and B. K. Kaspar (2011). "Systemic gene delivery in large species for targeting spinal cord, brain, and peripheral tissues for pediatric disorders." Mol Ther **19**(11): 1971-80.
- Bischoff, R. and C. Franzini-Armstrong, Eds. (2004). Satellite and Stem Cells in Muscle Regeneration. In: Myology. New York, McGraw-Hill.
- Boon, K. L., S. Xiao, M. L. McWhorter, T. Donn, E. Wolf-Saxon, M. T. Bohnsack, C. B. Moens and C. E. Beattie (2009). "Zebrafish survival motor neuron mutants exhibit presynaptic neuromuscular junction defects." Hum Mol Genet **18**(19): 3615-25.
- Bowerman, M., C. L. Anderson, A. Beauvais, P. P. Boyl, W. Witke and R. Kothary (2009). "SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis." Mol Cell Neurosci **42**(1): 66-74.
- Bowerman, M., K. J. Swoboda, J. P. Michalski, G. S. Wang, C. Reeks, A. Beauvais, K. Murphy, J. Woulfe, R. A. Sreaton, F. W. Scott and R. Kothary (2012). "Glucose metabolism and pancreatic defects in spinal muscular atrophy." Ann Neurol **72**(2): 256-68.
- Brahe, C., T. Vitali, F. D. Tiziano, C. Angelozzi, A. M. Pinto, F. Borgo, U. Moscato, E. Bertini, E. Mercuri and G. Neri (2005). "Phenylbutyrate increases SMN gene

- expression in spinal muscular atrophy patients." Eur J Hum Genet **13**(2): 256-9.
- Brichta, L., I. Holker, K. Haug, T. Klockgether and B. Wirth (2006). "In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate." Ann Neurol **59**(6): 970-5.
- Briese, M., B. Esmaili, S. Fraboulet, E. C. Burt, S. Christodoulou, P. R. Towers, K. E. Davies and D. B. Sattelle (2009). "Deletion of *smn-1*, the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the spinal muscular atrophy gene, results in locomotor dysfunction and reduced lifespan." Hum Mol Genet **18**(1): 97-104.
- Briese, M., B. Esmaili and D. B. Sattelle (2005). "Is spinal muscular atrophy the result of defects in motor neuron processes?" Bioessays **27**(9): 946-57.
- Brzustowicz, L. M., T. Lehner, L. H. Castilla, G. K. Penchaszadeh, K. C. Wilhelmsen, R. Daniels, K. E. Davies, M. Leppert, F. Ziter, D. Wood and et al. (1990). "Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3." Nature **344**(6266): 540-1.
- Buffelli, M., G. Busetto, C. Bidoia, M. Favero and A. Cangiano (2004). "Activity-dependent synaptic competition at mammalian neuromuscular junctions." News Physiol Sci **19**: 85-91.
- Burglen, L., T. Seroz, P. Miniou, S. Lefebvre, P. Burlet, A. Munnich, E. V. Pequignot, J. M. Egly and J. Melki (1997). "The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease." Am J Hum Genet **60**(1): 72-9.
- Burlet, P., C. Huber, S. Bertrand, M. A. Ludosky, I. Zwaenepoel, O. Clermont, J. Roume, A. L. Delezoide, J. Cartaud, A. Munnich and S. Lefebvre (1998). "The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **7**(12): 1927-33.
- Burnett, B. G., E. Munoz, A. Tandon, D. Y. Kwon, C. J. Sumner and K. H. Fischbeck (2009). "Regulation of SMN protein stability." Mol Cell Biol **29**(5): 1107-15.
- Bussaglia, E., O. Clermont, E. Tizzano, S. Lefebvre, L. Burglen, C. Cruaud, J. A. Urtizbera, J. Colomer, A. Munnich, M. Baiget and et al. (1995). "A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients." Nat Genet **11**(3): 335-7.
- Bussaglia, E., E. F. Tizzano, I. Illa, C. Cervera and M. Baiget (1997). "Cramps and minimal EMG abnormalities as preclinical manifestations of spinal muscular atrophy patients with homozygous deletions of the SMN gene." Neurology **48**(5): 1443-5.

- Butler, T. M., M. J. Siegman, S. U. Mooers and S. R. Narayan (1990). "Myosin-product complex in the resting state and during relaxation of smooth muscle." Am J Physiol **258**(6 Pt 1): C1092-9.
- Cartegni, L. and A. R. Krainer (2002). "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1." Nat Genet **30**(4): 377-84.
- Carter, T. A., C. G. Bonnemann, C. H. Wang, S. Obici, E. Parano, M. De Fatima Bonaldo, B. M. Ross, G. K. Penchaszadeh, A. Mackenzie, M. B. Soares, L. M. Kunkel and T. C. Gilliam (1997). "A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions." Hum Mol Genet **6**(2): 229-36.
- Cauchi, R. J. (2010). "SMN and Gemins: 'we are family' ... or are we?: insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN." Bioessays **32**(12): 1077-89.
- Cifuentes-Diaz, C., T. Frugier, F. D. Tiziano, E. Lacene, N. Roblot, V. Joshi, M. H. Moreau and J. Melki (2001). "Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy." J Cell Biol **152**(5): 1107-14.
- Cifuentes-Diaz, C., S. Nicole, M. E. Velasco, C. Borra-Cebrian, C. Panozzo, T. Frugier, G. Millet, N. Roblot, V. Joshi and J. Melki (2002). "Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model." Hum Mol Genet **11**(12): 1439-47.
- Coady, T. H., T. D. Baughan, M. Shababi, M. A. Passini and C. L. Lorson (2008). "Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts." PLoS One **3**(10): e3468.
- Coady, T. H. and C. L. Lorson (2010). "Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy." J Neurosci **30**(1): 126-30.
- Coady, T. H. and C. L. Lorson (2011). "SMN in spinal muscular atrophy and snRNP biogenesis." Wiley Interdiscip Rev RNA **2**(4): 546-64.
- Coers, C. and A. L. Woolf (1959). "The innervation of muscle. A biopsy study." Oxford: Blackwell scientific publications.
- Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, S. Salani, D. Ronchi, F. Saladino, A. Bordoni, F. Fortunato, R. Del Bo, D. Papadimitriou, F. Locatelli, G. Menozzi, S. Strazzer, N. Bresolin and G. P. Comi (2008). "Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy." J Clin Invest **118**(10): 3316-30.
- Corti, S., M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, S. Salani, D. Ronchi, C. Simone, M. Falcone, D. Papadimitriou, F. Locatelli, N. Mezzina, F. Gianni, N. Bresolin

