FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

Disfunción del Metabolismo del RNA en las motoneuronas de la Atrofia Muscular Espinal.

Dysfunction of the RNA metabolism in motor neurons of the Spinal Muscular Atrophy.

Autora: Dña. Adriana Barquín Toca

Director: D. Miguel A. Lafarga Coscojuela

Santander, junio 2018

Agradecimientos

Quiero dar las gracias antes de nada a Miguel y a Maite, por todo el cariño que transmiten, la devoción plena a sus alumnos y a la docencia, y por haberme acompañado y guiado todos estos años, estableciéndose para mí como un referente que, algún día, espero poder alcanzar.

En segundo lugar, gracias a mi familia, a mis abuelos y a mi tía Teresa, por creer en mí y estar a mi lado durante toda la carrera, por todo vuestro apoyo y paciencia. Gracias mamá por animarme a perseguir mis sueños, aunque no siempre los entiendas, por enseñarme a defender mis ideas contra viento y marea; por ser el mejor ejemplo a seguir para mí. Gracias Santos, por todo, todos los consejos que me has regalado y todas las veces que te has sentado a escucharme. Gracias a mis tías, Ana y Ana Gema, por enseñarme el mundo más allá de los libros.

También quiero dar las gracias a mis amigas y amigos, que a pesar de todos los cambios vividos en estos 6 años han seguido a mi lado, sacándome sonrisas, regalándome momentos. En especial, gracias a Álvaro, él sabe por qué, y a Pablo, arquitecto y diseñador gráfico en sus ratos libres, que me ha ayudado a ultimar este trabajo Gracias, Blanca; no existe forma de agradecerte todo sólo con palabras. Y a mi compañero, por estar conmigo este último año, compartiendo mi entusiasmo e interés, incentivándolo, queriendo formar parte de él; me has ayudado más de lo que estás dispuesto a reconocer. Sin todos vosotros, llegar hasta aquí hubiese sido una cuesta mucho más empinada y pedregosa.

CONTENIDO

Palabras clave 4
Abstract 5
Resumen 5
1 Introducción 5
2 Metodología 6
3 Hitos Históricos en la Atrofia Muscular Espinal (SMA) 7
4 Epidemiología y características clínicas y fenotípicas de la SMA 9
5 Bases Genéticas de la SMA 12
5.1 Estructura del gen SMN 13
6 La proteína diana de la enfermedad. El factor de Supervivencia de las Neuronas Motoras (SMN) 15
6.1 Componentes y ensamblaje del complejo SMN 16
6.2 SMN, Gems y Cajal Bodies (CBs) 17
6.3 Las funciones conocidas de la proteína SMN 20
6.3.1 La proteína SMN, biogénesis de snRNPs y el proceso de splicing 20
6.3.2 SMN y splicing alternativo 23
6.3.3 La proteína SMN y los procesos de transcripción y traducción 24
6.3.4 Relación de la proteína SMN con el citoesqueleto de actina y participación en el transporte axonal 25
6.3.5 La proteína SMN en la UNM y la sarcómera 26
6.3.6 La proteína SMN, los telómeros y el ciclo celular 26
7 Patogenia de la SMA: bases celulares y moleculares de la disfunción del metabolismo del rna en las motoneuronas 27
7.1 Principales hipótesis patogénicas en la SMA: requisitos espaciales y temporales de SMN 27
7.2 El déficit de SMN conduce a un proceso de splicing deficiente y aberrante 30
7.3 Otras RNPs en la patogenia de la SMA 33
7.4 Alteraciones de los CBs en la SMA: el déficit de SMN altera la dinámica de los CBs 33
7.4.1 Redefiniendo los Marcadores Nucleares de la SMA 35
7.5 Alteraciones estructurales y funcionales en la maquinaria de traducción 36
8 Patogenia de la SMA: alteraciones de la unión neuromuscular y de las fibras musculares esqueléticas 37
9 Relación de la sma con otras enfermedades de la motoneurona y neurodegenerativas 39

10 Desarrollo Terapéutico en la SMA 40
10.1 Estrategias clásicas dependientes de SMN: amplificación de la proteína..... 41
10.1.1 Oligonucleótidos antisentido (ASOs) 42
10.1.2 Terapia Génica 43
10.1.3 Otras terapias dependientes de SMN..... 45
10.2 Estrategias terapéuticas independientes de SMN 45
10.2.1 Terapias independientes de SMN que mantienen su diana en el SNC 45
10.2.2 Terapias independientes de SMN que fijan su diana fuera del SNC 45
10.3 Potenciales dianas terapéuticas: vías modificadoras del fenotipo ... 46
10.4 La ventana terapéutica 48
11 Perspectivas de futuro en la sma 49
12 Referencias 52

PALABRAS CLAVE

SMA	Spinal Muscular Atrophy
Proteína SMN	Proteína de supervivencia de la motoneurona
SMN1 y 2	Las dos variantes humanas (parálogas) del gen SMN
SMNΔ7	Transcrito del gen SMN que excluye el exón 7
Proteínas Gemin y Unrip	Integrantes del complejo SMN junto con la propia proteína SMN
MNα	Motoneurona(s) alfa del asta anterior de la médula espinal
CB	Cuerpos de Cajal (Cajal Bodies)
Gems	"Gemin" de SMN
Coilina	Marcador molecular de los CBs
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
UNM	Unión(es) neuromuscular(es)
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares de pequeño tamaño (small nuclear ribonucleoproteins)
snoRNP	Ribonucleoproteínas nucleolares de pequeño tamaño (small nucleolar ribonucleoproteins)
mRNA y rRNA	RNA mensajero y ribosomal
RBP	Proteínas de unión a RNA (RNA binding proteins)
Splicing	Mecanismo de procesamiento del RNA ampliamente afectado en la SMA
ASO	Terapia con Oligonucleótidos Antisentido (antisense oligonucleotides) que favorecen la inclusión del exón 7 en el splicing alternativo del gen *SMN2*
scAAV9-*SMN1*	Vector viral serotipo 9 adenoasociado autocomplementario que vehiculiza una copia del gen *SMN1* humano
Ventana terapéutica	Periodo idóneo para la administración de la terapia

ABSTRACT

Spinal Muscular Atrophy (***SMA***) is a neurodegenerative autosomal recessive disease, characterized by the degeneration of the anterior spinal horn alpha motor neurons. Loss of *SMN1* gene accounts for more than 95% of the cases, being partially and differentially compensated, depending on the phenotype severity, by its homologous, the *SMN2* gene. Knowing SMA is a monogenic disease has allowed the scientific community to develop numerous experimental models, both *in vitro* and *in vivo*. This cellular and animal models have improved the knowledge about disease's pathogeny, recently leading to the redefinition of its histologic markers and its new characterization as a multisystemic disease, and led the way to different therapeutic approaches. In this vein, and given the fact SMA usually presents on childhood, in the future it will be critical to start a universal screening program, now that effective therapies begin to be available. At the present, the main challenges are to differentiate between primary and secondary pathogenic events, the settlement of a clear therapeutic window for every phenotype, and the development of complementary therapies that allow practitioners to face the patient's urges along the chronic phase of the disease.

RESUMEN

La ***Atrofia Muscular Espinal*** (*Spinal Muscular Atrophy*, ***SMA***) es una enfermedad neuromuscular, autosómica recesiva, caracterizada por la degeneración de las motoneuronas alfa del asta anterior de la médula espinal. Más del 95% de los casos se deben a la pérdida del gen *SMN1*, compensada de forma parcial y en diferente grado según la forma clínica de SMA, por su homólogo *SMN2*. La caracterización de la enfermedad como monogénica ha permitido desarrollar numerosos modelos experimentales, que han ampliado los conocimientos sobre la patogenia de la enfermedad y abierto diferentes aproximaciones terapéuticas. Entre otras cosas, han permitido recientemente redefinir los marcadores histológicos de la enfermedad, además de llevar a dejar de considerarla como una enfermedad específica de la motoneurona, para pasar a describirla como una enfermedad multisistémica. El momento de inicio del tratamiento es crítico, y dado que es una enfermedad de presentación típicamente infantil, la necesidad de instaurar un programa de cribado universal en un momento en el que comienzan a existir terapias efectivas disponibles, es indiscutible. Actualmente, los principales retos son la diferenciación de las alteraciones primarias y secundarias en la patogenia de la enfermedad, el establecimiento de los límites de la ventana terapéutica para todos los fenotipos, y el desarrollo de terapias combinadas que permitan enfrentarse a las necesidades de los pacientes en la fase crónica de la SMA.

1 INTRODUCCIÓN

En este trabajo se pretende realizar una revisión detallada de los conocimientos hasta ahora descritos respecto a los complejos mecanismos patogénicos que subyacen a la SMA. Aunque los primeros casos de SMA fueron reportados en 1891 por Guido Werning y, entre 1893 y 1900, por Johan Hoffmann, cuyos apellidos constituyen el epónimo de la forma más severa de la enfermedad

(Talbot & Tizzano, 2017), no fue hasta 1995 cuando se caracterizó la SMA como monogénica, relacionando más del 95% de los casos con la pérdida del gen *SMN1*. Aunque se tardó unos años más en correlacionar la variabilidad del número de copias de su parálogo *SMN2* con la severidad del fenotipo y establecer este gen como principal modificador de la enfermedad (Kolb & Kissel, 2011), desde entonces numerosos modelos experimentales han ido arrojando luz sobre el complejo entramado patogénico de la SMA, tratando de explicar cómo es posible que una única proteína con funciones *housekeeping*, pueda afectar de forma tan selectiva a las motoneuronas (MN) alfa, principal diana celular de la enfermedad (Bäumer et al., 2009). Gracias a estos modelos, a día de hoy sabemos que la que clásicamente se definió como "factor de supervivencia de las motoneuronas" (SMN), desempeña en realidad un gran número de funciones celulares fundamentales, algunas aún por descubrir, y que una enfermedad hasta ahora considerada como específica del sistema neuromuscular es en realidad multisistémica. Así, la SMA se ha redefinido como una patología del RNA ("RNAopathy") (Tiziano et al., 2013), en la que existe una clara disfunción del *splicing* de una lista cada vez mayor de genes, involucrando no solo el metabolismo del RNA en lo que respecta al ensamblaje ribosomal, transcripción y traducción, sino también diferentes estructuras celulares, destacando entre ellas los Cuerpos nucleares de Cajal ("*Cajal Bodies*", CBs), nucléolo, maquinaria de síntesis de proteínas, citoesqueleto de actina y uniones neuromusculares (Cauchi, 2010; Bernabó et al., 2017; Tapia et al., 2017). El desarrollo de las terapias clásicas, principalmente destinadas a incrementar los niveles de SMN, por lo que fueron denominadas "terapias SMN-dependientes", ha permitido que la SMA sea la primera enfermedad neurológica con una aproximación terapéutica eficaz, ya autorizada tanto por la FDA como por la EMA. Actualmente, están en desarrollo numerosas terapias complementarias, con dianas tanto dentro como fuera del SNC, SMN-independientes, especialmente relevantes en las fases crónicas de la enfermedad, en rangos de supervivencia antes no alcanzados por los pacientes, en los que las consecuencias del déficit de SMN en tejidos no neuronales podrían comenzar a reportarse, deteriorando la calidad de vida de los pacientes (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Bowerman et al., 2017). En este TFG se presenta una revisión bibliográfica de la SMA, atendiendo especialmente a las características clínicas y genéticas de la enfermedad, así como a la patogenia y a las modernas perspectivas terapéuticas. Fundamentalmente, se ha prestado atención a la función de la SMN, proteína diana de la SMA, y a los mecanismos patogénicos que, tanto a nivel celular como molecular, produce su déficit en el metabolismo del RNA, conduciendo finalmente, a la degeneración de las MN.

2 METODOLOGÍA

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido planteado en forma de revisión bibliográfica, basándose fundamentalmente en artículos indexados en PubMed y páginas dedicadas a la SMA. En particular, la bibliografía revisada se ha centrado en: **i)** características clínicas de la SMA; **ii)** estructura y función de la proteína SMN; **iii)** aspectos patogénicos de la SMA, atendiendo no solo a los conocimientos clásicos, sino también a las nuevas propuestas experimentales, en especial aquellas relacionadas con la participación de la fibra muscular esquelética; **iv)** aproximaciones terapéuticas en la SMA, y; **v)** modelos

experimentales en la SMA. Dicha revisión ha sido complementada con el análisis de microscopía óptica y electrónica de un modelo experimental de SMA, del que se han obtenido algunas de las imágenes presentadas en este TFG.

3 HITOS HISTÓRICOS EN LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL (SMA)

Entre 1890 y 1900 se describieron los primeros casos por los médicos austríaco y alemán Guido Werning y Johan Hoffmann, respectivamente; aunque den nombre al fenotipo más severo, lo cierto es que describieron formas intermedias. A mediados del siglo XX, Wohlfart, Fez y Eliasson y en más detalle, Kugelberg y Welander, describieron la SMA tipo III. Para todos ellos, la degeneración de las MN del asta anterior de la médula espinal y la debilidad muscular simétrica, proximal y de predominio en extremidades inferiores era la característica fundamental de la SMA (Kolb & Kissel, 2011). En 1995, en el Laboratorio Melki se descubrió que más del 95% de los casos de SMA se deben a la deleción homocigota del gen *SMN1*, caracterizando la enfermedad como monogénica. Hasta esa fecha, había pocos ensayos clínicos para la SMA. En los siguientes 5 años, el descubrimiento de la diana genética y molecular permitió desarrollar numerosos modelos experimentales, estudiar la patogenia de la enfermedad y describir novedosas aproximaciones terapéuticas, fundamentalmente destinadas a incrementar la expresión de la proteína SMN (Kolb & Kissel, 2011). Más adelante, la variabilidad en el número de copias de *SMN2* se correlacionó con la severidad del fenotipo, estableciéndolo como principal modificador de la enfermedad (Kolb & Kissel, 2011). Actualmente, conocemos otros modificadores fenotípicos, como plastina3, NAIP, H4N4, IGF1, ZPR1 y UBA1, si bien ninguno ha demostrado ser capaz de compensar completamente la pérdida de SMN (Singh et al., 2017). La clasificación actual, acuñada en el *Consorcio Internacional de SMA* en 1991 (Kolb & Kissel, 2011), es de gran interés clínico y pronóstico, a pesar de que hasta un 25% de los pacientes, conocidos como *outliers*, no encajan en ella completamente (Darras et al., 2017).

Durante más de 100 años, el tratamiento fue paliativo y de soporte. En 2007, Wang et al. desarrollaron una guía clínica, actualmente en revisión, enfocada en las necesidades respiratorias, nutricionales, ortopédicas, emocionales, rehabilitadoras y sociales (Kolb & Kissel, 2011). Las primeras terapias que demostraron, en 2001, incrementar los niveles de SMN en cultivos celulares, fueron las moléculas pequeñas, como inhibidores de la histona deacetilasa, y las terapias basadas en RNA, como los oligonucleótidos antisentido (*antisense oligonucleotides*, ASOs) (Kolb & Kissel, 2011). Las segundas han sido las más prometedoras hasta la fecha. Entre ellas, también encontramos RNAs bifuncionales, ASOs que se unen covalentemente a factores modulares del splicing, incrementando su estabilidad o actividad; o *RNA transplicing*, RNA sintético que interacciona con el mensajero SMN2 endógeno formando un híbrido no mutado (Kolb & Kissel, 2011). En 2008 alcanzó el auge la terapia génica, la propuesta más directa: restaurar el gen *SMN1* a través de vectores virales adeno-asociados serotipo 9, que Foust et al. (2010) demostraron que rescataban el fenotipo en modelos murinos severos. Al ser esta terapia más efectiva cuanto antes se instaure, ha abierto la puerta a considerar la posibilidad de un cribado prenatal y programas de detección precoz (Kolb & Kissel, 2011).