- and G. P. Comi (2010). "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice." Brain **133**(Pt 2): 465-81.
- Crawford, T. O. and C. A. Pardo (1996). "The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy." Neurobiol Dis **3**(2): 97-110.
- Cusco, I., M. J. Barcelo, E. del Rio, M. Baiget and E. F. Tizzano (2004). "Detection of novel mutations in the SMN Tudor domain in type I SMA patients." Neurology **63**(1): 146-9.
- Cusco, I., M. J. Barcelo, E. del Rio, Y. Martin, C. Hernandez-Chico, E. Bussaglia, M. Baiget and E. F. Tizzano (2001). "Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases." Hum Genet **108**(3): 222-9.
- Cusco, I., M. J. Barcelo, R. Rojas-Garcia, I. Illa, J. Gamez, C. Cervera, A. Pou, G. Izquierdo, M. Baiget and E. F. Tizzano (2006). "SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings." J Neurol **253**(1): 21-5.
- Cusco, I., E. Lopez, C. Soler-Botija, M. Jesus Barcelo, M. Baiget and E. F. Tizzano (2003). "A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with c.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene." Hum Mutat **22**(2): 136-43.
- Cusin, V., O. Clermont, B. Gerard, D. Chantereau and J. Elion (2003). "Prevalence of SMN1 deletion and duplication in carrier and normal populations: implication for genetic counselling." J Med Genet **40**(4): e39.
- Chan, Y. B., I. Miguel-Aliaga, C. Franks, N. Thomas, B. Trulzsch, D. B. Sattelle, K. E. Davies and M. van den Heuvel (2003). "Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant." Hum Mol Genet **12**(12): 1367-76.
- Chang, H. C., D. N. Dimlich, T. Yokokura, A. Mukherjee, M. W. Kankel, A. Sen, V. Sridhar, T. A. Fulga, A. C. Hart, D. Van Vactor and S. Artavanis-Tsakonas (2008). "Modeling spinal muscular atrophy in Drosophila." PLoS One **3**(9): e3209.
- Chari, A., E. Paknia and U. Fischer (2009). "The role of RNP biogenesis in spinal muscular atrophy." Curr Opin Cell Biol **21**(3): 387-93.
- Chen, T. H., J. G. Chang, Y. H. Yang, H. H. Mai, W. C. Liang, Y. C. Wu, H. Y. Wang, Y. B. Huang, S. M. Wu, Y. C. Chen, S. N. Yang and Y. J. Jong (2010). "Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of hydroxyurea in spinal muscular atrophy." Neurology **75**(24): 2190-7.

- D'Amico, A., E. Mercuri, F. D. Tiziano and E. Bertini (2011). "Spinal muscular atrophy." Orphanet J Rare Dis **6**: 71.
- Dachs, E., M. Hereu, L. Piedrafita, A. Casanovas, J. Caldero and J. E. Esquerda (2011). "Defective neuromuscular junction organization and postnatal myogenesis in mice with severe spinal muscular atrophy." J Neuropathol Exp Neurol **70**(6): 444-61.
- Dahm, R. and P. Macchi (2007). "Human pathologies associated with defective RNA transport and localization in the nervous system." Biol Cell **99**(11): 649-61.
- de Vries, J. I., G. H. Visser and H. F. Prechtl (1982). "The emergence of fetal behaviour. I. Qualitative aspects." Early Hum Dev **7**(4): 301-22.
- Dickson, A., E. Osman and C. L. Lorson (2008). "A negatively acting bifunctional RNA increases survival motor neuron both in vitro and in vivo." Hum Gene Ther **19**(11): 1307-15.
- Dominguez, E., T. Marais, N. Chatauret, S. Benkhelifa-Ziyyat, S. Duque, P. Ravassard, R. Carcenac, S. Astord, A. Pereira de Moura, T. Voit and M. Barkats (2011). "Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice." Hum Mol Genet **20**(4): 681-93.
- Donker, M. E., B. H. Eijkelhof, G. M. Tan and J. I. de Vries (2009). "Serial postural and motor assessment of Fetal Akinesia Deformation Sequence (FADS)." Early Hum Dev **85**(12): 785-90.
- Draeger, A., A. G. Weeds and R. B. Fitzsimons (1987). "Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis." J Neurol Sci **81**(1): 19-43.
- Dubowitz, V. (1999). "Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype." Eur J Paediatr Neurol **3**(2): 49-51.
- Dubowitz, V. (2009). "Ramblings in the history of spinal muscular atrophy." Neuromuscul Disord **19**(1): 69-73.
- Dubowitz, V. and C. Sewry, Eds. (2007). Normal muscle. In: Muscle Biopsy. A practical approach. . Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Duxson, M. J. (1992). "The relationship of nerve to myoblasts and newly-formed secondary myotubes in the fourth lumbrical muscle of the rat foetus." J Neurocytol **21**(8): 574-88.
- Duxson, M. J., J. J. Ross and A. J. Harris (1986). "Transfer of differentiated synaptic terminals from primary myotubes to new-formed muscle cells during embryonic development in the rat." Neurosci Lett **71**(2): 147-52.

- Ebert, A. D., J. Yu, F. F. Rose, Jr., V. B. Mattis, C. L. Lorson, J. A. Thomson and C. N. Svendsen (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." Nature **457**(7227): 277-80.
- Echaniz-Laguna, A., P. Miniou, D. Bartholdi and J. Melki (1999). "The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements." Am J Hum Genet **64**(5): 1365-70.
- Eggert, C., A. Chari, B. Lagerbauer and U. Fischer (2006). "Spinal muscular atrophy: the RNP connection." Trends Mol Med **12**(3): 113-21.
- Einspieler, C., H. F. Prechtel, F. Ferrari, G. Cioni and A. F. Bos (1997). "The qualitative assessment of general movements in preterm, term and young infants--review of the methodology." Early Hum Dev **50**(1): 47-60.
- Engel, A. G., Ed. (2004). The Neuromuscular Junction. In: Myology. New York, McGraw-Hill.
- Felderhoff-Mueser, U., K. Grohmann, A. Harder, C. Stadelmann, K. Zerres, C. Buhrer and M. Obladen (2002). "Severe spinal muscular atrophy variant associated with congenital bone fractures." J Child Neurol **17**(9): 718-21.
- Feldkotter, M., V. Schwarzer, R. Wirth, T. F. Wienker and B. Wirth (2002). "Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy." Am J Hum Genet **70**(2): 358-68.
- Ferri, A., J. Melki and A. C. Kato (2004). "Progressive and selective degeneration of motoneurons in a mouse model of SMA." Neuroreport **15**(2): 275-80.
- Fidzianska, A. (1971). "Electron microscopic study of the development of human foetal muscle, motor end-plate and nerve. Preliminary report." Acta Neuropathol **17**(3): 234-47.
- Fidzianska, A. (1974). "Ultrastructural changes in muscle in spinal muscular atrophy. Werding-Hoffmann's disease." Acta Neuropathol **27**(3): 247-56.
- Fidzianska, A. (1980). "Human ontogenesis. I. Ultrastructural characteristics of developing human muscle." J Neuropathol Exp Neurol **39**(4): 476-86.
- Fidzianska, A. (1980). "Human ontogenesis. II. Development of the human neuromuscular junction." J Neuropathol Exp Neurol **39**(5): 606-15.
- Fidzianska, A., H. H. Goebel and I. Warlo (1990). "Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism." Brain **113 (Pt 2)**: 433-45.
- Fidzianska, A. and I. Hausmanowa-Petrusewicz (1984). "Morphology of the lower motor neuron and muscle." In: Gamstorp J, Sarnat HB editors. Progressive spinal muscular atrophies. Raven Press, New York.: 55-89.

- Fidzianska, A. and J. Rafalowska (2002). "Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses." Acta Neuropathol **104**(4): 363-8.
- Finkel, R. S., T. O. Crawford, K. J. Swoboda, P. Kaufmann, P. Juhasz, X. Li, Y. Guo, R. H. Li, F. Trachtenberg, S. J. Forrest, D. T. Kobayashi, K. S. Chen, C. L. Joyce and T. Plasterer (2012). "Candidate proteins, metabolites and transcripts in the Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy (BforSMA) clinical study." PLoS One **7**(4): e35462.
- Flower, M. J. (1985). "Neuromaturation of the human fetus." J Med Philos **10**(3): 237-51.
- Foust, K. D., X. Wang, V. L. McGovern, L. Braun, A. K. Bevan, A. M. Haidet, T. T. Le, P. R. Morales, M. M. Rich, A. H. Burghes and B. K. Kaspar (2010). "Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN." Nat Biotechnol **28**(3): 271-4.
- Friesen, W. J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G. S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2001). "The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins." Mol Cell Biol **21**(24): 8289-300.
- Frugier, T., F. D. Tiziano, C. Cifuentes-Diaz, P. Miniou, N. Roblot, A. Dierich, M. Le Meur and J. Melki (2000). "Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **9**(5): 849-58.
- Gambier-Chevallay, M. (1993). Développement du muscle squelettique foetal humain. Laboratoire de Neurohistologie. Paris, École Pratique des Hautes Études.
- Ghosh, S. and G. K. Dhoot (1998). "Evidence for distinct fast and slow myogenic cell lineages in human foetal skeletal muscle." J Muscle Res Cell Motil **19**(4): 431-41.
- Giesemann, T., S. Rathke-Hartlieb, M. Rothkegel, J. W. Bartsch, S. Buchmeier, B. M. Jockusch and H. Jockusch (1999). "A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems." J Biol Chem **274**(53): 37908-14.
- Girardet, A., C. Fernandez and M. Claustres (2008). "Efficient strategies for preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy." Fertil Steril **90**(2): 443 e7-12.
- Glass, J. D., N. M. Boulis, K. Johe, S. B. Rutkove, T. Federici, M. Polak, C. Kelly and E. L. Feldman (2012). "Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients." Stem Cells **30**(6): 1144-51.

- Gramsbergen, A., I. J.-P. J., P. G. Nikkels and M. Hadders-Algra (1997). "Regression of polyneural innervation in the human psoas muscle." Early Hum Dev **49**(1): 49-61.
- Grzeschik, S. M., M. Ganta, T. W. Prior, W. D. Heavlin and C. H. Wang (2005). "Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells." Ann Neurol **58**(2): 194-202.
- Guettier-Sigrist, S., B. Hugel, G. Coupin, J. M. Freyssinet, P. Poindron and J. M. Warter (2002). "Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy." Muscle Nerve **25**(5): 700-8.
- Hammond, S. M., R. G. Gogliotti, V. Rao, A. Beauvais, R. Kothary and C. J. DiDonato (2010). "Mouse survival motor neuron alleles that mimic SMN2 splicing and are inducible rescue embryonic lethality early in development but not late." PLoS One **5**(12): e15887.
- Harris, A. J., M. J. Duxson, R. B. Fitzsimons and F. Rieger (1989). "Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles." Development **107**(4): 771-84.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I. (1988). "Electrophysiological findings in childhood spinal muscular atrophies." Rev Neurol (Paris) **144**(11): 716-20.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I., A. Fidzianska, I. Niebroj-Dobosz and M. H. Strugalska (1980). "Is Kugelberg-Welander spinal muscular atrophy a fetal defect?" Muscle Nerve **3**(5): 389-402.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I. and G. Vrbova (2005). "Spinal muscular atrophy: a delayed development hypothesis." Neuroreport **16**(7): 657-61.
- Hesselmans, L. F., F. G. Jennekens, C. J. Van den Oord, H. Veldman and A. Vincent (1993). "Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: relation to acetylcholine receptors." Anat Rec **236**(3): 553-62.
- Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, C. H. Tsai and H. Li (2000). "A mouse model for spinal muscular atrophy." Nat Genet **24**(1): 66-70.
- Hughes, D. S. and M. Ontell (1992). "Morphometric analysis of the developing, murine aneural soleus muscle." Dev Dyn **193**(2): 175-84.
- Ijkema-Paassen, J. and A. Gramsbergen (2005). "Development of postural muscles and their innervation." Neural Plast **12**(2-3): 141-51; discussion 263-72.
- Illa, M. and F. Figueras. (2010). "Protocolo: Disminución de Movimientos Fetales." from http://www.medicinafetalbarcelona.org/clinica/images/protocolos/patologia_fetal/DisminucionMovimientosFetales_cast.pdf.