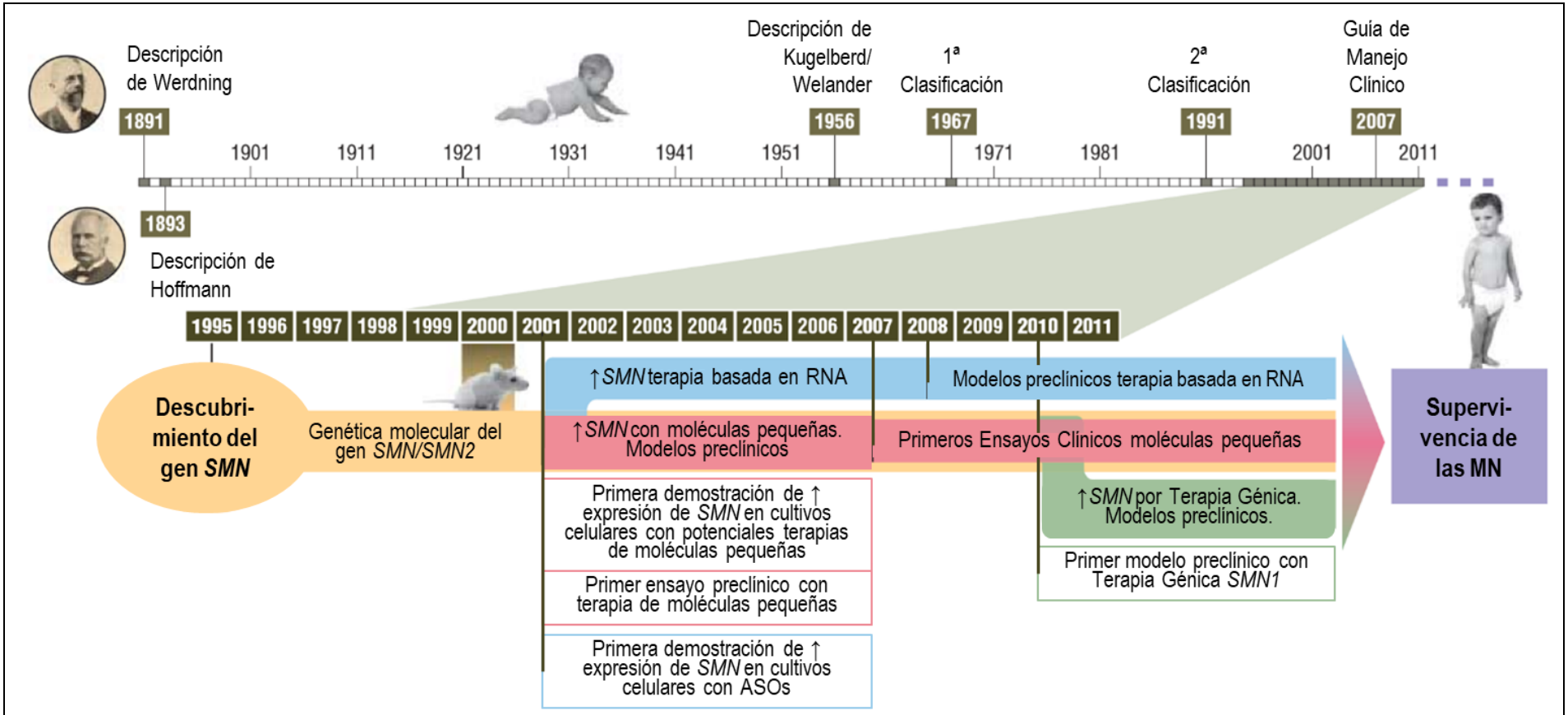


Figura 1. *Cronograma en la Atrofia Muscular Espinal. En el diagrama temporal se muestran los principales hitos en la investigación de la SMA. Su primera descripción fue por Werdning en 1981, y sucesivos investigadores reconocieron en los años siguientes diferentes grados de severidad en la debilidad muscular que caracteriza la enfermedad; 100 años más tarde se propuso la clasificación en grupos fenotípicos en función de la edad de inicio, evolución, genética y pronóstico. Tras el descubrimiento en 1995 del gen SMN, se han desarrollado diversos modelos animales y dianas terapéuticas para incrementar los niveles de SMN, con grandes avances en los últimos 10 años.* Tomado y modificado de Kolb & Kissel, 2011.

4 EPIDEMIOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y FENOTÍPICAS DE LA SMA

La SMA es una enfermedad autosómica recesiva, primera causa de mortalidad infantil de origen genético en el mundo, con una incidencia anual de 1 caso por cada 6.000 a 10.000 nacidos vivos y una frecuencia de portadores de 1:35 a 1:50 según la etnia (Bäumer et al., 2009; Govoni et al., 2017). Se ha incluido tradicionalmente en el conjunto sindrómico de las *Enfermedades de la Motoneurona*, que incluye patologías muy heterogéneas, tanto familiares como esporádicas, inflamatorias e inmunes, y otras de causa indeterminada (Murray & Mitsumoto, 2012). Sin embargo, tal y como se desarrollará a lo largo de este trabajo, es probable que este grupo de patologías pierda a la que ha sido durante años su representante más clásica.

Las dos características fisiopatológicas fundamentales en la SMA son **i)** la alteración de la conectividad en la unión neuromuscular (UNM) y **ii)** la muerte de las MN alfa (MNα) del asta anterior, asociadas a un espectro clínico continuo; desde pacientes con afectación neonatal y corta supervivencia en la SMA tipo 1, hasta pacientes que alcanzan la vida adulta con escasa repercusión funcional en la tipo IV (Talbot & Tizzano, 2017). Aunque hablemos de un espectro continuo, los hallazgos clínicos y electrofisiológicos en todos los tipos de SMA son consistentes con un trastorno neurogénico compatible con la pérdida de MNα.

Tradicionalmente se ha clasificado la SMA en diferentes subtipos en función de la edad de comienzo de los síntomas, hitos del desarrollo alcanzados, evolución y número de copias del gen *SMN2*. De más precoz y grave a más tardía y menos severa, obedecerían al siguiente orden: la SMA tipo 0 (prenatal), SMA tipo 1 (SMA infantil o *Síndrome de Werdning-Hoffmann*), SMA tipo 2 (SMA intermedia), SMA tipo 3 (SMA juvenil o *enfermedad de Kugelberg-Welander*), y SMA tipo 4 (SMA de inicio adulto o pseudomiopática). Sin embargo, existen factores modificadores negativos y positivos que influencian el fenotipo final, que deben considerarse antes de realizar una predicción pronóstica (Murray & Mitsumoto, 2012; Talbot & Tizzano, 2017).

La SMA se presenta típicamente en la infancia, siendo los tipos 0 y 1 responsables de aproximadamente el 60% de los casos. Poco después del debut clínico, tiene lugar un rápido deterioro funcional, que se ha relacionado histológicamente con una disminución rápida y marcada de la población de MN, generalmente seguido de una fase meseta o crónica en la que destaca la disfunción motora, si bien la fuerza muscular se mantiene relativamente constante, relacionada con la patología en la población de MN superviviente (Rodríguez-Muela et al., 2017). Estudios neurofisiológicos han demostrado que en las formas moderadas la preservación de la fuerza muscular se asocia a "*axonal sprouting*", es decir, a la reinervación del músculo esquelético a través de brotes de axones colaterales desde las MN supervivientes (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

TIPOS DE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL Y SUS CARACTERÍSTICAS Adaptado de Tisdale & Pellizzoni, 2015; Bowerman et al., 2017; Murray & Mitsumoto, 2012; Darras et al., 2017.						
Tipo de SMA	**Edad de Inicio**	**% de casos**	**Herencia**	**Nº de Copias de SMN2**	**Evolución y pronóstico**	**Características Clínicas**
Tipo 0	Prenatal, *in utero*	60	AR	Una única copia	Uniformemente fatal en el útero o bien a los pocos meses del nacimiento si no se instaura soporte respiratorio al nacer: muerte perinatal.	Artrogriposis, déficits motores y sensitivos complejos, alta incidencia de defectos cardíacos.
Tipo I	Entre el nacimiento y los 6 meses de vida.		AR	Dos copias	No sobreviven más allá de 2 o 3 años sin ventilación mecánica invasiva (50% a los 12 meses, 90% a los 24 meses); avances terapéuticos en el cuidado respiratorio, muscular y nutricional han alargado su esperanza de vida. Se puede dividir en 1B o 1C según comience antes o después de los 3 meses, respectivamente. El tipo 1C logra control cefálico.	Forma más severa y común, con hipotonía neonatal, insuficiencia respiratoria, mala alimentación y pobre control cefálico. No alcanzan la capacidad de sedestación autónoma (sin soporte) ni pueden gatear.
Tipo II	Entre los 6 y los 18 meses de vida.	27	AR	Tres copias	Pueden alcanzar la edad adulta con importante discapacidad física, sin lograr una esperanza de vida normal completamente (fallecen entre los 30 a 50 años en función de la capacidad respiratoria).	Forma intermedia, logran sedestación autónoma pero no deambulación; persiste la debilidad respiratoria, que condiciona su supervivencia. Alternan periodos de relativa estabilidad con otros de deterioro acelerado (pubertad), manteniendo una progresión lenta de la disfunción motora.
Tipo III	Por encima de los 18 meses de vida.	12	AR	Entre tres y cinco copias	Se subdivide en IIIa (< 3 años) y IIIb (>3 años). Su esperanza de vida puede ser igual a la población general.	Pueden deambular solos brevemente; pierden esta capacidad a medida que envejecen. El compromiso respiratorio es raro.
Tipo IV	Por encima de los 5 años, en la edad adulta (de media a los 20-30 años).	1	AR, AD o esporádica	Entre tres y cinco copias	Esperanza de vida igual a la población general, con una progresión lenta.	Desarrollan y mantienen la deambulación. Presentan debilidad proximal lentamente progresiva, de predominio en extremidades inferiores.

La degeneración de las MN conduce al desarrollo de una debilidad muscular progresiva secundaria a la atrofia muscular neurogénica, junto a hiporreflexia y otros síntomas típicos de las enfermedades de la motoneurona inferior. La debilidad es característicamente simétrica y proximal, de predominio axial y en extremidades inferiores, conduciendo ineludiblemente a la muerte por fracaso respiratorio en los casos más graves (Bäumer et al., 2009; Tisdale & Pellizzoni, 2015). Este patrón de debilidad sugiere una vulnerabilidad diferente ante el déficit de SMN en los núcleos motores espinales. Así, se ha observado que la afectación es mayor para los músculos intercostales y axiales, respetando relativamente el diafragma, lo que explica la morfología torácica campaniforme y abdomen globular, junto a la respiración paradójica diafragmática en las formas infantiles más severas (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

Los pacientes adoptan una postura característica con los brazos extendidos junto al cuerpo, ligera pronación del antebrazo y flexión de los últimos dedos de la mano; las piernas quedan abiertas y pegadas al plano de apoyo, con las rodillas flexionadas (Picó Fuster, 2008).

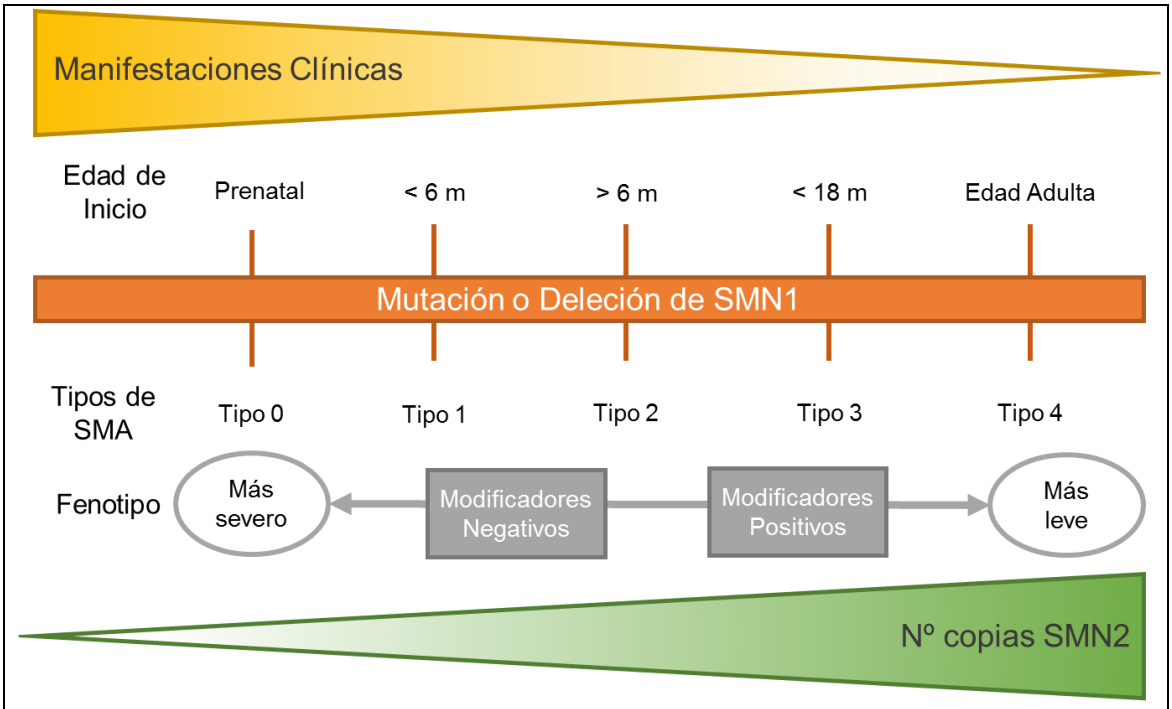


Figura 2. ***Espectro Clínico Continuo del Fenotipo de la SMA****; debut de las principales formas clínicas y relación con factores modificadores del fenotipo.* Adaptado de Talbot & Tizzano, 2017.

El diagnóstico de confirmación se realiza mediante pruebas genéticas en pacientes con signos y síntomas compatibles, existiendo la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal. Otras pruebas de apoyo son la electrofisiología y la biopsia muscular, que confirman la denervación (Murray & Mitsumoto, 2012).

5 BASES GENÉTICAS DE LA SMA

El genoma humano tiene entre 20.000 y 25.000 genes. La complejidad del genoma eucariota radica en la existencia de genes funcionales, es decir, codificantes de proteínas, además de grandes secuencias de DNA no codificante, esenciales para la regulación de los primeros. El genoma eucariótico se transcribe en ***mRNAs*** (*messenger RNA*) y ***ncRNAs*** (*non-coding RNA*), respectivamente (Cooper & Hausman, 2011). El transcriptoma (RNA citoplasmático) no codificante se ha expandido a medida que los organismos evolucionaban e incrementaban su complejidad, y cada vez más enfermedades humanas están causadas por mutaciones relacionadas con genes implicados en el procesamiento del RNA y la regulación postranscripcional (Li et al., 2014). Este DNA no codificante puede presentarse como **secuencias espaciadoras**, situadas entre diferentes genes, o dentro de los propios genes, como ***intrones*** (secuencias intermedias no codificantes), que se intercalan entre los ***exones*** (secuencias codificantes). Así, los genes se transcriben al completo para dar lugar a una molécula de RNA más larga que el producto final, pues contiene los exones y los intrones. Estos últimos deben eliminarse mediante ***splicing***, para dar lugar al mRNA maduro (Cooper & Hausman, 2011). A nivel postranscripcional, la expresión génica está regulada por diferentes eventos (procesamiento del transcrito primario, transporte de los mensajeros maduros, traducción y *turnover* proteico), determinados por la asociación dinámica entre los mRNA con proteínas de unión al RNA (*RNA binding proteins,* ***RBPs***) y ribonucleoproteínas (*ribonucleoproteins,* ***RNPs***). De hecho, un rasgo distintivo de los mRNAs y ncRNAs es su asociación específica a las RBPs en complejos de RNPs, para desempeñar su función reguladora. La formación de RNPs es esencial para el desarrollo y función de la célula. La ***proteína SMN*** es esencial en este aspecto, pues es necesaria para la biogénesis de varios tipos de RNPs (Li et al., 2014) entre otras funciones, de manera que una mutación genética que altere su cantidad o actividad funcional repercutirá negativamente en la viabilidad celular.

La SMA es una enfermedad autosómica recesiva. El 95% de los casos están causados por una mutación o deleción homocigota inactivadora del gen *SMN1*. En torno al 5% restante presenta pequeñas mutaciones en dicho gen, bien deleciones, mutaciones antisentido o mutaciones de empalme ("*splice mutations*"). Existe una clasificación de las mutaciones en *SMN1*, existiendo "*mutaciones leves*", que ocurren en los tipos II y III de SMA, dando lugar a proteínas SMN que conservan la capacidad de oligomerizar con SMN nativa y proteínas Sm, y "*mutaciones severas*", que pierden esta capacidad, dando lugar al fenotipo grave (Burghes & Beattie, 2009).

El gen *SMN1*, codificante de la proteína SMN, está localizado en el cromosoma 5q13. Debido a una duplicación e inversión centromérica al locus *SMN1* (Jangi et al., 2017; Singh et al., 2017), exclusiva de los homínidos, el genoma humano contiene dos genes codificantes para la proteína SMN: *SMN1* y *SMN2*, idénticos en más del 99% de su secuencia (Tiziano et al., 2013; Govoni et al., 2017). De los pocos nucleótidos en los que difieren, la diferencia crítica se encuentra en un cambio puntual de citosina por timina (C → T) en la posición +6 del exón 7, de los 9 que integran el gen *SMN2*. Este cambio altera la interacción del pre-mRNA

con el factor *ISS1 (intrón splicing silencer*) regulador del *splicing*, llevando a la exclusión en la mayoría de los transcritos finales del exón 7 (dando lugar a un transcrito denominado ***SMNΔ7***), necesario para la estabilidad y función de la proteína final (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Govoni et al., 2017). Cuando se salta el exón 7, se añade un motivo de 4 aminoácidos, denominado EMLA, codificado por el exón 8, que sirve de señal de degradación para SMNΔ7 (Singh et al., 2017). Además, la pérdida de este exón supone también la exclusión del motivo QNQKE, que codifica una secuencia de exportación nuclear, sin la cual SMN no puede salir al citoplasma (Burghes & Beattie, 2009), además de la región de interacción con TGS1, que cataliza la formación de la cola de trimetilguanosina (TMG cap) en el extremo 5' de los snRNAs, snoRNAs y algunos mRNAs (Singh et al., 2017). En consecuencia, la proteína obtenida a partir de *SMN2* está truncada, no es funcional y es inestable, por lo que es degradada rápidamente. Sin embargo, en torno al 10% de los transcritos incluyen el exón 7 y codifican la proteína SMN de longitud completa, estable y funcional (Tisdale & Pellizzoni, 2015). En la SMA, esta pequeña cantidad de SMN funcional elude la letalidad de la inactivación de *SMN1*, pero no es suficiente para compensarla completamente, y falla al impedir el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, la SMA es el resultado de un déficit, pero no carencia, de proteína SMN funcional, con niveles de proteína SMN insuficientes para llevar a cabo sus funciones esenciales.