- Ito, Y., N. Shibata, K. Saito, M. Kobayashi and M. Osawa (2011). "New insights into the pathogenesis of spinal muscular atrophy." Brain Dev **33**(4): 321-31.
- Jablonka, S., M. Bandilla, S. Wiese, D. Buhler, B. Wirth, M. Sendtner and U. Fischer (2001). "Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **10**(5): 497-505.
- Jablonka, S., B. Holtmann, G. Meister, M. Bandilla, W. Rossoll, U. Fischer and M. Sendtner (2002). "Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10126-31.
- Jablonka, S., B. Schrank, M. Kralewski, W. Rossoll and M. Sendtner (2000). "Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III." Hum Mol Genet **9**(3): 341-6.
- Kariya, S., G. H. Park, Y. Maeno-Hikichi, O. Leykekhman, C. Lutz, M. S. Arkovitz, L. T. Landmesser and U. R. Monani (2008). "Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **17**(16): 2552-69.
- Kashima, T. and J. L. Manley (2003). "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy." Nat Genet **34**(4): 460-3.
- Kelly, A. M. and N. A. Rubinstein (1994). "The diversity of muscle fiber types and its origin during development." In: Engel AG, Franzini-Armstrong C editors. Myology. Basic and Clinical. McGraw-Hill.: 119-33.
- Kelly, T. E., K. Amoroso, M. Ferre, J. Blanco, P. Allinson and T. W. Prior (1999). "Spinal muscular atrophy variant with congenital fractures." Am J Med Genet **87**(1): 65-8.
- Kernochan, L. E., M. L. Russo, N. S. Woodling, T. N. Huynh, A. M. Avila, K. H. Fischbeck and C. J. Sumner (2005). "The role of histone acetylation in SMN gene expression." Hum Mol Genet **14**(9): 1171-82.
- Kinali, M., E. Mercuri, M. Main, F. De Biasia, A. Karatza, R. Higgins, L. M. Banks, A. Y. Manzur and F. Muntoni (2002). "Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy." Neurology **59**(4): 609-10.
- Kissel, J. T., C. B. Scott, S. P. Reyna, T. O. Crawford, L. R. Simard, K. J. Krosschell, G. Acsadi, B. Elsheik, M. K. Schroth, G. D'Anjou, B. LaSalle, T. W. Prior, S. Sorenson, J. A. Maczulski, M. B. Bromberg, G. M. Chan and K. J. Swoboda (2011). "SMA CARNIVAL TRIAL PART II: a prospective, single-armed trial of L-carnitine and valproic acid in ambulatory children with spinal muscular atrophy." PLoS One **6**(7): e21296.

- Kolb, S. J. and J. T. Kissel (2011). "Spinal muscular atrophy: a timely review." Arch Neurol **68**(8): 979-84.
- Kong, L., X. Wang, D. W. Choe, M. Polley, B. G. Burnett, M. Bosch-Marce, J. W. Griffin, M. M. Rich and C. J. Sumner (2009). "Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice." J Neurosci **29**(3): 842-51.
- Kurjak, A., W. Andonotopo, M. Stanojevic, D. Milenkovic, G. Azumendi, T. Hafner and B. Ujevic (2005). "Longitudinal study of fetal behavior by four-dimensional sonography." Ultrasound Rev Obstret Gynecol **5**: 259-274.
- Kuru, S., M. Sakai, M. Konagaya, M. Yoshida, Y. Hashizume and K. Saito (2009). "An autopsy case of spinal muscular atrophy type III (Kugelberg-Welander disease)." Neuropathology **29**(1): 63-7.
- La Bella, V., C. Cisterni, D. Salaun and B. Pettmann (1998). "Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated." Eur J Neurosci **10**(9): 2913-23.
- Le, T. T., L. T. Pham, M. E. Butchbach, H. L. Zhang, U. R. Monani, D. D. Coover, T. O. Gavriline, L. Xing, G. J. Bassell and A. H. Burghes (2005). "SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN." Hum Mol Genet **14**(6): 845-57.
- Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani and et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." Cell **80**(1): 155-65.
- Lefebvre, S., P. Burlet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss and J. Melki (1997). "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy." Nat Genet **16**(3): 265-9.
- Lesbordes, J. C., C. Cifuentes-Diaz, A. Miroglio, V. Joshi, T. Bordet, A. Kahn and J. Melki (2003). "Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **12**(11): 1233-9.
- Lewelt, A., T. M. Newcomb and K. J. Swoboda (2012). "New therapeutic approaches to spinal muscular atrophy." Curr Neurol Neurosci Rep **12**(1): 42-53.
- Liang, W. C., C. Y. Yuo, J. G. Chang, Y. C. Chen, Y. F. Chang, H. Y. Wang, Y. H. Ju, S. S. Chiou and Y. J. Jong (2008). "The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients." J Neurol Sci **268**(1-2): 87-94.
- Lichtman, J. W. and J. R. Sanes (2003). "Watching the neuromuscular junction." J Neurocytol **32**(5-8): 767-75.