Debido a la inestabilidad intrínseca de la duplicación del cromosoma 5q13, puede haber varias copias de *SMN2*, cuyo número se relaciona inversamente con la severidad del fenotipo (Li et al., 2014), por lo que *SMN2* se considera el modificador genético más potente de la enfermedad (Tisdale & Pellizzoni, 2015), hasta tal punto que se han descrito pacientes asintomáticos a pesar de presentar una deleción completa de *SMN1*, gracias a poseer 5 copias de *SMN2* (Talbot & Tizzano, 2017). Sin embargo, también se han descrito excepciones a esta regla, de modo que la predicción pronóstica no debería basarse únicamente en el nº de copias de *SMN2* (Talbot & Tizzano, 2017). Dentro de la población humana, podemos encontrar deleciones de *SMN2* que no afectan a *SMN1* ni se asocian a enfermedad. En el otro extremo, pueden existir cromosomas 5q13 que no alberguen ninguno de los dos genes en los portadores de la enfermedad, es decir, uno de los cromosomas presenta *SMN1* y *2*, pero no así su homólogo. Sin embargo, no se ha descrito aún la pérdida de ambos genes de manera homocigota (Burghes & Beattie, 2009); dado que la proteína SMN es necesaria para la viabilidad del organismo, todos los pacientes de SMA presentan al menos una copia de *SMN2* (Govoni et al., 2017).

5.1 Estructura del gen *SMN*

En el exón 2 encontramos la región de interacción con p53, así como el dominio de unión a ácidos nucleicos, altamente conservado. Este último se superpone al dominio de unión a Gemin2 (también conocida como SIP1 o *SMN-interacting protein 1*) (Singh et al., 2017). A continuación, el exón 3 codifica el dominio Tudor, involucrado en interacciones con motivos proteicos RGG/RG, que encontramos en proteínas como fibrilarina, hnRNP Q, hnRNP R, hnRNP U, proteína del Sarcoma de Ewing (EWS), proteína asociada al síndrome del X Frágil (FMRP), FUS, proteínas Sm o la RNA polimerasa II (Singh et al., 2017). Corriente abajo

del dominio Tudor, una secuencia enriquecida en prolina interacciona con las profilinas, proteínas que controlan la dinámica de la actina (Singh et al., 2017).

Los últimos 16 aminoácidos del exón 7 y la caja YG corriente arriba codificada por el exón 6 facilitan la autooligomerización, necesaria para la estabilidad y localización celular de la proteína SMN. El extremo C-terminal (que incluye la caja YG) está implicado en la interacción con Gemin3, ZPR1 (potencial modificador de fenotipo SMA) y SIN3A (represor transcripcional). La caja YG es la región mejor conservada evolutivamente. Aunque es necesaria para la viabilidad celular, es dispensable para la interacción con proteína Sm y autooligomerización. El extremo N-terminal, que contiene varias regiones de unión a proteínas, es aparentemente específico de mamíferos; su ausencia en vertebrados inferiores y plantas sugiere que, en ellos, otras proteínas podrían desarrollar funciones *SMN-like* (Singh et al., 2017).

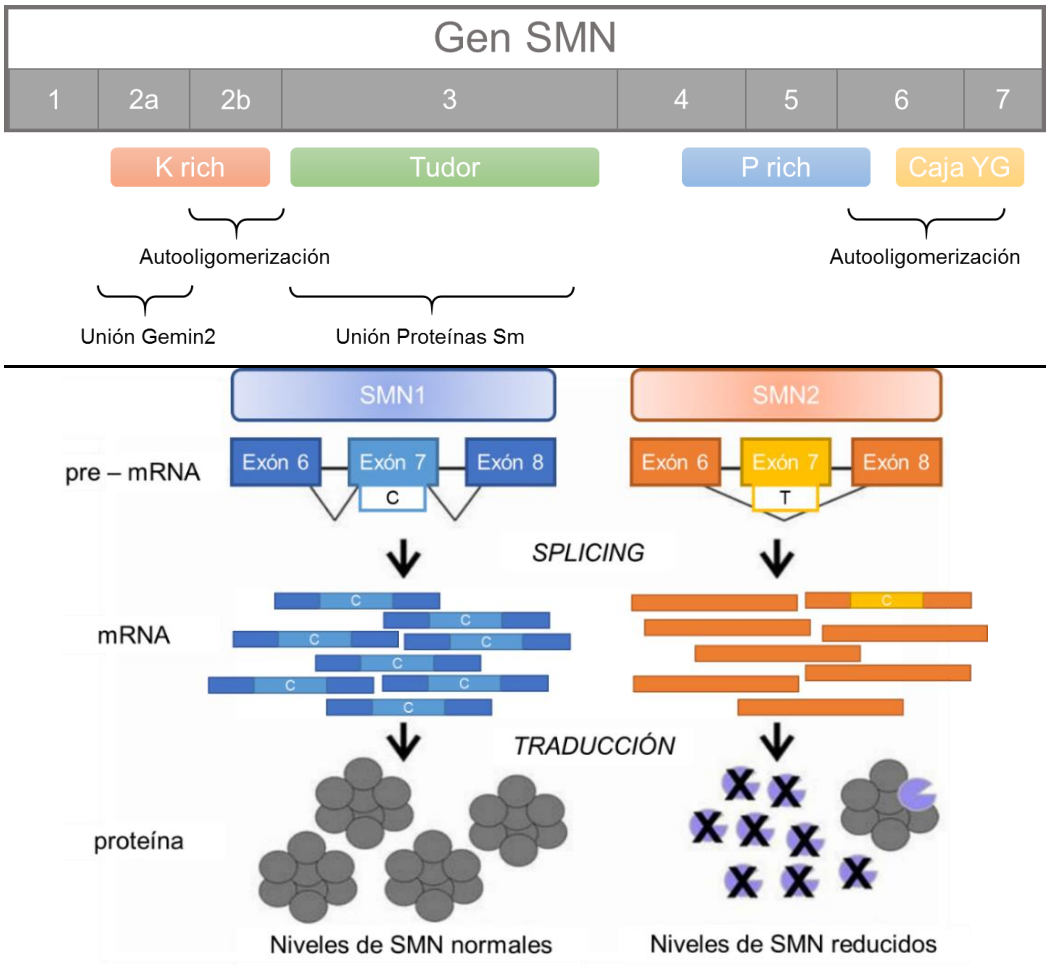


Figura 3. *Genes SMN y estructura de la proteína SMN.* *Exones y dominios de la proteína. El exón 2 es importante para su unión a Gemin2 y su autoligomerización y contiene un dominio K rico en lisina; el exón 3 guarda el Dominio Tudor; el extremo C-terminal contiene la Caja YG, una región altamente conservada y esencial para la oligomerización, alterada en la SMA por mutaciones sinsentido destacando la importancia de la oligomerización en la función de esta proteína.* Adaptado de Burghes & Beattie, 2009; K. Li et al., 2014.

Se han identificado tres lugares de inicio de la transcripción *upstream* del exón 1, utilizados por ambas copias del gen SMN de forma tiempo y tejido específica. Se han descrito una serie de factores reguladores de la transcripción, incluyendo INFγ, INFβ o el *CRE binding protein* (*CREB-1*). También existe regulación transcripcional por modificaciones epigenéticas del DNA, histonas y proteínas, contribuyendo al control de la expresión génica. Terapias como inhibidores de las histonas deacetilasas (HDAC) son capaces de regular positivamente la expresión de *SMN2*, incrementando los niveles de proteína SMN, además de regular la expresión génica de forma más global (Tiziano et al., 2013).

Queda por averiguar el significado de los diferentes lugares de inicio de la transcripción de *SMN1* y *SMN2*, si son regulados de igual forma en todos los tejidos o si su localización cromosómica única aporta un microambiente de cromatina con regulación diferencial. Por otro lado, aunque se sabe que los genes *SMN2* son diferentes entre sí, no sabemos bien qué les diferencia ni cómo este hecho se relaciona con la severidad de la enfermedad y/o la potencial respuesta a nuevas terapias. Además, es importante acabar de definir las vías patogénicas implicadas en la SMA, los factores de transcripción y las modificaciones epigenéticas que gobiernan la expresión temporal y espacial de SMN, que podrían servir como dianas terapéuticas (Tiziano et al., 2013).

6 LA PROTEÍNA DIANA DE LA ENFERMEDAD. EL FACTOR DE SUPERVIVENCIA DE LAS NEURONAS MOTORAS (SMN)

La ***proteína SMN***, de 38 kD (Burghes & Beattie, 2009) y 294 aminoácidos (Singh et al., 2017), es una molécula altamente conservada evolutivamente, de expresión ubicua. La encontramos formando parte de un gran complejo macromolecular, el ***complejo SMN***, altamente estable. Existen varios tipos, algunos de ellos ejemplificados en la ***Figura 4;*** otros se irán describiendo a lo largo de este trabajo. Desde el descubrimiento del gen *SMN* en 1995, se han descrito múltiples funciones de la proteína, siendo la mejor caracterizada a nivel molecular su participación en el ensamblaje de diferentes RNPs de la maquinaria del splicing. Por ello, se ha considerado la SMA como una ***patología del RNA*** (*RNAopathy*) (Tiziano et al., 2013).

La proteína SMN ha sido descrita en tejido cerebral, espinal, renal y cardíaco, si bien en cantidades mucho mayores en los dos primeros, en especial durante el desarrollo temprano (Tiziano et al., 2013). En el tejido nervioso, la proteína SMN se distribuye ampliamente por el citoplasma del soma neuronal, dendritas, axones y conos de crecimiento axonal. En las motoneuronas, se localiza también en la región pre- y post- sináptica de las UNM, donde forma un complejo macromolecular diferente del complejo SMN canónico (Bowerman et al., 2017).

SMN se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. En este último compartimento, se acumula en unas estructuras nucleares denominadas ***Gems,*** en su estado estacionario, y en los ***cuerpos nucleares de Cajal*** ("***Cajal Bodies", CBs***) como parte de las snRNPs (Carvalho et al., 1999; Tapia, et al., 2017). La función de SMN en la formación de snRNPs tiene lugar en el citoplasma (Jangi et al., 2017), donde podemos encontrarla distribuida de forma difusa o formando parte de diversas estructuras. Se ha descrito proteína SMN

en los discos Z sarcoméricos, en los microtúbulos, en los gránulos de estrés e incluso en el Complejo de Golgi (Singh et al., 2017), así como unida a los microsomas y al dominio citoplasmático del complejo del poro nuclear (Bowerman et al., 2017). De manera más específica, podemos hallarla concentrada en los ***cuerpos U*** (Cauchi, 2010). Aunque los Gems y los cuerpos U se consideran análogos en tanto a que sirven como lugares de almacenamiento de la proteína SMN y sus factores asociados, no son equivalentes. Los cuerpos U participan en el ensamblaje de las snRNPs y/o su almacenamiento una vez formadas, hasta su transporte al núcleo para continuar su maduración (Cauchi, 2010). Los Gems se describirán a continuación.

6.1 Componentes y ensamblaje del complejo SMN

La proteína SMN se asocia a otras 8 proteínas (Gemin2 a Gemin8 y Unrip); mediante múltiples interacciones recíprocas, forman el complejo macromolecular SMN, que, a su vez, puede formar partículas de orden superior (de entre 20 y 80S) y autooligomerizar (Li et al., 2014). Se ha propuesto un modelo de ensamblaje escalonado, que habría ido ganando complejidad evolutivamente. Inicialmente, una versión primitiva del complejo, formada únicamente por SMN y Gemin2, habría adquirido de forma secuencial las demás proteínas (Gemin3/4, Gemin6/7/Unrip, Gemin5), logrando progresivamente mayor complejidad, y así, una regulación más fina de sus funciones y el desarrollo de otras nuevas (Tisdale et al., 2014).

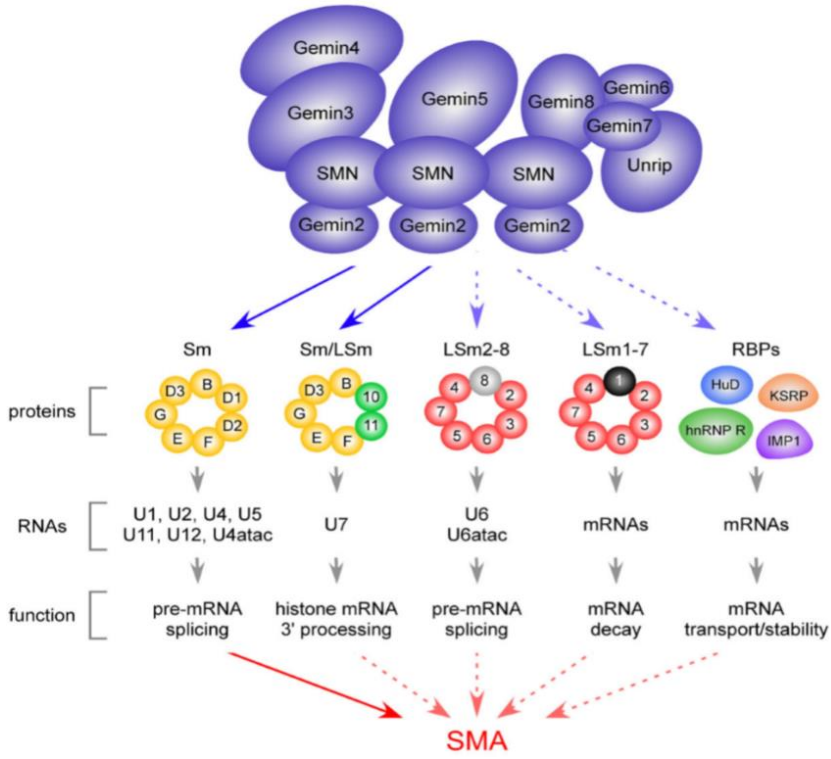


Figura 4. *Ensamblaje de RNP mediado por SMN y relación con la patogenia de la SMA. Se muestran 5 tipos de complejos funcionales propuestos para SMN; las flechas sólidas indican interacciones establecidas tanto a nivel molecular como funcional.* Tomado de K. Li et al., 2014.

Para la oligomerización de SMN es necesario el extremo C-terminal (*YG Box*). Otras regiones, involucradas en interacciones proteína-proteína (*dominio Tudor*), podrían intervenir en la formación de la estructura central (Tisdale et al., 2014). En concreto, el dominio Tudor se une a dominios ricos en Gly y Arg de las proteínas Sm (SmB, SmD1 y SmD3), proteínas LSm y muchas otras RBPs (Burghes & Beattie, 2009).

SMN, Gemin7 y Gemin8 forman la estructura central sobre la que se ensamblan el resto de componentes; unida a ellos, SMN interacciona con Gemins2, 3 y 8. En una siguiente etapa, Gemin2 se une a Gemin5, 3 y 4; Gemin8 interacciona con las proteínas Gemin4 y 7, siendo esta última encargada de reclutar a Gemin6 y Unrip. Por su parte, Gemin2, Gemin8 y SMN pueden autooligomerizar, siendo la unión Gemin2-Gemin2 necesaria para estabilizar al homodímero SMN-SMN (Cauchi, 2010). Gemin5 y Unrip son componentes periféricos del complejo SMN final, poco abundantes o ausentes en los Gems y CBs nucleares. Sin embargo, todos los componentes del complejo SMN son abundantes en el citoplasma, incluyendo Gemin5 y Unrip. Aunque parezca que la ausencia de Gemin5 y Unrip en el núcleo implica que son prescindibles, lo cierto es que los modelos *knockout* para SMN, Gemin2, 3 y 5 son letales, confirmando que todos los componentes del complejo SMN son esenciales para la viabilidad celular (Cauchi, 2010).

6.2 SMN, Gems y Cajal Bodies (CBs)

Los Gems son compartimentos nucleares redondeados, de densidad electrónica intermedia y textura granular, positivos para SMN, Gemin2,3,4,6, y 7, que también encontramos en los CBs, pero negativos para coilina y fibrilarina, sus marcadores. Podemos encontrarlos asociados a los CBs o libres en el nucleoplasma (Cauchi, 2010; Lafarga et al., 2017). Los Gems no son necesarios para la viabilidad celular; de hecho, Gems y CBs están ausentes en muchos tejidos mamíferos. Aunque la función de los Gems es desconocida, se han propuesto como sitios de almacenamiento para un exceso nuclear de complejos SMN quiescentes, que podrían ser reclutados en los CBs para ensamblaje tardío de snRNPs y/o reciclaje de los mismos. Se supone que su formación permite concentrar las macromoléculas en un lugar concreto, acelerando la velocidad y especificidad de las reacciones que allí se llevan a cabo (Cauchi, 2010).

Las estructuras actualmente denominadas ***Cajal Bodies*** (CBs) fueron descritos por primera vez por Santiago Ramón y Cajal (1903), quien los denominó "***cuerpos accesorios",*** posteriormente rebautizados por Moneron y Benhard (1969) como "***coiled bodies***", en base a su morfología ultraestructural de hebras densas arrolladas, y, finalmente, en homenaje a Cajal, como "***Cajal bodies***" (Carvalho et al., 1999). Desde la incorporación en los noventa de nuevos marcadores moleculares específicos (anticuerpos y sondas de hibridación) para compartimentos nucleares, múltiples investigaciones han permitido descifrar sus componentes y funciones celulares. Hoy sabemos que los CBs son estructuras nucleares bien definidas, de entre 0,5 y 1,5 µm de diámetro, frecuentemente asociados al nucléolo. Aunque su tamaño no muestra relación lineal con el tamaño neuronal, sí lo hace su número, siendo dependientes de la actividad transcripcional y de síntesis proteica. Se ha demostrado que los CBs son reclutados a zonas de transcripción activa, sugiriendo su papel como

organizadores genómicos que favorecen la agrupación de los genes de sn/snoRNAs e histonas, de alta actividad transcripcional (Lafarga et al., 2017).