- Lin, W., R. W. Burgess, B. Dominguez, S. L. Pfaff, J. R. Sanes and K. F. Lee (2001). "Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse." Nature **410**(6832): 1057-64.
- Ling, K. K., R. M. Gibbs, Z. Feng and C. P. Ko (2012). "Severe neuromuscular denervation of clinically relevant muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **21**(1): 185-95.
- Ling, K. K., M. Y. Lin, B. Zingg, Z. Feng and C. P. Ko (2010). "Synaptic defects in the spinal and neuromuscular circuitry in a mouse model of spinal muscular atrophy." PLoS One **5**(11): e15457.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang and G. Dreyfuss (1997). "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins." Cell **90**(6): 1013-21.
- Lorson, C. L. and E. J. Androphy (2000). "An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN." Hum Mol Genet **9**(2): 259-65.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy and B. Wirth (1999). "A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6307-11.
- Lorson, C. L., J. Strasswimmer, J. M. Yao, J. D. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A. H. Burghes and E. J. Androphy (1998). "SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity." Nat Genet **19**(1): 63-6.
- Lowrie, M. B. and G. Vrbova (1984). "Different pattern of recovery of fast and slow muscles following nerve injury in the rat." J Physiol **349**: 397-410.
- Lunn, M. R., D. E. Root, A. M. Martino, S. P. Flaherty, B. P. Kelley, D. D. Coovert, A. H. Burghes, N. T. Man, G. E. Morris, J. Zhou, E. J. Androphy, C. J. Sumner and B. R. Stockwell (2004). "Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism." Chem Biol **11**(11): 1489-93.
- MacLeod, M. J., J. E. Taylor, P. W. Lunt, C. G. Mathew and S. A. Robb (1999). "Prenatal onset spinal muscular atrophy." Eur J Paediatr Neurol **3**(2): 65-72.
- Marshall, A. and L. W. Duchon (1975). "Sensory system involvement in infantile spinal muscular atrophy." J Neurol Sci **26**(3): 349-59.
- Massenet, S., L. Pellizzoni, S. Paushkin, I. W. Mattaj and G. Dreyfuss (2002). "The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway." Mol Cell Biol **22**(18): 6533-41.
- Matera, A. G. and M. R. Frey (1998). "Coiled bodies and gems: Janus or gemini?" Am J Hum Genet **63**(2): 317-21.

- Mattis, V. B., R. Rai, J. Wang, C. W. Chang, T. Coady and C. L. Lorson (2006). "Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts." Hum Genet **120**(4): 589-601.
- McGovern, V. L., T. O. Gavrulina, C. E. Beattie and A. H. Burghes (2008). "Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse." Hum Mol Genet **17**(18): 2900-9.
- McWhorter, M. L., U. R. Monani, A. H. Burghes and C. E. Beattie (2003). "Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding." J Cell Biol **162**(5): 919-31.
- Meister, G., C. Eggert, D. Buhler, H. Brahms, C. Kambach and U. Fischer (2001). "Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln." Curr Biol **11**(24): 1990-4.
- Melki, J., P. Sheth, S. Abdelhak, P. Burlet, M. F. Bachelot, M. G. Lathrop, J. Frezal and A. Munnich (1990). "Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators." Lancet **336**(8710): 271-3.
- Menke, L. A., B. T. Poll-The, S. A. Clur, C. M. Bilardo, A. C. van der Wal, H. H. Lemmink and J. M. Cobben (2008). "Congenital heart defects in spinal muscular atrophy type I: a clinical report of two siblings and a review of the literature." Am J Med Genet A **146A**(6): 740-4.
- Mercuri, E., E. Bertini and S. T. Iannaccone (2012). "Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges." Lancet Neurol **11**(5): 443-52.
- Merlini, L., A. Solari, G. Vita, E. Bertini, C. Minetti, T. Mongini, E. Mazzone, C. Angelini and L. Morandi (2003). "Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results of a multicenter, randomized Italian study." J Child Neurol **18**(8): 537-41.
- Michaud, M., T. Arnoux, S. Bielli, E. Durand, Y. Rotrou, S. Jablonka, F. Robert, M. Giraudon-Paoli, M. Riessland, M. G. Mattei, E. Andriambeloson, B. Wirth, M. Sendtner, J. Gallego, R. M. Pruss and T. Bordet (2010). "Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy." Neurobiol Dis **38**(1): 125-35.
- Miller, R. G., D. H. Moore, V. Dronsky, W. Bradley, R. Barohn, W. Bryan, T. W. Prior, D. F. Gelinas, S. Iannaccone, J. Kissel, R. Leshner, J. Mendell, M. Mendoza, B. Russman, F. Samaha and S. Smith (2001). "A placebo-controlled trial of gabapentin in spinal muscular atrophy." J Neurol Sci **191**(1-2): 127-31.
- Monani, U. R., J. D. McPherson and A. H. Burghes (1999). "Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT)." Biochim Biophys Acta **1445**(3): 330-6.

- Monani, U. R., M. T. Pastore, T. O. Gavriline, S. Jablonka, T. T. Le, C. Andreassi, J. M. DiCocco, C. Lorson, E. J. Androphy, M. Sendtner, M. Podell and A. H. Burghes (2003). "A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy." J Cell Biol **160**(1): 41-52.
- Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Coovert, D. W. Parsons, C. Andreassi, T. T. Le, S. Jablonka, B. Schrank, W. Rossoll, T. W. Prior, G. E. Morris and A. H. Burghes (2000). "The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **9**(3): 333-9.
- Munsat, T. L. and K. E. Davies (1992). "International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany)." Neuromuscul Disord **2**(5-6): 423-8.
- Murayama, S., T. W. Bouldin and K. Suzuki (1991). "Immunocytochemical and ultrastructural studies of Werdnig-Hoffmann disease." Acta Neuropathol **81**(4): 408-17.
- Murray, L. M., L. H. Comley, D. Thomson, N. Parkinson, K. Talbot and T. H. Gillingwater (2008). "Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **17**(7): 949-62.
- Nicole, S., B. Desforges, G. Millet, J. Lesbordes, C. Cifuentes-Diaz, D. Vertes, M. L. Cao, F. De Backer, L. Languille, N. Roblot, V. Joshi, J. M. Gillis and J. Melki (2003). "Intact satellite cells lead to remarkable protection against *Smn* gene defect in differentiated skeletal muscle." J Cell Biol **161**(3): 571-82.
- Oprea, G. E., S. Krober, M. L. McWhorter, W. Rossoll, S. Muller, M. Krawczak, G. J. Bassell, C. E. Beattie and B. Wirth (2008). "Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy." Science **320**(5875): 524-7.
- Pagliardini, S., A. Giavazzi, V. Setola, C. Lizier, M. Di Luca, S. DeBiasi and G. Battaglia (2000). "Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord." Hum Mol Genet **9**(1): 47-56.
- Pane, M., S. Staccioli, S. Messina, A. D'Amico, M. Pelliccioni, E. S. Mazzone, M. Cuttini, P. Alfieri, R. Battini, M. Main, F. Muntoni, E. Bertini, M. Villanova and E. Mercuri (2008). "Daily salbutamol in young patients with SMA type II." Neuromuscul Disord **18**(7): 536-40.
- Park, G. H., S. Kariya and U. R. Monani (2010). "Spinal muscular atrophy: new and emerging insights from model mice." Curr Neurol Neurosci Rep **10**(2): 108-17.

- Park, G. H., Y. Maeno-Hikichi, T. Awano, L. T. Landmesser and U. R. Monani (2010). "Reduced survival of motor neuron (SMN) protein in motor neuronal progenitors functions cell autonomously to cause spinal muscular atrophy in model mice expressing the human centromeric (SMN2) gene." J Neurosci **30**(36): 12005-19.
- Pearn, J. (1978). "Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy." J Med Genet **15**(6): 409-13.
- Pearn, J. H. (1973). "Fetal movements and Werdnig-Hoffmann disease." J Neurol Sci **18**(4): 373-9.
- Pellizzoni, L., B. Charroux, J. Rappsilber, M. Mann and G. Dreyfuss (2001). "A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II." J Cell Biol **152**(1): 75-85.
- Peress, N. S., A. B. Stermann, R. Miller, C. G. Kaplan and B. W. Little (1986). "'Chromatolytic' neurons in lateral geniculate body in Werdnig-Hoffmann disease." Clin Neuropathol **5**(2): 69-72.
- Prior, T. W. (2010). "Spinal muscular atrophy: a time for screening." Curr Opin Pediatr **22**(6): 696-702.
- Prior, T. W., A. R. Krainer, Y. Hua, K. J. Swoboda, P. C. Snyder, S. J. Bridgeman, A. H. Burghes and J. T. Kissel (2009). "A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene." Am J Hum Genet **85**(3): 408-13.
- Reed, J. C. (1994). "Bcl-2 and the regulation of programmed cell death." J Cell Biol **124**(1-2): 1-6.
- Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri and M. Buckingham (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." Nature **435**(7044): 948-53.
- Riley, J., T. Federici, M. Polak, C. Kelly, J. Glass, B. Raore, J. Taub, V. Kesner, E. L. Feldman and N. M. Boulis (2012). "Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I safety trial, technical note, and lumbar safety outcomes." Neurosurgery **71**(2): 405-16.
- Rojas-Garcia, R., E. Tizzano, I. Cusco, E. Gallardo, M. J. Barcelo, I. de Andres, P. Larrode, J. F. Marti-Masso, J. A. Martinez-Matos, M. Povedano, B. Rallo, S. Serrano, M. Baiget and I. Illa (2002). "The absence of survival motor neuron 2 gene may play a role in multifocal motor neuropathy." Neurology **59**(7): 1112-3.
- Rose, F. F., Jr., V. B. Mattis, H. Rindt and C. L. Lorson (2009). "Delivery of recombinant follistatin lessens disease severity in a mouse model of spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **18**(6): 997-1005.

- Rossoll, W., S. Jablonka, C. Andreassi, A. K. Kroning, K. Karle, U. R. Monani and M. Sendtner (2003). "Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons." J Cell Biol **163**(4): 801-12.
- Rossoll, W., A. K. Kroning, U. M. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka and M. Sendtner (2002). "Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?" Hum Mol Genet **11**(1): 93-105.
- Roy, N., M. S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi, R. Farahani, S. Baird, A. Besner-Johnston, C. Lefebvre, X. Kang and et al. (1995). "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy." Cell **80**(1): 167-78.
- Rudnik-Schoneborn, S., C. Berg, K. Zerres, C. Betzler, T. Grimm, T. Eggermann, K. Eggermann, R. Wirth, B. Wirth and R. Heller (2009). "Genotype-phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy (SMA) type I in Germany: implications for clinical trials and genetic counselling." Clin Genet **76**(2): 168-78.
- Rudnik-Schoneborn, S., R. Heller, C. Berg, C. Betzler, T. Grimm, T. Eggermann, K. Eggermann, R. Wirth, B. Wirth and K. Zerres (2008). "Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy." J Med Genet **45**(10): 635-8.
- Rudnik-Schoneborn, S., S. Lutzenrath, J. Borkowska, A. Karwanska, I. Hausmanowa-Petrusewicz and K. Zerres (1998). "Analysis of creatine kinase activity in 504 patients with proximal spinal muscular atrophy types I-III from the point of view of progression and severity." Eur Neurol **39**(3): 154-62.
- Rudnik-Schoneborn, S., S. Vogelgesang, S. Armbrust, L. Graul-Neumann, C. Fusch and K. Zerres (2010). "Digital necroses and vascular thrombosis in severe spinal muscular atrophy." Muscle Nerve **42**(1): 144-7.
- Ruiz, R., J. J. Casanas, L. Torres-Benito, R. Cano and L. Tabares (2010). "Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice." J Neurosci **30**(3): 849-57.
- Russman, B. S., S. T. Iannaccone and F. J. Samaha (2003). "A phase 1 trial of riluzole in spinal muscular atrophy." Arch Neurol **60**(11): 1601-3.
- Salihagic-Kadic, A., A. Kurjak and M. Medic (2004). "Neurophysiology of fetal behaviour." Ultrasound Rev Obstet Gynecol: 2-11.
- Sandri, M. and U. Carraro (1999). "Apoptosis of skeletal muscles during development and disease." Int J Biochem Cell Biol **31**(12): 1373-90.

- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (1999). "Development of the vertebrate neuromuscular junction." Annu Rev Neurosci **22**: 389-442.
- Sanes, J. R. and J. W. Lichtman (2001). "Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus." Nat Rev Neurosci **2**(11): 791-805.
- Scharf, J. M., M. G. Endrizzi, A. Wetter, S. Huang, T. G. Thompson, K. Zerres, W. F. Dietrich, B. Wirth and L. M. Kunkel (1998). "Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics." Nat Genet **20**(1): 83-6.
- Schrank, B., R. Gotz, J. M. Gunnensen, J. M. Ure, K. V. Toyka, A. G. Smith and M. Sendtner (1997). "Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9920-5.
- Seale, P., L. A. Sabourin, A. Girgis-Gabardo, A. Mansouri, P. Gruss and M. A. Rudnicki (2000). "Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells." Cell **102**(6): 777-86.
- Sendtner, M. (2010). "Therapy development in spinal muscular atrophy." Nat Neurosci **13**(7): 795-9.
- Shababi, M., J. Habibi, H. T. Yang, S. M. Vale, W. A. Sewell and C. L. Lorson (2010). "Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models." Hum Mol Genet **19**(20): 4059-71.
- Shanmugarajan, S., K. J. Swoboda, S. T. Iannaccone, W. L. Ries, B. L. Maria and S. V. Reddy (2007). "Congenital bone fractures in spinal muscular atrophy: functional role for SMN protein in bone remodeling." J Child Neurol **22**(8): 967-73.
- Shefer, G., D. P. Van de Mark, J. B. Richardson and Z. Yablonka-Reuveni (2006). "Satellite-cell pool size does matter: defining the myogenic potency of aging skeletal muscle." Dev Biol **294**(1): 50-66.
- Simic, G. (2008). "Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy." Acta Neuropathol **116**(3): 223-34.
- Simic, G., M. Mladinov, D. Seso Simic, N. Jovanov Milosevic, A. Islam, A. Pajtak, N. Barisic, J. Sertic, P. J. Lucassen, P. R. Hof and B. Kruslin (2008). "Abnormal motoneuron migration, differentiation, and axon outgrowth in spinal muscular atrophy." Acta Neuropathol **115**(3): 313-26.
- Simic, G., D. Seso-Simic, P. J. Lucassen, A. Islam, Z. Krsnik, A. Cviko, D. Jelasic, N. Barisic, B. Winblad, I. Kostovic and B. Kruslin (2000). "Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease." J Neuropathol Exp Neurol **59**(5): 398-407.

- Sleigh, J. N., S. D. Buckingham, B. Esmaeili, M. Viswanathan, E. Cuppen, B. M. Westlund and D. B. Sattelle (2011). "A novel *Caenorhabditis elegans* allele, *smn-1(cb131)*, mimicking a mild form of spinal muscular atrophy, provides a convenient drug screening platform highlighting new and pre-approved compounds." Hum Mol Genet **20**(2): 245-60.
- Sleigh, J. N., T. H. Gillingwater and K. Talbot (2011). "The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy." Dis Model Mech **4**(4): 457-67.
- Soler-Botija, C., I. Cusco, E. Lopez, A. Clua, I. Gich, M. Baiget, I. Ferrer and E. F. Tizzano (2005). "Choline acetyltransferase expression does not identify early pathogenic events in fetal SMA spinal cord." Neuromuscul Disord **15**(3): 253-8.
- Soler-Botija, C., I. Ferrer, I. Gich, M. Baiget and E. F. Tizzano (2002). "Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord." Brain **125**(Pt 7): 1624-34.
- Soubrouillard, C., J. F. Pellissier, H. Lepidi, J. Mancini, G. Rougon and D. Figarella-Branger (1995). "Expression of developmentally regulated cytoskeleton and cell surface proteins in childhood spinal muscular atrophies." J Neurol Sci **133**(1-2): 155-63.
- Soussi-Yanicostas, N., C. Ben Hamida, K. Bejaoui, F. Hentati, M. Ben Hamida and G. S. Butler-Browne (1992). "Evolution of muscle specific proteins in Werdnig-Hoffman's disease." J Neurol Sci **109**(1): 111-20.
- Sparling, J. W., J. Van Tol and N. C. Chescheir (1999). "Fetal and neonatal hand movement." Phys Ther **79**(1): 24-39.
- Stathas, D., N. Kalfakis, E. Kararizou and P. Manta (2008). "Spinal muscular atrophy: DNA fragmentation and immaturity of muscle fibers." Acta Histochem **110**(1): 53-8.
- Stavarachi, M., P. Apostol, M. Toma, D. Cimponeriu and L. Gavrila (2010). "Spinal muscular atrophy disease: a literature review for therapeutic strategies." J Med Life **3**(1): 3-9.
- Stevens, L., B. Bastide, C. A. Maurage, E. Dupont, V. Montel, C. Cieniewski-Bernard, J. M. Cuisset, L. Vallee and Y. Mounier (2008). "Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions." Neuropathol Appl Neurobiol **34**(6): 659-70.
- Strasswimmer, J., C. L. Lorson, D. E. Breiding, J. J. Chen, T. Le, A. H. Burghes and E. J. Androphy (1999). "Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein." Hum Mol Genet **8**(7): 1219-26.