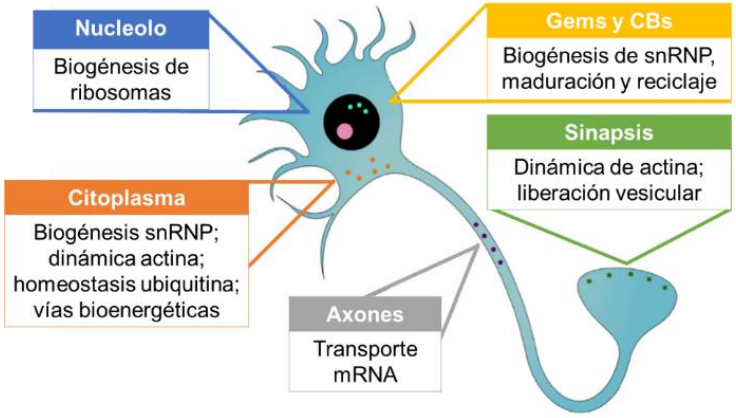
Estructuralmente, el CB consta de zonas de matriz amorfa, en las que no se han logrado caracterizar componentes moleculares, y zonas electrodensas en forma de hebras densas enrolladas en las que encontramos ***p80-coilina*** (marcador molecular), fibrillarina, Nopp140, RNA, sn/snoRNP, SMN y proteínas Gemin. En varias líneas celulares, especialmente en neuronas, SMN y Gemin2 colocalizan con coilina y snRNPs en los CBs (Cauchi, 2010; Lafarga et al., 2017). Su elemento estructural más relevante es la ***coilina***, encargada de su formación y/o mantenimiento, aunque recientemente se ha sugerido un papel de SUMO1 (implicado en reacciones de sumoilación y/o desumoilación) y de otras modificaciones postraduccionales de sus componentes moleculares (en las que posiblemente intervenga SMN) en el ensamblaje de los CBs (Tapia et al., 2014; Lafarga et al., 2017b). Esta posibilidad, sumada a la reciente demostración de SMN como sustrato de SUMO1, y que la sumoilación y/o desumoilación podrían estar implicadas en la reformación de CB tras un estrés celular, sugieren que SMN podría estar implicada, al igual que la proteína coilina, en la formación de los CB (Tapia et al., 2014).

Podemos diferenciar dos tipos de CBs; aquellos que concentran coilina, SMN y snRNP, considerados como CB canónicos que participan en la biogénesis de snRNPs, y aquellos que carecen de SMN y snRNP, pero mantienen la coilina, estimados como CBs inmaduros no funcionales (Lafarga, et al., 2017b); el que estos últimos sean incapaces de concentrar snRNPs recién importadas al núcleo sugiere un papel esencial de la proteína SMN para la incorporación de las snRNP a los CBs, pero no así de la coilina (Lafarga et al., 2017a). Sin embargo, sin coilina los CB se desestructuran y la biogénesis de snRNPs se reduce, apoyando la teoría de que esta proteína podría compartir con SMN su función más estudiada (Lafarga et al., 2017). La repercusión del déficit de SMN en la organización y estructura de los CBs se describirá más adelante.

En los CB tienen lugar varios procesos funcionales. El mejor conocido es la maduración y ensamblaje de U snRNPs espliceosomales que, una vez maduros, son liberados del CB para su ulterior ensamblaje en el ***espliceosoma***. Además, el CB interviene en el ensamblaje de U7 snRNP, encargada del procesamiento específico del pre-mRNA de las histonas. Al igual que SMN, los CBs son necesarios para la síntesis de la maquinaria de splicing de los pre-mRNA, además de la biogénesis de snoRNAs y snoRNPs para el procesamiento nucleolar del pre-rRNA ribosomal. Por todo ello, y teniendo en cuenta además que coilina puede unirse tanto a snRNP como snoRNPs, los CBs se consideran el epicentro del metabolismo del RNA pequeño no codificante (Tapia et al., 2017). Cabe destacar la frecuente asociación espacial entre el CB y el nucléolo, que se produce con el ***componente fibrilar denso*** (***CFD***), lugar de síntesis y procesamiento inicial del pre-rRNA, con el que comparte componentes estructurales tales como fibrillarina, Nopp140, NAP57 y snoRNPs. Esta asociación facilitaría la incorporación de snoRNPs necesarias para el procesamiento del pre-rRNA desde el CB, donde maduran, hacia el nucléolo, donde ejercen su función (Lafarga et al., 2017). Recientemente se ha descubierto una vía de señalización sinapsis-CB-nucleolo, mediada por la proteína postsináptica AIDA-1d, que interacciona con coilina. En respuesta a estímulos

sinápticos, AIDA-1d es transportada al núcleo gracias a una secuencia de localización nuclear; allí interaccionaría con el CB y el nucléolo para favorecer la biogénesis de ribosomas y la dinámica del RNA (Jordan et al., 2007; Lafarga et al., 2017).

La relación Gems-CBs viene dada por la colocalización de SMN y Gemin2 con coilina y snRNPs y la aparente superposición de algunas de sus funciones mejor caracterizadas (Lafarga et al., 2017; Tapia et al., 2017). Los Gems solo se han encontrado en neuronas de mamíferos fetales, no en maduras, sugiriendo que bajo condiciones fisiológicas las células diferenciadas acomodan las concentraciones nucleares de SMN y proteínas asociadas a los requerimientos funcionales de ensamblaje de CBs y su mantenimiento (Lafarga et al., 2017a). Por otra parte, se ha observado que a medida que las neuronas maduran, incrementan el reclutamiento de la proteína SMN en los CBs, en tanto que el número de Gems va reduciéndose progresivamente (Tapia et al., 2017). De hecho, se ha propuesto la formación de una roseta perinucleolar de CBs como marcador de la polarización neuronal completa (Lafarga et al., 2017a). Esto podría justificar una posible función de los Gems a nivel embrionario, cuya disfunción durante la diferenciación neuronal ante el déficit de SMN contribuiría a la patogenia de la SMA; es decir, los Gems podrían ser CBs inmaduros, donde SMN desempeñaría funciones embrionarias específicas importantes para las neuronas, atendiendo al requisito temporal en la patogenia de la SMA.



FUNCIONES DE LA PROTEÍNA SMN
• El complejo SMN actúa como chaperona molecular en varios aspectos del metabolismo del RNA codificante y no codificante, como el ensamblaje de snRNPs espliceosomales, U7 snRNP y snoRNPs. La alteración de estas funciones es la responsable de la inclusión de la SMA en el grupo de las *RNAopathies*
• Regulación de vías de procesamiento del RNA mediante la interacción con numerosas RBPs
• Regulación postranscripcional de la expresión génica
• Transporte axonal y traducción local de algunos mRNA (destacando β-actina) en los conos de crecimiento axonal
• Formación y mantenimiento de las uniones neuromusculares

Figura 5 (Adaptada de Bowerman et al., 2017) ***y Tabla 1*** (Adaptada de Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015; Tapia et al., 2017; Singh et al., 2017).

6.3 Las funciones conocidas de la proteína SMN

Por su localización ubicua y múltiples dominios de interacción molecular, se han atribuido a SMN múltiples funciones reguladoras en relación con el metabolismo del RNA, transporte de mRNA, regulación de la traducción, dinámica del citoesqueleto de actina, homeostasis de ubiquitina, bioenergética celular y liberación de vesículas sinápticas (Tiziano et al., 2013; Bowerman et al., 2017). Sus funciones mejor caracterizadas están resumidas en la ***Figura 5 y Tabla 1***. Otras funciones recientemente descubiertas, pero no por ello menos relevantes en la patogenia de la SMA, sitúan a SMN como moduladora de la apoptosis, bloqueando la activación de las caspasas, y de otros reguladores de la supervivencia celular, como el supresor tumoral PTEN (Tiziano et al., 2013). Sin embargo, no ha sido posible demostrar que la disfunción de alguno de estos procesos sea responsable, por si sola, de la fisiopatología de la SMA.

6.3.1 La proteína SMN, biogénesis de snRNPs y el proceso de splicing

Desde finales de los años 70 sabemos que la mayoría de los genes eucariotas son transcritos en pre-mRNAs, de longitud mayor a la de los mRNAs maduros, que se obtienen mediante escisión de intrones y empalme de exones a través del proceso de ***splicing***, catalizado por el ***espliceosoma***, una máquina macromolecular formada por cinco moléculas de snRNPs asociadas a cofactores proteicos múltiples. Las snRNPs espliceosomales están compuestas por ***RNAs nucleares de pequeño tamaño*** ("*small nuclear RNAs*, ***snRNAs***) enriquecidas en uracilo (U snRNA), y diferentes ***proteínas de unión al RNA*** (*RNA binding proteins,* ***RBPs***), además de proteínas específicas de cada tipo de snRNP (Cauchi, 2010). El espliceosoma incluye dos categorías de snRNAs no codificantes y no poliadenilados muy abundantes, que actúan en el nucleoplasma. En particular, son los snRNA Sm (U1, U2, U4, U4atac, U5, U11 y U12) y los snRNA Sm-like (U6 y U6atac), que se unen a proteínas Sm y Sm-like, respectivamente. Mientras los primeros han de ser exportados al citoplasma para su maduración y ensamblaje en snRNPs, los dos últimos permanecen en el núcleo, donde el complejo SMN precargado con proteínas LSm2-8 dirige el ensamblaje de snRNPs U6 y U6atac (Cauchi, 2010). La mayoría de los pre-mRNA son procesados mediante el espliceosoma mayor, dependiente de U2 snRNA, formado por las snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5, que reconoce intrones tipo U2 mediante una secuencia consenso, ausente en los intrones tipo U12. Estos últimos son procesados por el espliceosoma menor, dependiente del U12 snRNA, y formado por las snRNPs U11, U12, U4atac/U6atac y U5 (Cauchi, 2010).

La función mejor conocida de SMN es su participación como chaperona molecular en la síntesis de las snRNPs de la maquinaría de *splicing* de los mRNAs (Tisdale et al., 2014; Matera & Wang, 2014). Una chaperona es una proteína o conjunto de ellas que facilitan el plegamiento, ensamblaje y transporte celular de las proteínas a las que se unen para asegurar su funcionalidad, especialmente importantes en procesos biológicos que demanden gran cantidad de energía, como el ensamblaje de las U snRNPs (Cauchi, 2010). Actualmente, la proteína SMN se considera fundamental para la expresión génica, dado que asegura la correcta interacción del anillo proteico heteroheptamérico de

proteínas Sm con su snRNA diana, dando estabilidad y protegiendo al snRNA de nucleasas, y permitiendo así el desarrollo de los pasos subsiguientes en la biogénesis de las snRNPs espliceosomales (Tisdale et al., 2014; Matera & Wang, 2014). Además, en el núcleo, SMN tiene funciones *housekeeping* que implican su participación en el ensamblaje de complejos de RNPs adicionales, incluyendo la biogénesis de U1 snRNP, la más abundante del núcleo, asociada con la supresión de lugares crípticos de poliadenilación y regulación de promotores (Tisdale et al., 2014), así como U3 snoRNP, necesario para la biogénesis del RNA 18S, y otras snoRNPs, en las que el snoRNA actúa como una guía para la modificación de RNA no codificante, como son las moléculas de rRNA, tRNA y snRNA (Burghes & Beattie, 2009; Bernabó et al., 2017).

Por su parte, las proteínas LSm participan en la formación de U7 snRNP, encargada del procesamiento del extremo 3' de los transcritos dependientes de replicación de las histonas, particularmente durante el periodo "S" y en la reparación del DNA, pues ambos procesos requieren la reformación de los nucleosomas (Tisdale & Pellizzoni, 2015). La particularidad de estos pre-mRNA radica en la ausencia de intrones y cola de poli(A)RNA. En lugar de esta última, sus pre-mRNA acaban en un extremo 3' altamente conservado en forma de lazo, esencial para su regulación funcional, que se obtiene a partir de una escisión endonucleolítica única que requiere su interacción con U7 snRNP (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Aunque la biogénesis de U7 snRNP es análoga a la de las snRNPs espliceosomales, el complejo SMN que cataliza su formación y el sitio Sm son diferentes, y se unen a él no solo proteínas Sm (B/D3/E/F/G), sino también LSm10 y LSm11. A pesar de estas diferencias, SMN sigue siendo fundamental para que el núcleo LSm/Sm se una correctamente al U7 snRNA, de manera que niveles reducidos de SMN provocan la acumulación de U7 pre-snRNAs en el núcleo, reducen sus niveles citoplasmáticos y distorsionan el procesamiento del extremo 3' de los mensajeros de las histonas (Li et al., 2014).

Al profundizar en el conocimiento sobre las funciones de SMN, se van descubriendo también más aspectos de sus proteínas asociadas. Así, se han encontrado complejos nucleares de proteínas LSm2-8 formando una estructura en anillo sobre el U6 snRNA que parece participar en el reciclaje de otros snRNPs. Así mismo, se han descrito anillos LSm1-7 citoplasmáticos, implicados en el *turnover* y estabilización de mRNAs (Burghes & Beattie, 2009), y el complejo SMN podría estar implicado también en su génesis (Tisdale et al., 2014). Por todo ello, SMN es considerada en la actualidad como "*Master RNP assembler*" (Burghes & Beattie, 2009).

Aunque su interacción con las RBPs de la familia Sm/LSm es la más destacable, SMN también interactúa con muchas otras RBPs, algunas implicadas en diferentes aspectos de la regulación post-transcripcional, como el transporte del mRNA, estabilidad y traducción en las neuronas. SMN se une a ellas a través de sus dominios RG, que suelen estar alterados en la SMA (Tisdale et al., 2014). Su interacción con otras RBPs determina su participación en el *turnover* citoplasmático de los mRNA que contienen elementos ricos en AU (*AU–rich elements, AREs*). Uno de ellos, mRNA Cdkn1a, se acumula en las motoneuronas en la SMA (Tisdale et al., 2014).

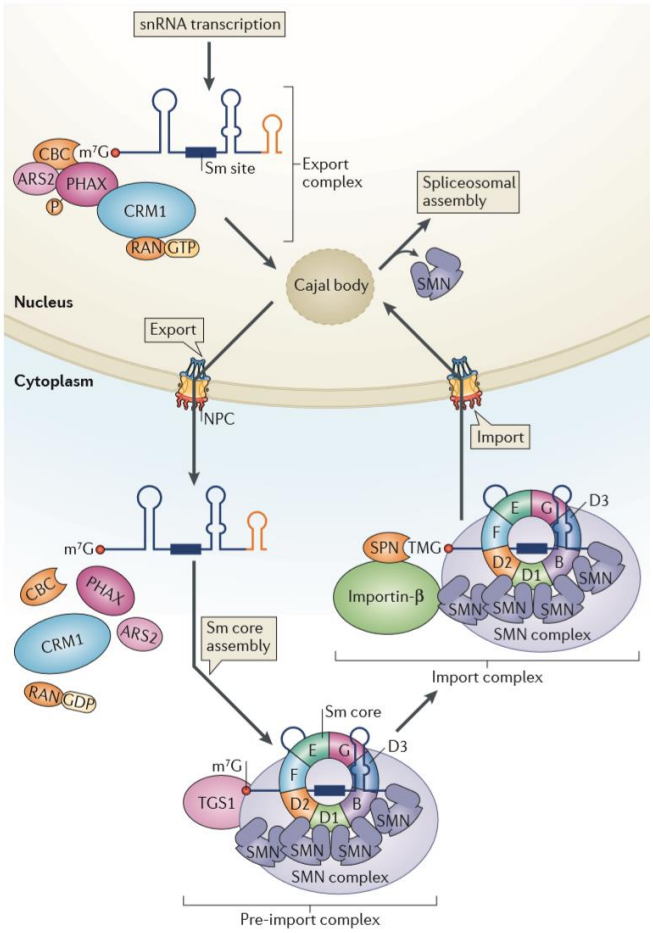


Figura 6. Etapas nuclear y citoplasmática de la formación de snRNPs. Tomado de Matera & Wang, 2014.

En una primera fase nuclear, la RNA polimerasa II transcribe el pre-snRNA, al tiempo que se producen modificaciones co-transcripcionales en ambos extremos de la molécula: **i)** la adición de la caperuza de 7-metil-G (m7G cap) en el extremo 5', que permite la asociación al CBP (*cap-binding complex*, formado por CBP20 y CBP80) y facilita la adhesión de PHAX, un adaptador de RanGTP, y el exportador XPO1, y; **ii)** el anclaje del complejo integrador (INTS11, INTS9) al extremo 3' para su exportación al citoplasma (Cauchi, 2010; Singh et al., 2017).

En una segunda etapa citoplasmática, fundamental para los pasos sucesivos de la biogénesis de las snRNPs, el snRNA recién exportado se une a la proteína SMN, previamente unida a las proteínas Sm. Es decir, las proteínas Sm forman subcomplejos de heterodímeros (SmD1-D2, SmB-D3) o heterotrímeros (SmE-F-G) para unirse a SMN, siendo necesaria la intervención de la metiltransferasa PMRT5 y la chaperona pICln. Esta chaperona recluta las proteínas Sm, forma los subcomplejos mencionados y facilita la dimetilación por PRMT5 de las proteínas Sm D1, D3 y B en los residuos de arginina, incrementando así la afinidad de estas proteínas por SMN (Cauchi, 2010; Matera & Wang, 2014). Por su parte, SMN se une al snRNA recién exportado mediante Gemin5, y a las proteínas Sm a través de Gemin2. Así, SMN precargada con las proteínas Sm facilita su interacción con los "sitios Sm" de las moléculas de snRNA recién exportadas, formándose sobre esa región el núcleo Sm heteroheptamérico.

En condiciones *in vitro* se ha observado que las proteínas Sm pueden asociarse de forma espontánea entre sí y con moléculas de snRNAs para formar snRNPs estructuralmente análogas a las que encontramos *in vivo*. Sin embargo, las proteínas Sm no tienen especificidad con respecto a las moléculas de RNA como substrato. El complejo SMN ayuda a solventar este problema, facilitando la interacción de las proteínas Sm con las moléculas de RNA adecuadas y dirigiendo la formación de los núcleos Sm en los snRNPs. Esto se consigue por un lado gracias a la unión de Gemin5 con regiones concretas de los snRNAs, y por otro, al reclutamiento de las 7 proteínas Sm a través de interacciones con pICln y PRMT5 (Li et al., 2014). Esta cadena de acontecimientos previene la asociación prematura e inespecífica, potencialmente deletérea, de proteínas Sm con RNA aleatorio, y así, asegura y acelera la formación de los núcleos Sm sobre los snRNAs correctos. De hecho, los snRNAs-SMN sin su núcleo Sm no son reimportados al núcleo, sino que se degradan en el citoplasma (Cauchi, 2010).