- Sumner, C. J. (2006). "Therapeutics development for spinal muscular atrophy." NeuroRx **3**(2): 235-45.
- Sumner, C. J., S. J. Kolb, G. G. Harmison, N. O. Jeffries, K. Schadt, R. S. Finkel, G. Dreyfuss and K. H. Fischbeck (2006). "SMN mRNA and protein levels in peripheral blood: biomarkers for SMA clinical trials." Neurology **66**(7): 1067-73.
- Swanson, A., E. Strawn, E. Lau and D. Bick (2007). "Preimplantation genetic diagnosis: technology and clinical applications." WMJ **106**(3): 145-51.
- Swoboda, K. J., T. W. Prior, C. B. Scott, T. P. McNaught, M. C. Wride, S. P. Reyna and M. B. Bromberg (2005). "Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function." Ann Neurol **57**(5): 704-12.
- Swoboda, K. J., C. B. Scott, S. P. Reyna, T. W. Prior, B. LaSalle, S. L. Sorenson, J. Wood, G. Acsadi, T. O. Crawford, J. T. Kissel, K. J. Krossschell, G. D'Anjou, M. B. Bromberg, M. K. Schroth, G. M. Chan, B. Elsheikh and L. R. Simard (2009). "Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy." PLoS One **4**(5): e5268.
- Tarrade, A., C. Fassier, S. Courageot, D. Charvin, J. Vitte, L. Peris, A. Thorel, E. Mouisel, N. Fonknechten, N. Roblot, D. Seilhean, A. Dierich, J. J. Hauw and J. Melki (2006). "A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition." Hum Mol Genet **15**(24): 3544-58.
- Tein, I., A. E. Sloane, E. J. Donner, D. C. Lehotay, D. S. Millington and R. I. Kelley (1995). "Fatty acid oxidation abnormalities in childhood-onset spinal muscular atrophy: primary or secondary defect(s)?" Pediatr Neurol **12**(1): 21-30.
- Tews, D. S. and H. H. Goebel (1996). "DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy." Neuromuscul Disord **6**(4): 265-73.
- Tews, D. S. and H. H. Goebel (1997). "Apoptosis-related proteins in skeletal muscle fibers of spinal muscular atrophy." J Neuropathol Exp Neurol **56**(2): 150-6.
- Tiziano, F. D., R. Lomastro, A. M. Pinto, S. Messina, A. D'Amico, S. Fiori, C. Angelozzi, M. Pane, E. Mercuri, E. Bertini, G. Neri and C. Brahe (2010). "Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design." J Med Genet **47**(12): 856-8.
- Tiziano, F. D., G. Neri and C. Brahe (2011). "Biomarkers in rare disorders: the experience with spinal muscular atrophy." Int J Mol Sci **12**(1): 24-38.
- Tizzano, E. F. (2010). "Atrofia Muscular Espinal Infantil " Protoc Diagn Ter Pediatr **1**: 125-30.

- Torres-Benito, L., M. F. Neher, R. Cano, R. Ruiz and L. Tabares (2011). "SMN requirement for synaptic vesicle, active zone and microtubule postnatal organization in motor nerve terminals." PLoS One **6**(10): e26164.
- Torres-Benito, L., R. Ruiz and L. Tabares (2011). "Synaptic defects in SMA animal models." Dev Neurobiol.
- Vezaín, M., P. Saugier-veber, E. Goína, R. Touraine, V. Manel, A. Toutain, S. Fehrenbach, T. Frebourg, F. Pagani, M. Tosi and A. Martins (2010). "A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon 7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy." Hum Mutat **31**(1): E1110-25.
- Visser, G. H., E. J. Mulder and H. F. Prechtel (1992). "Studies on developmental neurology in the human fetus." Dev Pharmacol Ther **18**(3-4): 175-83.
- Vitte, J., C. Fassier, F. D. Tiziano, C. Dalard, S. Soave, N. Roblot, C. Brahe, P. Saugier-veber, J. P. Bonnefont and J. Melki (2007). "Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products." Am J Pathol **171**(4): 1269-80.
- Vitte, J. M., B. Davoult, N. Roblot, M. Mayer, V. Joshi, S. Courageot, F. Tronche, J. Vadrot, M. H. Moreau, F. Kemeny and J. Melki (2004). "Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload." Am J Pathol **165**(5): 1731-41.
- Voss, M. D., A. Hille, S. Barth, A. Spurk, F. Hennrich, D. Holzer, N. Mueller-Lantsch, E. Kremmer and F. A. Grasser (2001). "Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter." J Virol **75**(23): 11781-90.
- Walker, M. P., T. K. Rajendra, L. Saieva, J. L. Fuentes, L. Pellizzoni and A. G. Matera (2008). "SMN complex localizes to the sarcomeric Z-disc and is a proteolytic target of calpain." Hum Mol Genet **17**(21): 3399-410.
- Wang, C. H., R. S. Finkel, E. S. Bertini, M. Schroth, A. Simonds, B. Wong, A. Aloysius, L. Morrison, M. Main, T. O. Crawford and A. Trela (2007). "Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy." J Child Neurol **22**(8): 1027-49.
- Williams, B. Y., S. Vinnakota, C. A. Sawyer, J. C. Waldrep, S. L. Hamilton and H. K. Sarkar (1999). "Differential subcellular localization of the survival motor neuron protein in spinal cord and skeletal muscle." Biochem Biophys Res Commun **254**(1): 10-4.
- Wirth, B. (2000). "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)." Hum Mutat **15**(3): 228-37.

- Wirth, B., L. Brichta, B. Schrank, H. Lochmuller, S. Blick, A. Baasner and R. Heller (2006). "Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number." Hum Genet **119**(4): 422-8.
- Wishart, T. M., J. P. Huang, L. M. Murray, D. J. Lamont, C. A. Mutsaers, J. Ross, P. Geldsetzer, O. Ansorge, K. Talbot, S. H. Parson and T. H. Gillingwater (2010). "SMN deficiency disrupts brain development in a mouse model of severe spinal muscular atrophy." Hum Mol Genet **19**(21): 4216-28.
- Witzemann, V. (2006). "Development of the neuromuscular junction." Cell Tissue Res **326**(2): 263-71.
- Workman, E., L. Saieva, T. L. Carrel, T. O. Crawford, D. Liu, C. Lutz, C. E. Beattie, L. Pellizzoni and A. H. Burghes (2009). "A SMN missense mutation complements SMN2 restoring snRNPs and rescuing SMA mice." Hum Mol Genet **18**(12): 2215-29.
- Yong, J., L. Wan and G. Dreyfuss (2004). "Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes?" Trends Cell Biol **14**(5): 226-32.
- Young, P. J., T. T. Le, M. Dunckley, T. M. Nguyen, A. H. Burghes and G. E. Morris (2001). "Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN." Exp Cell Res **265**(2): 252-61.
- Zerres, K., S. Rudnik-Schoneborn, E. Forrest, A. Lusakowska, J. Borkowska and I. Hausmanowa-Petrusewicz (1997). "A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients." J Neurol Sci **146**(1): 67-72.
- Zhang, H. L., F. Pan, D. Hong, S. M. Shenoy, R. H. Singer and G. J. Bassell (2003). "Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization." J Neurosci **23**(16): 6627-37.