El complejo SMN-snRNP recién sintetizado puede ser reimportado al núcleo, y para ello también es fundamental SMN; si bien es cierto que, una vez la molécula de snRNP es importada, SMN se disocia de la partícula. El complejo SMN es necesario para reclutar a la trimetilguanosina sintasa 1 (TGS1), que hipermetila el extremo 5' del snRNA (formación del *TMG cap*), generando así una señal de localización nuclear sinérgica con el propio núcleo SMN. Estas dos señales de localización nuclear son reconocidas por el receptor *importinaβ*; mientras, la *snurportin-1* actúa como adaptador al unirse al *TMG cap* del snRNA (Cauchi, 2010; Matera & Wang, 2014). Una vez liberada de la partícula de snRNP, la proteína SMN intranuclear se localiza principalmente en los CBs y en los *Gems*. Los CBs contienen snRNAs y proteínas asociadas, pero los Gems únicamente albergan constituyentes del complejo SMN. Se cree que Gemin5 y Unrip deben bien disociarse previamente a la importación nuclear, o bien retornar al citoplasma inmediatamente después de que ésta tenga lugar (Cauchi, 2010), para justificar su escasa presencia en el compartimento nuclear.

Por su parte, las snRNPs espliceosomales maduras se localizan en los ***nuclear speckles***, compartimentos nucleares que almacenan factores de splicing, pero carecen de DNA. La mayor parte de la actividad de splicing es co-transcripcional y se localiza en la eucromatina, preferentemente en la periferia de los *nuclear speckles* (Matera & Wang, 2014). Cuando entran en el núcleo, la maduración de las moléculas de snRNPs no ha finalizado aún; se localizan transitoriamente en los CBs, donde los snRNAs **i)** sufren modificaciones mediadas por metilación y pseudouridilación dependientes de ***scaRNAs*** (*small CB specific RNAs*); **ii)** se asocian a proteínas específicas de cada tipo de snRNPs, y; **iii)** se ensamblan para formar complejos, por ejemplo, tri-snRNP U4/U6–U5. Finalizada su maduración, las snRNP salen del CB y se dirigen al espliceosoma, bien directamente o bien haciendo una escala previa en los *nuclear speckles* (Cauchi, 2010; Li et al., 2014; Matera and Wang, 2014).

6.3.2 SMN y splicing alternativo

Dado que la reacción de splicing es co-transcripcional, y dado el amplio interactoma de la proteína, SMN podría regular indirectamente este proceso mediante interacciones proteicas (por ejemplo, con FUS y helicasas asociadas a la RNA polimerasa II) que intervengan en el reclutamiento de factores de

splicing durante la transcripción (Singh et al., 2017). Se sabe que SMN interacciona al menos con una helicasa de RNA (Gemin3), moléculas que desenrollan la estructura del pre-mRNA regulando la expresión génica; así, SMN podría modificar el splicing de diferentes transcritos, incluyendo el suyo propio. La proteína SMN es susceptible de sufrir splicing alternativo; de su pre-mRNA se pueden obtener una variedad de transcritos tanto en condiciones normales como de estrés oxidativo (Singh et al., 2017). Uno de ellos, conocido como SMN axonal (*axonal-SMN* o *a-SMN*), es fundamental para el desarrollo cerebral de los mamíferos, participando en el crecimiento axonal y la motilidad celular, además de regular la expresión de quimiocinas (CCL2 y CCL7) y de IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*). Sin embargo, a-SMN no se encuentra en tejidos adultos, probablemente porque es degradada mediante la vía NMD (*nonsense-mediated decay pathway*) (Singh et al., 2017). Otros transcritos alternativos de función aún desconocida son los obtenidos mediante exonización del intrón 6 (SMN6B, más estable que SMNΔ7) o por la pérdida de los exones 5 y/o 3 (Singh et al., 2017).

6.3.3 La proteína SMN y los procesos de transcripción y traducción

La implicación de la proteína SMN en los procesos de transcripción y traducción ha quedado demostrada gracias a varios hechos: **i)** por un lado, el déficit de SMN altera la biogénesis de snRNPs y snoRNPs (disrupción de los CBs), dando lugar a defectos del procesamiento tanto del mRNA como del rRNA (Tapia et al., 2017); **ii)** se ha observado disociación de polisomas en estadíos tempranos de la enfermedad, incluso presintomáticos (Bernabò et al., 2017); **iii)** SMN cosedimenta con la maquinaria de traducción citoplasmática en lisados de médula espinal de ratones control, pero no en muestras de ratones de la misma edad con fenotipo SMA (Bernabò et al., 2017), y; **iv)** los defectos en la trascripción y la traducción se resuelven con terapia ASO (Bernabò et al., 2017). En este contexto, Bernabò et al. (2017) proponen que la proteína SMN podría coordinar, junto con otras proteínas, el delicado equilibrio entre la síntesis de RNA, exportación nuclear, transporte, transcripción y biogénesis de ribosomas, que es especialmente importante en las neuronas. Dado que la proteína SMN se puede localizar en el nucléolo, donde interacciona con el snoRNA U3 (implicado en el procesamiento del rRNA), la hipótesis de estos autores es perfectamente compatible con la propuesta de Tapia, et al. (2017) sobre el papel de la disfunción del nucléolo en la patogenia de la SMA.

Por otra parte, SMN participa en las tres etapas de la transcripción (iniciación, elongación y terminación) de forma directa o indirecta, gracias a su amplio interactoma. Así, opera en la iniciación gracias a su interacción con la RNA polimerasa II, p53 y el factor transcripcional E2; de manera indirecta, en la elongación, al controlar la biogénesis de U1 snRNP, y, finalmente, en la terminación, al interaccionar con la helicasa DNA/RNA senataxina y con la propia RNA polimerasa II (Sing et al., 2017).

En lo que respecta a su participación en el proceso de traducción, SMN se ha relacionado con la regulación de la traducción de la metiltransferasa CARM1, que participa en el splicing, transcripción y procesos de autofagia celular, de manera que el déficit de SMN se asocia a *upregulation* de CARM1. Por otro lado, SMN podría participar indirectamente en la represión de la traducción a través

de una serie de microRNAs, que presentan expresión aberrante en la SMA; algunos son considerados potenciales terapias (Singh et al., 2017).

6.3.4 Relación de la proteína SMN con el citoesqueleto de actina y participación en el transporte axonal

Las neuritas y conos de crecimiento están formados por un citoesqueleto enriquecido en actina que sufre reordenamientos variados en respuesta a señales externas e internas. SMN se une a dos proteínas de especial relevancia en este contexto: Profilina2a y Plastina3 (Singh et al., 2017). Profilina2a es una proteína neuronal de unión a actina, regulada mediante ROCK (*Rho-associated kinase*), que participa en el crecimiento de las neuritas. SMN y ROCK podrían competir, en cierta manera, para interaccionar con Profilina2a y regular este crecimiento (Singh et al., 2017). Plastina3 es una proteína de unión a actina reguladora de la dinámica del citoesqueleto (Singh et al., 2017). Por otro lado, SMN interacciona con el complejo proteico COPI (mediador del transporte vesicular y el tráfico intracelular en neuritas) y el mRNA de la β-actina en los conos axonales, donde podría participar como estabilizador de plataformas de traducción que permitan una síntesis rápida de β-actina en respuesta a las necesidades dinámicas del citoesqueleto (Singh et al.,2017).

SMN se asocia a elementos del citoesqueleto en dendritas y axones, y es transportada de forma rápida, bidireccional y dependiente de microtúbulos entre el soma y los conos de crecimiento (Cauchi, 2010), sugiriendo su participación en el transporte de proteínas y mRNAs necesarios en el extremo distal del axón (Tiziano et al., 2013). Se cree que la proteína SMN participa en el tráfico de múltiples mensajeros hasta los conos de crecimiento, gracias a su interacción con diferentes RBPs (Li et al., 2014). Así, SMN colocaliza con las RBPs hnRNP R, hnRNP Q, FMRP, HuD, HuR, o IMP1 en los gránulos de RNA axonales y dendríticos (Li et al., 2014; Singh et al., 2017), junto con otros componentes del complejo SMN, pero no con proteínas Sm, lo que sugiere que, en estos gránulos, SMN desempeña una función no relacionada con el ensamblaje de RNPs.

Existen numerosas evidencias que apoyan la función de SMN en el transporte axonal, probablemente al facilitar la interacción del mRNA con las RNPs nucleares heterogéneas (hnRNP Q/R) y proteínas de unión al Z DNA (ZBPs) (Burgues & Beattie, 2009; Li et al., 2014): **i)** el déficit de SMN reduce la localización de las RBPs mencionadas y sus transcritos asociados en axones y conos de crecimiento, que en consecuencia disminuyen su longitud y tamaño (Li et al., 2014); **ii)** determinadas mutaciones de SMN, que conservan la función de biosíntesis de U snRNPs, no logran corregir los defectos de crecimiento de los axones de las motoneuronas (Cauchi, 2010); **iii)** la sobreexpresión, en modelos celulares, de las RBPs HuD e IMP1 corrige los defectos del crecimiento axonal en MN derivadas de ratones con SMA severa (Singh et al., 2017); **iv)** LSm1 y 4 se han descrito asociadas a SMN en dendritas y axones, formando RNP de transporte de RNA axonal, y también se han descrito funciones de localización del RNA en análogos de la LSm14 humana en *Drosophila* y *C. elegans* (Burghes & Beattie, 2009).

En consecuencia, en la SMA, el déficit de SMN conduce a alteraciones en los procesos de transcripción y traducción local, hecho que podría tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad (Tiziano et al., 2013).

6.3.5 La proteína SMN en la UNM y la sarcómera

En la UNM, SMN colocaliza a nivel presináptico con las proteínas hnRNP-R y Profilina2a, pudiendo justificar un papel de SMN para ensamblar, ordenar y/o transportar mRNP necesarios para el crecimiento y/o formación de los conos de crecimiento axonal, así como el mantenimiento de las UNM (Cauchi, 2010). Por otro lado, a nivel postsináptico SMN podría participar en la organización de los receptores de ACh y el splicing del mRNA de la agrina Z (Jangi et al., 2017).

La identificación de nuevas proteínas del interactoma de la SMN abrió el camino a considerar funciones específicas de ésta fuera del tejido nervioso. En este sentido, la interacción de SMN con proteínas de los discos Z y con la actina la ha situado como participante en el ensamblaje de la sarcómera (Tapia et al., 2017). En esta estructura, se ha localizado el complejo SMN en el disco Z (rico en α-actinina) del músculo esquelético estriado y cardíaco (Cauchi, 2010). Esta localización sugiere una función independiente del ensamblaje de snRNPs que podría estar relacionada con el mantenimiento de la integridad del disco Z, señalización nuclear y/o transporte de mRNPs en el disco Z (Cauchi, 2010).

Se ha observado en modelos animales que mutantes hipomórficas de *Smn* producen degeneración muscular y asocian mayor mortalidad; sin embargo, la expresión de *Smn* únicamente en el músculo esquelético no tiene impacto en el fenotipo de la SMA (Gavrilina et al., 2008).

6.3.6 La proteína SMN, los telómeros y el ciclo celular

La proteína SMN incluye en su interactoma múltiples componentes de la telomerasa, incluyendo GAR1, TERT, disquerina y WRAP53. Teniendo en cuenta que los CBs se asocian a los telómeros en la fase S del ciclo celular y estas interacciones proteicas, SMN podría participar en el mantenimiento de los telómeros, el transporte de la telomerasa a los CBs, y el ensamblaje de la telomerasa, que en esencia, es un complejo de múltiples RNPs que catalizan la replicación de los extremos cromosómicos (Singh et al., 2017).

Como parte de su papel esencial en el metabolismo del RNA, SMN podría prevenir la inestabilidad genómica y la neurodegeneración. Esta función se ha propuesto tras observarse la formación de R-loops transcripcionales, en cuya resolución podría participar SMN, ante alteraciones del procesamiento del RNA que producen daño del DNA y retención intrónica. Esta situación induce la expresión de Cdkn1a/p21, mediante la parada del ciclo celular mediada por p53 y otros reguladores del ciclo y reparación del DNA (Jangi et al., 2017).

7 PATOGENIA DE LA SMA: BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA DISFUNCIÓN DEL METABOLISMO DEL RNA EN LAS MOTONEURONAS

La SMA se caracteriza por la degeneración de las MNα espinales y la atrofia del músculo esquelético (para revisión, ver Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015). Clásicamente ha sido considerada una enfermedad neurodegenerativa, cuya diana celular eran las MN, pues inicialmente se observó, en modelos murinos, que la disminución ubicua de los niveles de SMN era aparentemente bien tolerada en todos los tejidos, salvo el nervioso (Burghes & Beattie, 2009; Tisdale & Pellizzoni, 2015). Pero ¿cómo es posible que la reducción de una función necesaria en todas las células afecte de manera específica a las MNα? Independientemente de otras posibles funciones de SMN relacionadas con la patogenia de la SMA, está claro que su papel en la biogénesis de snRNP es crítico, y la ausencia de esta función lleva invariablemente a la muerte celular (Tiziano et al., 2013). Sin embargo ¿podría entenderse la disfunción del sistema motor como un proceso dependiente únicamente de la pérdida de MN?

Por un lado, es poco probable que la patogenia de la SMA pueda explicarse en base a la alteración de una única función dependiente de SMN; más bien, la enfermedad se relaciona con la alteración de múltiples vías celulares a lo largo de todo el circuito motor (Tisdale & Pellizzoni, 2015), siendo su descripción y caracterización el principal reto de investigación actualmente, en especial para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas. Por otro lado, y tras demostrarse en modelos murinos de SMA severa la afectación fuera del sistema nervioso, incluyendo corazón, páncreas e hígado, así como en el propio músculo esquelético, especialmente en la UNM (Bowerman et al., 2012b; Tiziano et al., 2013; Tisdale & Pellizzoni, 2015), la enfermedad comienza a perfilarse como multisistémica, más que una enfermedad neurodegenerativa “pura”.

7.1 Principales hipótesis patogénicas en la SMA: requisitos espaciales y temporales de SMN

Es tentador hipotetizar que una menor biogénesis de snRNPs es la responsable de la SMA, dado que la función chaperona de SMN en el ensamblaje de los snRNPs es la mejor conocida. De hecho, se ha documentado una actividad de biogénesis de U snRNPs menor en las mutantes de SMN de pacientes de SMA (Cauchi, 2010). Pero esta hipótesis no justifica la afectación selectiva de las MN. Se ha tratado de explicar la selectividad de la patogenia de la SMA en base a una mayor vulnerabilidad de las MN ante el déficit de SMN, sin disponer aún de una explicación válida para esta cuestión (Cauchi, 2010). Hasta 2009, se trabajaba con dos hipótesis principales y no excluyentes entre sí. La primera, el déficit de SMN afectaría al splicing de un grupo selectivo de genes importantes en el circuito motor. La segunda, que ese déficit condicionaba la pérdida de una función específica de SMN en los axones motores (Burghes & Beattie, 2009).

Una posible explicación para la marcada vulnerabilidad de las MN frente al déficit de SMN sería la existencia de requerimientos espaciales y temporales específicos, así como cambios cualitativos y cuantitativos en el contenido de snRNP. En los últimos años, se han observado diferentes evidencias sobre los requisitos espaciales y temporales específicos de SMN en el tejido

neuromuscular: **i)** se ha descrito la necesidad de niveles altos de SMN durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano, momentos que coinciden con la maduración del sistema motor (Tisdale & Pellizzoni, 2015); **ii)** existe una falta del viraje en la expresión génica que acontece de forma natural durante el desarrollo del sistema nervioso (vías relacionadas con la proliferación celular, desarrollo de axones y oligodendrocitos, y mielinización), sugiriendo que la patogenia de la SMA esté relacionada con funciones de SMN durante la maduración postnatal y desarrollo neuromuscular (Bäumer et al., 2009); **iii)** fisiológicamente las MN presentan niveles de inclusión del exón 7 menores al resto de células de la médula espinal, hecho que activa una ruta de *feedback* negativo que exacerba esta exclusión, lo que determina un descenso en los niveles de snRNP más marcado en esta población celular (Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015); **iv)** las MN más vulnerables son las encargadas de la inervación de los músculos proximales y axiales, y **v)** el déficit de SMN lleva a la muerte de las MN inexorablemente, y su restitución consigue prevenir este suceso en modelos celulares y murinos de SMA (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Rodríguez-Muela et al., 2017).

Según Zhang et al. (2008) la mayor vulnerabilidad de las MN no se debe a una función específica de SMN en esta población celular, sino a factores celulares específicos que determinan el perfil y abundancia individual de snRNPs en cada tejido, cuyo efecto solo se pondría de manifiesto cuando los niveles de SMN, factor común en las vías generales del splicing, están en su umbral límite. Tras demostrar en 2008 que el déficit de SMN no produce una disminución uniforme de los snRNPs en todos los tejidos, estos autores propusieron que este déficit ocasiona una perturbación en la estequiometría de las snRNPs que modifica su interactoma (interacciones entre sí y con otras proteínas del espliceosoma), determinando variaciones en la eficiencia, tasa y fidelidad con la que las snRNPs se ensamblan sobre los intrones. De esta manera, se generarían rutas de splicing aberrantes que darían lugar a transcritos anormales. Como cada tipo celular tiene un repertorio de snRNPs único, y un nivel mínimo de necesidades de snRNPs diferente al de otros tejidos (Li et al., 2014), el déficit de SMN produciría una alteración del repertorio de snRNPs ("*snRNPertoire*") específico de tejido, explicando las diferencias entre ellos. Después, la pérdida de MN podría deberse a la generación de uno o más transcritos aberrantes, o al efecto acumulativo de defectos generales del splicing (Zhang et al., 2008). Apoyando esta hipótesis, se ha descrito recientemente la alteración del splicing de genes especialmente importantes en el funcionamiento neuronal, como *Myo10*, implicado en el crecimiento axonal, migración neuronal y transporte de vesículas, cuyo splicing está predominantemente alterado en el SNC de modelos murinos de SMA en comparación con tejidos periféricos (Doktor et al., 2017).

Por otro lado, Bernabò y colaboradores (2017) han propuesto la existencia de un "nivel umbral" para SMN, de manera que los diferentes tejidos y células necesitarían niveles mínimos de SMN distintos, justificando una susceptibilidad diferente a la pérdida de la proteína. Varios trabajos recientes apoyan esta hipótesis. Utilizando modelos murinos de SMA, Doktor et al. (2017) sugieren que ese "umbral" podría estar determinado por el mecanismo de *feedback* que regula el splicing de *SMN2*. Así, los factores de splicing expresados durante el desarrollo embrionario permitirían una inclusión suficiente del exón 7 como para determinar un mecanismo de *feedback* positivo que produjese suficiente SMN;

después, en el periodo postnatal, el viraje de la expresión génica llevaría a una disminución progresiva de los niveles de SMN, relacionada con factores del splicing que regulan el procesamiento de SMN (como *Tial1*, que favorece la inclusión del exón 7), y la activación consecuente de la ruta de *feedback* negativo que potencia la exclusión del exón 7 (Doktor et al., 2017).

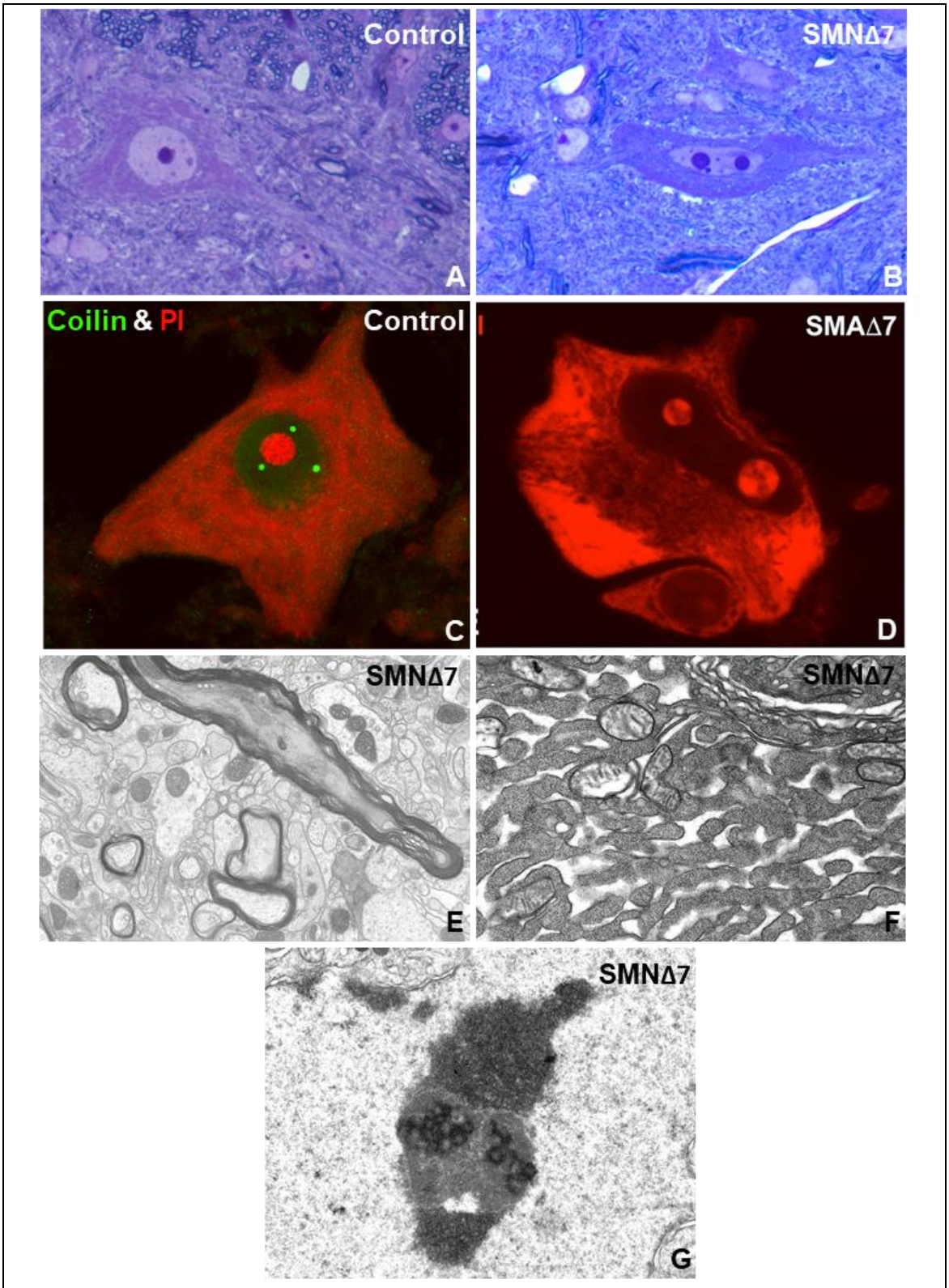


Figura 7. **A)** Motoneurona normal del asta anterior de la médula espinal de ratón, localizada típicamente en la periferia de la sustancia gris, muy cerca de la transición con la sustancia blanca. **B)** Motoneurona en degeneración de un modelo murino de SMA. Destacan la pérdida de integridad y densificación del citoplasma y la hipertrofía nucleolar. **C)** Doble marcaje fluorescente para la coilina, un marcador molecular de los CBs, y para ácidos nucleicos, con ioduro de propidio (PI), en una motoneurona control. Destacan en el núcleo tres CBs y un nucléolo muy prominente con una elevada concentración de rRNAs teñidos con el PI. El citoplasma muestra la típica distribución de la sustancia de Nissl. **D)** Disrupción de la sustancia de Nissl con severa cromatolisis central en una motoneurona del modelo murino de SMA. En los nucléolos se observa la segregación de masas del componente granular que aparecen más intensamente teñidas con el PI. **E)** Sección longitudinal de una fibra mielínica con el axón en degeneración de una motoneurona del modelo murino de SMA. Nótese la elevada densidad electrónica del axoplasma en comparación con el axón electrolúcido de otras fibras que aparecen en la imagen. **F)** Desestructuración de la maquinaria de síntesis proteica con dilatación de la luz de las cisternas del retículo endoplásmico granular, disociación de los polirribosomas y acumulación de monoribosomas en una motoneurona SMA. **G)** Pérdida de integridad nucleolar, con segregación del CFD y CG y heterocromatinización en la superficie del nucleolo. *Cortesía de Berciano y Lafarga, 2017*.

Por su parte, Rodríguez-Muela y colaboradores han desarrollado un modelo celular de SMA que recalca el papel de SMN en la supervivencia neuronal. Estos investigadores han observado una importante heterogeneidad en los niveles de expresión de SMN no solo entre diferentes tipos de neuronas, sino también dentro de una población concreta de MN, existiendo incluso en cultivos celulares derivados de fenotipos severos de SMA, algunas MN con niveles de SMN normales. En este sentido, defienden que son aquellas MN con niveles más bajos de SMN las más vulnerables a eventos estresantes; así, en la fase aguda de la enfermedad, se perderían las MNα con niveles bajos de SMN, mientras que la fase crónica se desarrollaría sobre una población de MN supervivientes, con niveles de SMN mayores, y en la patogenia predominaría el déficit de las demás funciones de SMN (Rodríguez-Muela et al., 2017). Aunque justifican la selectividad de la afectación de las MN basada en la heterogeneidad de los niveles de SMN y destacan la importancia de SMN en la supervivencia de las MN, siguen sin explicar el motivo de ésta.

7.2 El déficit de SMN conduce a un proceso de splicing deficiente y aberrante

Los defectos en el splicing alternativo son responsables de más del 50% de las enfermedades hereditarias humanas, y procesos de splicing aberrantes son especialmente prominentes en las enfermedades neurodegenerativas (Oriol Narcis et al., 2017).

Una consecuencia del déficit de SMN es la biogénesis reducida de las moléculas de snRNPs encargadas del splicing. Pero ¿cuál es la relación de las snRNP espliceosomales con la patogenia de la SMA? En 2012, Lotti y colaboradores

relacionaron la alteración en el ensamblaje de snRNPs, consecuencia del déficit de SMN, con la alteración en la expresión de un grupo de genes que provoca la disfunción de las MN, proponiendo entonces la SMA como una enfermedad relacionada con el splicing. Recientemente, Jangi et al. (2017) han propuesto que son los defectos en el procesamiento del RNA, y particularmente, la retención intrónica, los que desencadenan el daño del DNA que conduce a la neurodegeneración.

Existen varios datos que apoyan el papel del déficit en la biogénesis de snRNPs en la patogenia de la enfermedad: **i)** la proteína SMN de pacientes SMA presenta menor capacidad de biogénesis de snRNP (para revisión, ver Cauchi, 2010); **ii)** la introducción de snRNPs purificados o de SMN silvestre humana resuelve los defectos en el crecimiento de los axones motores observados en modelos de pez cebra *knockdown* para *Smn*, (H. M. Burghes & E. Beattie, 2009; K. Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015); **iii)** mutaciones sin sentido de la proteína SMN, que conservan la capacidad de biogénesis de snRNPs, son capaces de rescatar el fenotipo en modelos murinos de SMA portadores del transgén humano *SMN2* (Doktor et al., 2017); **iv)** en modelos murinos de SMA, se ha observado que los defectos del ensamblaje de snRNP espliceosomales se correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Burghes & Beattie, 2009; K. Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015; Singh et al., 2017).

Las alteraciones del splicing son específicas de tejido y no uniformes para todos los snRNP, afectando especialmente a la expresión génica de los genes que se procesan mediante el espliceosoma menor (Burghes & Beattie, 2009; K. Li et al., 2014; Tisdale & Pellizzoni, 2015; Singh et al., 2017), a aquellos que presentan mayor número de intrones y a los que codifican proteínas transportadoras de membrana y de la matriz extracelular (Zhang et al., 2008). De nuevo, nos vemos ante la necesidad de explicar cómo la alteración en un proceso global afecta de forma preferente a un elemento concreto. Pero es difícil saber si las variaciones en la expresión génica son un trastorno global primario del splicing derivado del déficit de SMN, o si son secundarias a las alteraciones del splicing de uno o varios transcritos cruciales para la supervivencia del tejido neuromuscular (Burghes & Beattie, 2009). En un intento de probar la segunda posibilidad, el grupo de Bäumer examinó las alteraciones del splicing en estadios presintomáticos y sintomáticos tempranos y tardíos de la enfermedad en modelos murinos, esperando demostrar que dichas alteraciones no son la causa primera de la neurodegeneración, sino que ocurren de forma tardía. Sin embargo, encontraron que algunas de ellas ya estaban presentes en estadios tempranos, por lo que no pudieron descartar la primera posibilidad (Bäumer et al., 2009; Cauchi, 2010).

Por su parte, Lotti y colaboradores identificaron una ruta de splicing aberrante dependiente del espliceosoma menor en modelos de *Drosophila*, relativa al gen *Stasimon*, que la mosca de la fruta necesita para desarrollar sinapsis funcionales. La normalización en la expresión y procesamiento de *Stasimon* corregía los defectos fenotípicos en el modelo, ligando así alteraciones neuronales importantes en la patogenia de la SMA directamente con trastornos del splicing dependientes de SMN (Lotti et al., 2012; Tisdale & Pellizzoni, 2015). Además de las alteraciones directas, la reducción de los niveles de SMN tiene efectos indirectos negativos, pues algunos factores del splicing también se ven

afectados. Sin embargo, el mecanismo exacto por el que el déficit de SMN desencadena un splicing aberrante, y no solo deficiente, está aún por describirse (Singh et al., 2017).

Que aquellos pre-mRNAs con mayor número de intrones sean más susceptibles de sufrir un procesamiento aberrante cuando la maquinaria del splicing es defectuosa, sugiere que la probabilidad de que existan defectos del splicing es proporcional al número de cortes y empalmes que sufre el transcrito, y/o que estos defectos podrían transmitirse de un intrón a otro. Por otro lado, es posible que existan secuencias de nucleótidos que favorezcan esta mayor susceptibilidad (Zhang et al., 2008). Pero ¿en qué consiste este procesamiento aberrante?

En modelos murinos Smn-/- uno de los aspectos principales en la patogenia de la SMA es la retención intrónica, sobre todo en intrones del espliceosoma menor, de acuerdo con lo anteriormente mencionado (Jangi et al., 2017). Este grupo de investigadores proponen que dicha retención se debe a una alteración de la dinámica del espliceosoma, dependiente directamente de los niveles de SMN, pues la terapia ASO corrige este trastorno del splicing, correlacionándose así con la gravedad de los fenotipos (Jangi et al., 2017). En cuanto a la afectación selectiva de los intrones dependientes del espliceosoma menor, en un trabajo reciente se muestra que los intrones retenidos y aquellos que respondían mejor a la terapia ASO presentaban una baja concentración de GC, sugiriendo que el contenido de GC intrónico es uno de los factores determinantes de la diferente susceptibilidad de los intrones (Doktor et al., 2017). Sin embargo, los intrones retenidos no afectaban especialmente a la expresión de sus genes; es decir, son procesados más tardíamente en el núcleo, quizá de una forma más lenta. La solución a esta aparente paradoja se encuentra en el estrés celular secundario a la retención intrónica.

Los intrones retenidos, ricos en G, presentarían una destacable facilidad para la formación de R-loops con la cadena molde de DNA, lo que favorecería la generación de roturas de DNA de doble hebra, responsables de la activación tardía de vías apoptóticas (vía p53 a través de Cdkn1a) que, finalmente, conducirían a la muerte celular. Además, el patrón de retención intrónica es diferente en células murinas frente a las humanas, pero no así las respuestas desencadenadas ante el daño del DNA (Jangi et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que es el estrés celular por el daño del material genético derivado del splicing deficiente lo que determina la degeneración celular, más que el que se afecte o no un grupo de intrones específico, tal y como se ha sugerido hasta ahora (Bäumer et al., 2009; Jangi et al., 2017). Así, el déficit de SMN asocia daño en el DNA de forma indirecta, como consecuencia de los defectos del splicing, y directa, a través de su participación en la resolución de R loops mediante el reclutamiento de la helicasa senataxina (Jangi et al., 2017) y en el ensamblaje del complejo de la telomerasa para el mantenimiento de los cromosomas en sucesivas divisiones celulares (Singh et al., 2017). Es decir, el déficit de SMN se asocia a una mayor inestabilidad genómica, cuya especificidad tisular por las MN podría explicarse: **i)** si las MN presentasen menor capacidad de reparación del daño del DNA o **ii)** por funciones adicionales de SMN en este tipo celular (Jangi et al., 2017).

En relación con la participación de SMN en la respuesta celular al estrés, cabe destacar su localización en los gránulos de estrés (*stress granules, SG*), centro de almacenamiento de mensajeros y factores iniciadores de la traducción que se forman bajo situaciones de estrés celular, en los que se observado cómo la sobreexpresión de SMN induce su formación (Jangi et al., 2017), en tanto que su déficit la dificulta, haciendo a las células más sensibles al estrés celular (Singh et al., 2017). En los SG también encontramos otras RBPs, como TDP43, FUS, o ATXN2, asociadas a formas esporádicas y familiares de la ALS, que cumplen funciones muy variadas en el metabolismo del RNA, al igual que la SMN, y como ella, han sido relacionadas con la prevención de la formación de R-loops (Jangi et al., 2017). En la ALS, TDP43 y/o FUS forman agregados citoplasmáticos patológicos. Además, la forma mutada de FUS secuestra SMN y produce alteraciones en los niveles de snRNAs y en el splicing. Así, alteraciones en el procesamiento del RNA a diferentes niveles podrían dar lugar a roturas de doble cadena del DNA, que conduzcan a la neurodegeneración tanto en la SMA como en la ALS (Jangi et al., 2017).

7.3 Otras RNPs en la patogenia de la SMA

De manera consistente con el papel explicado previamente de la proteína SMN en el ensamblaje de los U7 snRNP y el metabolismo de las histonas, el déficit de SMN conlleva la acumulación de U7 snRNA y un procesamiento deficiente del extremo 3' de los mensajeros de las histonas (Singh et al., 2017). Se han documentado niveles reducidos de U7 snRNP en diferentes modelos de experimentación, que podrían contribuir directamente a la menor proliferación celular que existe en la SMA, no solo en MN sino también en otros tejidos, como el hepático, renal o muscular. Esta menor proliferación estaría favorecida además por fenómenos de *up-* y *down-regulation* de diferentes rutas de proliferación celular, como el splicing aberrante e inhibición de *Rasgrp3* (activador de Ras), o incremento del inhibidor de Cdk1, *Cdk1na* (Doktor et al., 2017).

La proteína SMN interacciona con componentes de diferentes tipos de snoRNPs, encargadas de la modificación post-transcripcional del RNA no codificante. Por un lado, con la proteína GAR1 del subtipo caja H/ACA de snoRNP, responsable de la pseudouridilación; por otro, con fibrilarina, que pertenece al núcleo proteico del subtipo caja C/D de snoRNPs, encargado de la 2'-O-metilación de la ribosa. Así, el déficit de SMN se asocia a un ensamblaje alterado de snoRNP variados y, por tanto, a la alteración de sus funciones (Singh et al., 2017).

7.4 Alteraciones de los CBs en la SMA: el déficit de SMN altera la dinámica de los CBs

El déficit de SMN se asocia a: **i)** reducción del número de CB canónicos; **ii)** hipometilación y redistribución de la coilina en casquetes perinucleolares y dentro del nucleolo; **iii)** desestructuración y segregación del nucléolo con formación de cavidades e INoBs (*intranucleolar bodies*) enriquecidos en proteínas conjugadas con SUMO y disfunción de la biogénesis de rRNAs, **iv)** *upregulation,* probablemente reactiva y compensatoria, de la expresión de genes codificantes de diversas proteínas nucleolares (UBF, nucleolin, fibrillarina y B23);

y **v)** alteración de la maquinaria de síntesis proteica, observándose cromatolisis con dilatación de las cisternas RER y disociación de los poliribosomas (Tapia et al., 2017).

La relocalización de la coilina no se acompaña de una disminución de su síntesis. La coilina tampoco colocaliza con SMN y snRNPs, cuyos niveles sí que se encuentran reducidos, en los casquetes perinucleolares y en el nucleolo. SMN podría participar en la modificación post-transcripcional de la coilina, conllevando su déficit una menor cantidad de proteína madura, que perdería su señal de localización nuclear en los CBs, redistribuyéndose preferentemente alrededor del nucléolo. Es decir, la proteína SMN parece ser necesaria para la adecuada homeostasis de los CB (Tapia et al., 2017). Recientemente se ha descrito la posible participación de la proteína WRAP53 en la localización de SMN en los CBs (Singh et al., 2017). La mayoría de los CBs con coilina que quedan en las MN no pueden reclutar SMN ni snRNPs, y suelen aparecer como pequeños CB no estructurados, lo que sugiere que no están ya implicados en la biogénesis de snRNPs (Lafarga et al., 2017). La disrupción de los CBs claramente se correlaciona con la disfunción del splicing y el procesamiento de pre-rRNAs al reducirse la biogénesis de snRNPs y snoRNPs, responsables del procesamiento mRNAs y rRNAs, respectivamente, lo que secundariamente lleva a disrupción de la síntesis proteica (Tapia et al., 2017). Puesto que la desestructuración de CBs se ha encontrado en neuronas que mantenían aparentemente íntegra la sustancia de Nissl, la pérdida de CBs refleja un fenómeno primario en la patogenia de la SMA, manifestación muy temprana de disfunción neuronal, que precede y conduce a alteraciones en la síntesis proteica (Tapia et al., 2017).

La relación existente entre los CB y el nucléolo ha sido sobradamente demostrada, tanto a nivel molecular, pues comparten fibrilarina, Nopp140, disquerina y snoRNPs, como celular, dado que los CBs frecuentemente se asocian físicamente con el nucléolo y se mueven desde y hacia el nucléolo en videoregistros de célula viva. Esta relación sería fundamental en células con alta actividad transcripcional y de síntesis proteica, como las neuronas, permitiendo un tráfico rápido de snoRNPs desde el CB, en el que se ensamblan a una velocidad 10 veces mayor que en el nucleoplasma, hacia el nucléolo, que se acomoda a las necesidades funcionales de la célula (Tapia et al., 2017). Las alteraciones estructurales del nucléolo en las MN de modelos murinos de SMA se acompañan de alteraciones de la dinámica de transcripción de genes ribosomales en este compartimento nuclear. La formación de cavidades nucleolares e INoBs, transcripcionalmente silentes, está ligada a la presencia de SUMO1, y contrasta con la preservación de una actividad transcripcional basal de rRNA en el CFD. Existe un menor procesamiento de precursores 45S y de 18S rRNA y retención de sus transcritos maduros (18S rRNA), que conduce a un incremento del tamaño del nucléolo. Apoyando la alteración en la actividad transcripcional normal, se observa un menor número y densidad de unidades transcripcionales CF/CFD, con incremento del diámetro de los CF, así como severa segregación del CG (Tapia et al., 2017). Se activan además respuestas nucleolares al estrés, como: **i)** mecanismos de *upregulation*, aparentemente neuroprotectores, pues parecen esenciales para la supervivencia neuronal y se han observado en otras patologías neurodegenerativas (Enfermedad de Alzheimer, Parkinson) (Tapia et al., 2017), y; **ii)** acumulación en las zonas silentes del nucléolo de proteínas de respuesta al estrés, como factores de

reparación del DNA, proteasomas o el factor de exportación nuclear CRM1, entre otros (Tapia et al., 2017).

El nucléolo interviene en diversas respuestas celulares al estrés, por lo que puede considerarse un indicador indirecto del estado neuronal. En este contexto, favorecer su interacción con el CB comienzan a ser un campo importante de investigación en la búsqueda de nuevas terapias para la SMA (Tapia et al., 2017).

7.4.1 Redefiniendo los Marcadores Nucleares de la SMA

Recientemente, Lafarga et al. (2017) han propuesto la redefinición del evento nuclear hasta ahora descrito como característico en las MN de la SMA. Proponen considerar la alteración de los CB canónicos, en lugar de la reducción de Gems, como marcador nuclear de la SMA en las MN espinales. Esta redefinición se fundamenta en los siguientes argumentos: **i)** SMN y coilina colocalizan en los CBs de neuronas maduras de mamíferos, mientras que los Gems solo han sido descritos en neuronas fetales; **ii)** la formación y mantenimiento de los CBs son dependientes de la transcripción y biogénesis de snRNPs, dos funciones alteradas en las enfermedades de la MN; **iii)** en células derivadas de pacientes de SMA la pérdida de CBs se correlaciona con descenso del ensamblaje de U4/U6-U5 snRNP espliceosomales y defectos en el splicing de intrones dependientes del espliceosoma menor; **iv)** el marcador de los CBs coilina liga la biogénesis de snRNPs y snoRNPs, haciendo al CB el centro del procesamiento de sncRNAs; **v)** niveles reducidos de SMN inducen una disminución de CBs en MN de un paciente SMA, mientras que los Gems están ausentes tanto en las MN enfermas como en los controles de la misma edad; y **vi)** en los estudios que clásicamente han descrito la desaparición de los Gems como sello distintivo de las alteraciones nucleares en la SMA, el único marcador empleado fue SMN, siendo muy probable que lo descrito como Gems fuesen en realidad CB (Lafarga et al., 2017).

El estudio de los patrones de retención intrónica asociados a la patogenia de la SMA ha permitido definir una marca nuclear de la patología global del splicing en estadios sintomáticos tardíos de la enfermedad (Oriol et al., 2017). La poliadenilación es un paso esencial en el procesamiento de los mensajeros, aportando estabilidad a la molécula y permitiendo su exportación nuclear ulterior. La proteína PABPN1 (*poly(A)-binding protein nuclear 1*) es esencial para la adición de la cola de poli(A) al mRNA; una vez poliadenilados, los mRNAs se unen a diferentes ncRNAs y RBPs que regulan su procesamiento y exportación. Algunos de los mRNAs que, siendo normales, han sido procesados de forma incompleta, quedan retenidos fisiológicamente en los *nuclear speckles* (con diferentes tipos de RNA y factores del splicing y procesamiento del RNA). Defectos del splicing o de la poliadenilación pueden llevar a una retención de mRNAs inmaduros y/o anormales en inclusiones nucleares, con sus RBPs asociadas, bajo condiciones patológicas (Oriol et al., 2017). En un estudio reciente se ha observado que el déficit de SMN altera la distribución nuclear del mRNA poliadenilado, acumulándose en los *nuclear speckles* en primera instancia, y después en los cuerpos nucleares denominados ***PARG*** (*poli(A) RNA granules*), enriquecidos en la RBP Sam68, reguladora del splicing alternativo de *SMN2*, pero que carecen de PABPN1. Estos cuerpos nucleares incrementan su

número de manera proporcional a la degeneración de las MN. Los mensajeros retenidos en el núcleo presentaban un procesamiento inadecuado o aberrante, con retención intrónica, especialmente en 4 genes importantes para la función de las MN (*Chat*, *Chodl*, *Myh9* y *Myh14*). Al ser retenidos en el núcleo, disminuye su exportación al citoplasma. Esto implica no solo una reducción de los niveles de mRNAs citoplasmáticos (y por tanto, de su traducción), sino también una menor capacidad de formación de ***gránulos de estrés***, incrementando la sensibilidad de las MN a estresores celulares. Al haberse descrito estos hechos en modelos murinos presintomáticos (postnatal P7) y sintomáticos (postnatal P14) de SMA, se propone la formación de PARGs como parte de la respuesta celular al estrés secundario a la disfunción global del metabolismo del RNA y como marca nuclear de la misma en estadíos tardíos de la SMA (Oriol et al., 2017).

7.5 Alteraciones estructurales y funcionales en la maquinaria de traducción

Las alteraciones del splicing, por sí solas, no permiten explicar completamente la patogenia de la SMA (Bäumer et al., 2009; Bernabò et al., 2017). Se ha propuesto que SMN es un importante regulador de la traducción neuronal en la SMA, en un momento en el que hay cada vez más evidencias de la importancia de los defectos de la traducción en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, Parkinson o Demencia Frontotemporal. En este contexto, resulta de gran interés la observación de que SMN puede asociarse a los polirribosomas, que la maquinaria de traducción pierde su localización normal ante el déficit de SMN, y que tanto la localización como la traducción de determinados mRNAs está alterada en neuronas de modelos murinos de SMA (Bernabò et al., 2017).

Dado el amplio interactoma de la proteína SMN y que su función nuclear es bien conocida, es fácil pensar que, junto a otras proteínas, SMN podría coordinar el equilibrio entre la síntesis de RNA, su exportación nuclear, transporte y traducción, así como la biogénesis de ribosomas, todas ellas funciones elementales para el correcto funcionamiento neuronal (Bernabò et al., 2017). Apoyando esta hipótesis, se ha observado que: **i)** se han descrito numerosas proteínas ribosomales dentro del interactoma de SMN; **ii)** en el nucléolo, SMN interactúa con U3 snoRNA, implicado en el procesamiento del rRNA, y; **iii)** muchos de los RNA cuya transcripción está alterada en la SMA están implicados en la biogénesis de ribosomas (Bernabò et al., 2017). Por lo tanto, es posible que los niveles reducidos de SMN impidan una correcta producción de ribosomas, por alteraciones directas o indirectas de las proteínas ribosomales que confieren especificidad de función a los ribosomas, induciendo así cambios en la regulación de la traducción de mRNAs axonales (Bernabò et al., 2017). Esta interpretación es consistente con recientes resultados de biología celular que demuestran la existencia de cromatolisis, con disociación y pérdida de los polirribosomas de las membranas del REG, en MN de modelos murinos de SMA (Tapia et al., 2017). Es decir, el déficit de SMN, que da lugar a la pérdida y desestructuración de CBs, a su vez induce alteraciones de diversa índole en el nucléolo, que finalmente, conducen a una alteración de la maquinaria de síntesis proteica (Tapia et al., 2017).

En efecto, la pérdida de SMN conlleva la alteración de numerosos transcritos relacionados con la traducción, incluyendo proteínas ribosomales y factores de iniciación y elongación de la traducción, desde estadios tempranos de la enfermedad, con la consecuente alteración de la biología ribosomal. Al demostrar que estas alteraciones son autónomas de las MN y que pueden revertirse con terapia ASO (incremento de niveles de SMN), se ha propuesto que los defectos de la traducción y la biología ribosomal son elementos distintivos de la patogenia de la SMA. Además, estos hallazgos apoyan la función de SMN en el transporte de mRNA y elementos de la maquinaria de traducción (Bernabò et al., 2017).

8 PATOGENIA DE LA SMA: ALTERACIONES DE LA UNIÓN NEUROMUSCULAR Y DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS

Aunque cada vez existan más datos de la afectación de tejidos periféricos en la SMA, lo cierto es que la característica fundamental de la patogenia de esta enfermedad continúa siendo la disfunción del sistema motor (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Pero ¿depende esta disfunción únicamente de la muerte de las MN? Lo cierto es que en la SMA existen cambios tanto a nivel del SNC (sinapsis en somas y dendritas de las MN) como del SNP (UNM), además de en tejidos no neuronales.

Se ha propuesto la alteración en etapas tempranas del desarrollo, previamente a la pérdida de MN, en las conexiones interneuronales en el circuito sensitivo-motor, como determinante principal de la disfunción de las MN (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Doktor et al., 2017). Aunque la disfunción del sistema motor continúa siendo un aspecto clave de la patogenia de la enfermedad, podrían existir eventos previos a la pérdida de MN relacionados con la formación de redes interneuronales ineficientes y conexiones sinápticas anómalas sobre estas células, que lleven a su degeneración (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Varios datos apoyan esta hipótesis. Primero, se ha descrito en modelos murinos que las MN en la SMA reciben un menor número de sinapsis propioceptivas excitatorias, hecho que podría explicar el desarrollo de propiedades de disparo anómalas y mayor excitabilidad, de forma reactiva (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Segundo, existen otras evidencias experimentales a favor de esta hipótesis, a saber: **i)** en modelos de *Drosophila* de SMA, la restitución de los niveles de SMN en interneuronas excitadoras y propioceptivas corrige el fenotipo, no así su expresión en MN y músculo (Tisdale & Pellizzoni, 2015); **ii)** la retención de intrones U12 parece ser mayor en neuronas propioceptivas que en MN, con niveles más reducidos de mRNA de *Stasimon* siguiendo el mismo patrón (Lotti et al., 2012), y; **iii)** la expresión selectiva de SMN en MN consigue alargar la supervivencia en modelos celulares de MN SMA, pero no tiene gran repercusión sobre la esperanza de vida de los animales (Gavrilina et al., 2008; Tisdale & Pellizzoni, 2015).

En modelos murinos, se ha demostrado que existe un momento de transición de un estado de dependencia de SMN a uno posterior de relativa insensibilidad a la SMN en cuanto a las propiedades de neurotransmisión en las UNM, en torno al periodo postnatal P12-P15. Este momento coincide con el punto en el que las UNM se constituyen como sinapsis maduras. Se ha demostrado que la proteína

SMN es necesaria en la regulación y mantenimiento del sistema neuromuscular, al observarse necesidades incrementadas de SMN tras inducir daño en las UNM; es decir, SMN es necesaria para la reparación, mantenimiento y formación de sinapsis neuromusculares adultas (Govoni et al., 2017). Niveles reducidos de SMN se asocian con acumulación de proteínas de los neurofilamentos en las placas motoras, menor arborización neuronal, localización anormal de vesículas sinápticas, UNMs inmaduras y alteración en la neurotransmisión, probablemente consecuencia de una regulación anómala de la dinámica del citoesqueleto (Singh et al., 2017). Se ha propuesto que SMN podría participar, al menos en parte, a través de la regulación de la homeostasis de la ubiquitina en el desarrollo y mantenimiento de los conos de crecimiento, axones y UNM (Bernabò et al., 2017).

El déficit de SMN afecta a la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina en neuritas y conos de crecimiento axonales. Cabe destacar que, aunque parece que la SMN participa en el transporte del mRNA de la β-actina, tal y como demuestra su concentración y expresión reducida en el terminal axónico en modelos murinos de SMA, la deleción de la β-actina no induce el fenotipo de la enfermedad (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Singh et al., 2017). Se ha descrito un descenso de los niveles de Plastina3 junto a un incremento de Profilina2a previos al comienzo sintomático de la enfermedad, que sugiere que la alteración de la regulación del metabolismo de la actina precede y es un probable mediador de la degeneración de las MN (Singh et al., 2017). La regulación anómala de la vía dependiente de las interacciones SMN-ROCK-Profilina2a conduce a un importante deterioro en la integridad neuronal, y a la neurodegeneración (Singh et al., 2017). En modelos murinos de fenotipo intermedio de SMA, el déficit de SMN se asocia a una mayor activación de la vía RhoA/ROCK, y su inhibición farmacológica logra mejorar el desarrollo de las UNM, tamaño de las miofibras y alargar la supervivencia del ratón, pero no así de sus MN (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

En relación con su función en dendritas, sinapsis y axones como parte de complejos mRNP en el transporte de mRNA (Bernabò et al., 2017), el déficit de SMN altera el crecimiento de las neuritas y reduce la localización de varios mRNA en los conos de crecimiento (Singh et al., 2017). En modelos murinos de SMA el desarrollo de axones más cortos y conos de crecimiento pequeños con bajos niveles de mRNA de β-actina, asocia una distribución anómala de los canales de calcio voltaje-dependientes ($Ca_V2.2$), con alteración de la homeostasis del calcio intracelular (Tisdale & Pellizzoni, 2015), y las consecuentes alteraciones electrofisiológicas (facilitación ante la estimulación repetitiva con datos de reinervación, y fallos en la neurotransmisión intermitentes en fenotipos intermedios y leves, respectivamente) (Burghes & Beattie, 2009). El resultado son unas UNM anómalas. Si bien su alteración no se relaciona directamente con la severidad del fenotipo, en casos de SMA severos existe una menor liberación de ACh en las UNM, posiblemente secundaria a un *input* anómalo por parte de la propia MN (Burghes & Beattie, 2009). Recientemente, se ha propuesto la alteración de la homeostasis del calcio como mediador de la muerte de las MN, en relación con la hiperactivación de Cdk5 y la disfunción de los terminales axonales. De hecho, diferentes genes implicados en la

homeostasis del calcio contienen varios intrones U12 dependientes (Doktor et al., 2017).

Histológicamente, las alteraciones de la UNM afectan tanto a la región pre- como a la postsináptica. En el primer nivel, se observa acumulación de neurofilamentos y menor número de vesículas sinápticas de ACh; en la membrana postsináptica, la agrupación de receptores de ACh es anómala, la placa motora no desarrolla su morfología ondulada habitual y la transmisión sináptica está alterada (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

Dado que el desarrollo de los músculos depende del trofismo nervioso, las alteraciones morfofuncionales de la UNM conllevan la formación de miofibras más pequeñas, de desarrollo enlentecido, además de datos de denervación muscular (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

En lo que respecta a la sarcómera, se ha documentado una alteración del cambio en la expresión génica de las formas embrionarias de cadenas pesadas de miosina y receptores de acetilcolina en el músculo esquelético de la SMA (Tisdale & Pellizoni, 2015).

Es conocido que el déficit de SMN cursa con una menor capacidad de crecimiento de mioblastos y células satélite, por lo que SMN podría participar en procesos de reparación y crecimiento muscular, pudiendo justificar el menor tamaño de las fibras musculares en la SMA (Gavrilina et al., 2008). Aunque estos datos parezcan sugerir un papel importante de las fibras musculares en la patogenia de la enfermedad, restaurar los niveles de SMN únicamente en el músculo esquelético, y no en las neuronas, no tiene efecto fenotípico ni sobre la supervivencia de modelos murinos (Gavrilina et al, 2008). Se cree que los defectos musculares sí que contribuyen a la atrofia muscular, sugiriendo que la clave en la patogenia es la disfunción neuronal (Tisdale & Pellizoni, 2015).

9 RELACIÓN DE LA SMA CON OTRAS ENFERMEDADES DE LA MOTONEURONA Y NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades que afectan a las MN se caracterizan por tres aspectos básicos: **i)** degeneración y pérdida progresiva y específica de las MN espinales, con la consiguiente disrupción de las redes neuronales y conexiones del sistema nervioso central; **ii)** atrofia del músculo estriado esquelético, y; **iii)** en consecuencia, debilidad muscular, que puede eventualmente conducir a la muerte prematura del paciente. Así, las enfermedades neurodegenerativas son uno de los retos actuales en salud pública, no solo por su potencial desenlace fatal, sino también por ser la base de diferentes patologías, incluyendo las demencias (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Talbot & Tizzano, 2017).

Se han descrito hasta 8 enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la SMA, caracterizadas por la formación de inclusiones intranucleares de la proteína mutada. Entre ellas, la DRPLA (*dentatorubral pallidoluysian atrophy*), la enfermedad de Machado-Joseph, la ataxia cerebelosa, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Comparten varias características: **i)** los CBs se asocian a las inclusiones intranucleares para prevenir su movilidad y

funciones aberrantes, produciendo alteraciones en el splicing del pre-mRNA; **ii)** la acumulación progresiva de daño en el DNA reprime la expresión génica, dando lugar a la disrupción del nucléolo y los CBs, con redistribución de la coilina; y **iii)** activación de respuestas nucleolares de respuesta al estrés (Lafarga et al., 2017; Tapia et al., 2017).

Sin embargo, la relación más destacable es la que guarda con la ***Esclerosis Lateral Amiotrófica*** (*Amiotrophic Lateral Sclerosis,* ***ALS***), presentando ambas como principal característica la degeneración de las MN. A pesar de su carácter poligénico, en contraposición a la SMA, comparten la alteración de las sinapsis y pérdida neuronal progresiva, así como la alteración en genes de expresión ubicua, (SMN en la SMA, y gen de la superóxido dismutasa (*SOD1*), entre otros, en la ALS) (Burghes & Beattie, 2009). Las proteínas FUS, TDP43 y ATXN2, relacionadas con el metabolismo del RNA, y las dos primeras con la prevención del daño del DNA, han sido relacionadas con formas esporádicas y familiares de ALS (Jangi et al., 2017). FUS interacciona con TDP-43 y con el complejo SMN, con ayuda de U1 snRNP; cuando FUS está mutada, secuestra SMN en el citoplasma. Así, provoca cambios en el splicing y reducción de los niveles de snRNAs, y disminuye el número de Gems (Tapia et al., 2017; Jangi et al., 2017). Tanto el número de Gems como los niveles de SMN y snRNAs del espliceosoma menor están muy reducidos en las MN de modelos de ALS y de SMA (Lafarga et al., 2017). Se cree que el mecanismo patogénico común descansa en alteraciones convergentes en el metabolismo del RNA, que incluyen el déficit de SMN, la disrupción de los CBs y la función nucleolar, y el daño en el DNA; siendo la vía final común la degeneración de las MN (Jangi et al., 2017; Tapia et al., 2017). En lo que respecta a la reparación ineficiente del daño del DNA, evento al que es especialmente sensible el sistema nervioso (Jangi et al., 2017), en la ALS la repetición del hexanucleótido G4C2 en el gen *C9ORF72* facilita la formación de R-loops (Jangi et al., 2017), híbridos que también se forman en variantes juveniles de ALS que presentan mutaciones en la senataxina, causando un fenotipo similar al de la SMA (Jangi et al., 2017).

10 DESARROLLO TERAPÉUTICO EN LA SMA

La SMA es la primera enfermedad neurológica en la que se ha podido desarrollar una aproximación terapéutica eficaz, ya autorizada para todos los espectros clínicos de la enfermedad, tanto por la FDA americana como por la EMA europea. Parece paradójico que esta terapia haya sido desarrollada y aprobada en un momento en el que aún se desconocen gran parte de los entresijos de la patogenia de la enfermedad. Si bien es conocido que se trata de una enfermedad monogénica debida al déficit de proteína SMN funcional, aún quedan muchos aspectos acerca de cuáles son sus funciones y cómo se ven afectadas. Igualmente, es necesario profundizar en los acontecimientos inducidos por el déficit de SMN y la posible participación de factores modificadores, tanto positivos como negativos, que llevan al fenotipo último de cada paciente, dando lugar al espectro clínico continuo de la SMA. Aún hay que valorar la eficacia, seguridad y la forma de administración de las diferentes terapias antes de establecerlas como definitivas, y es necesario desarrollar mejores herramientas para medir los resultados de las mismas (biomarcadores, test funcionales para

puntuar los hitos de desarrollo motor logrados), así como escalas de valoración pronóstica (Govoni et al., 2017).

En cualquier caso, puesto que sí es conocido que es el déficit de SMN el punto de partida, las primeras aproximaciones terapéuticas se han diseñado con el objetivo de incrementar o restaurar sus niveles, mediante diferentes estrategias. Las más clásicas, o ***terapias SMN dependientes***, se basan en la hipótesis de que, si la base fundamental de la patogenia de la SMA es el déficit de proteína SMN, cabe suponer que restaurar sus niveles funcionales normales podrá corregir el fenotipo de los pacientes. Sin embargo, aunque su razonamiento parezca completamente lógico y hayan logrado resultados asombrosos en comparación con la alternativa, la evolución natural de la enfermedad, lo cierto es que no están exentas de limitaciones. Para complementarlas y solventar algunas de sus limitaciones, se desarrollaron las ***terapias SMN independientes***, centradas fundamentalmente en intentar mantener la integridad neuromuscular y la función motora a lo largo de toda la vida del individuo, centrándose en rutas moleculares y celulares alteradas en la fase crónica de la enfermedad.

El régimen de tratamiento óptimo será aquel que logre alcanzar, de la forma menos invasiva posible, todos los tejidos relevantes en la patogenia de la enfermedad. En este sentido, cada vez se recopilan más evidencias que ponen de manifiesto la SMA como una enfermedad sistémica, predominante pero no exclusiva de las MN, un aspecto fundamental a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas terapias y la optimización de las existentes.

10.1 Estrategias clásicas dependientes de SMN: amplificación de la proteína

Todos los pacientes presentan al menos una copia del gen hipomórfico *SMN2*, el principal modificador del fenotipo de la enfermedad, cuyo número de copias se relaciona inversamente con la severidad del fenotipo (Govoni et al. 2017). Por ello, las terapias "clásicas" han dirigido sus esfuerzos a incrementar la expresión de SMN funcional a partir de este gen, efecto que puede lograrse mediante **i)** activación de *enhancers* de los promotores; **ii)** incremento de la inclusión del exón 7; **iii)** estabilización del mRNA y/o la proteína SMN, y; **iv)** con terapia génica (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Actualmente, esta estrategia aspira a reducir la severidad de la enfermedad más que a curarla como tal. Que el comienzo de la enfermedad tiene lugar ya *in utero* es bien conocido, por lo que una de las limitaciones principales de la terapia de amplificación de SMN, en especial para las formas de inicio insidioso, es que para ser completamente efectiva, debería administrarse lo más temprano posible. Así, en tanto que estas terapias no puedan administrarse de forma presintomática y eficiente en las MN, cuando la disfunción de las MN aún puede ser reversible, probablemente solo se conseguirá enlentecer, pero no frenar, la neurodegeneración. Por lo tanto, su beneficio potencial se ve reducido sin la instauración de un programa de cribado en recién nacidos, especialmente en las formas más leves o intermedias, cuyo diagnóstico puede verse retrasado. Esta limitación podría solucionarse mediante el desarrollo de estrategias terapéuticas complementarias no dependientes de SMN, centradas en mejorar la función neuromuscular y mantener la calidad de vida de los pacientes (Bowerman et al., 2017; Talbot & Tizzano, 2017).

Las primeras aproximaciones desarrolladas con este objetivo que han logrado entrar en fase de ensayo clínico han sido dos: **i) *Nusinersen/Spinraza®,*** desarrollado por *Ionis Pharmaceuticals* y *Biogen*, un oligonucleótido antisentido (*antisense oligonucleotide, ASO*) que favorece la inclusión del exón 7 en el splicing alternativo de *SMN2*, y; **ii) *AAV9-SMN1***, un vector vírico adenoasociado no replicante que vehiculiza una copia del gen humano funcional *SMN1*, desarrollado mediante terapia génica por *AveXis* (Bowerman et al., 2017).

10.1.1 Oligonucleótidos antisentido (ASOs)

Un ASO está formado por cadenas sintéticas cortas de nucleótidos con la capacidad para unirse de forma selectiva y modificar la expresión génica de un RNA diana. Nusinersen (antes denominado ISI–SMN_{RX}), es un 2'O-metoxietil oligonucleótido antisentido modificado, diseñado por *Biogen* e *Ionis Pharmaceuticals*, que tras los resultados obtenidos en sus ensayos clínicos de fase 2 y 3 (NURTURE, EMBRACE, ENDEAR y CHERISH) ha sido aprobado en diciembre de 2016 por la FDA americana y en junio de 2017 por la EMA europea como tratamiento para todos los tipos de SMA. También ha sido aprobado en Brasil, Japón y Canadá. Actualmente, la comunidad científica se mantiene a la espera de resultados de los ensayos en fase 3 en una cohorte más amplia (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Bowerman et al., 2017; Govoni et al., 2017).

Nusinersen está diseñado para unirse al pre-mRNA del gen *SMN2* e inhibir el silenciador del *splicing* (*intronic splicing silencer* o ISS-N1) situado en el intrón 7, responsable de la exclusión del exón 7 en este transcrito. Al unirse a ISS-N1, el ASO desplaza los factores represores del *splicing* hnRNPA1 y A2, promoviendo la inclusión del exón 7 gracias a U1 snRNP. El resultado es la producción de un transcrito codificante de la proteína SMN de longitud completa, estable y funcional (Talbot & Tizzano, 2017).

La primera limitación es de tipo técnico; al requerir administración intratecal, debido a su baja capacidad de difusión a través de la barrera hematoencefálica (BHE), y no solo una si no múltiples administraciones periódicas, Nusinersen requiere unas instalaciones, condiciones de administración y recursos concretos que suponen un gasto no desdeñable. A ello se suma la incomodidad para los pacientes asociada a la necesidad de recibir múltiples punciones lumbares separadas por periodos de tiempo relativamente cortos, que además, podrían no ser posibles en casos de fenotipos leves, diagnosticados en la edad adulta, si éstos hubiesen requerido cirugías de corrección en la columna para prevenir o tratar la escoliosis (Talbot & Tizzano, 2017; Bowerman et al., 2017).

La segunda limitación también se relaciona con la vía de administración. Aunque esta vía asegure el rescate de los niveles de SMN en las MN, implica la imposibilidad del fármaco de distribuirse sistémicamente. Aún no existen datos suficientes sobre las consecuencias del desarrollo con bajos niveles de SMN en los tejidos periféricos, dada la escasa esperanza de vida de los pacientes con SMA tipo I, que, al presentar los niveles más bajos de SMN, son probablemente los que asocien más problemas. Así, mientras hasta ahora la corta supervivencia no daba lugar al desarrollo de complicaciones no neurológicas, el establecimiento de la terapia amplificadora con Nusinersen podría significar la aparición de déficits funcionales adicionales aún desconocidos, que

oscurecerían el pronóstico y complicarían la evolución de los pacientes tratados a pesar de los grandes beneficios obtenidos a nivel motor y de supervivencia. Se espera que estos efectos deletéreos adicionales asociados al déficit de SMN periférica ocurran sobre todo a nivel de la unión neuromuscular y el músculo esquelético, pero también podrían darse a nivel cardiovascular, gastrointestinal e inmunitario (Talbot & Tizzano, 2017).

Los ASOs pueden vehiculizarse en forma de PMO (*phosphorodiamidate morpholino*) con CPPS (*cell–penetrating peptides*), capaces de penetrar la membrana plasmática y endosómica. El compuesto así desarrollado se denomina **Pip6a-PMO** (*Peptide nucleic acids/PMO internalization peptide 6a*) y ha logrado modular el *splicing* en varios tejidos periféricos de modelos murinos. Si se conjuga Pip6a-PMO con el ISS-N1 SMN2 PMO se logran grandes mejorías en supervivencia y fenotipo neuromuscular, con mayores niveles de SMN de longitud completa tanto en el SNC como en los tejidos periféricos. Este compuesto se administraría de forma intravenosa en monodosis, lo que también solventaría los problemas técnicos asociados a Nusinersen. Así, los CPPS tienen gran potencial como facilitadores de la administración sistémica teniendo por diana SMN, y eventualmente, de terapias no SMN (Bowerman et al., 2017).

Pero quizá la limitación que supone mayores retos en cuanto a su resolución está relacionada no tanto con cómo administrar el fármaco, sino con cuál es el momento idóneo para hacerlo y cómo detectarlo, una limitación presente para todas las estrategias dependientes de SMN, que es la base del desarrollo de las terapias complementarias. Así, en modelos preclínicos murinos se ha descrito un periodo de "***ventana terapéutica***" durante el desarrollo neuromuscular, en la que incrementar los niveles de SMN es efectivo, pero tras la cual este beneficio no puede asegurarse. Es fácil deducir que cuanto antes se instaure el tratamiento, mejores resultados y mayor beneficio se obtendrá, si bien puede ser inevitable partir de una pérdida irreversible de función motora ya establecida al momento del diagnóstico. Esta instauración temprana de la terapia podría ser sencilla en los pacientes con SMA tipo I, de evolución subaguda, pero no lo sería tanto en los tipo II-IV, de comienzo más insidioso y tardío (Talbot & Tizzano, 2017).

Finalmente, es importante destacar que aún se conoce poco sobre los efectos de la terapia ASO en los defectos del splicing en la SMA, sobre todo en lo que respecta a la retención intrónica; sin embargo, esta terapia ofrece la posibilidad de estudiar el efecto del incremento postnatal de SMN para diferenciarlos de los cambios derivados del retraso del desarrollo durante la embriogénesis (Doktor et al., 2017).

10.1.2 Terapia Génica

La SMA se considera una candidata óptima para técnicas de terapia génica por varios motivos: **i)** sin tratamiento, es una enfermedad fatal; **ii)** existen una diana genética y celular concretas (gen *SMN1* y MN del asta anterior); **iii)** la sobreexpresión de SMN en tejidos periféricos es bien tolerada, por lo que la toxicidad esperable es mínima; **iv)** existen modelos animales y celulares bien desarrollados para realizar estudios preclínicos; **v)** la longitud del cDNA de *SMN* es apropiada para los vectores, y; **vi)** son posibles estrategias destinadas a

modular el splicing de *SMN2* para incrementar los niveles de SMN (Govoni et al., 2017).

La terapia génica en el tratamiento de la SMA provee de forma exógena de una copia del gen *SMN1* humano, vehiculizado a través de un vector viral. El vector **AAV9–*SMN1*** ha sido desarrollado por *AveXis*; es un serotipo 9 adenoasociado autocomplementario (scAAV9) cuyo objetivo es lograr la sustitución funcional del gen *SMN1* mutado (Bowerman et al., 2017). En modelos murinos ha inducido la expresión de SMN tanto en motoneuronas como en tejidos periféricos, con la corrección casi completa del fenotipo. Aunque todavía no ha sido aprobado como tratamiento de la SMA, ha sido testado en ensayos de fase 1 y 2 en pacientes con SMA tipo I, con administración intravenosa del scAAV9 AVXS-101 en pacientes con una edad media de 3 meses. Estos estudios objetivaron una seguridad y tolerancia favorables para AVXS-101, logrando mejora en la puntuación en la escala CHOP-INTEND y un alcance de hitos de desarrollo neuromuscular mayor y más rápido, en comparación a la evolución natural de la enfermedad (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Govoni et al., 2017).

La principal ventaja de AAV9-SMN1 es que sólo precisa de una única dosis vía intravenosa, al presentar buena difusión a través de la barrera hematoencefálica, lo que implica mayor comodidad en la administración y menos requisitos técnicos. Además, permite el acceso del vector no solo al SNC sino también a los tejidos periféricos (Bowerman et al., 2017). Así, se convierte en una alternativa terapéutica dependiente de SMN pero centrada no en el modificador *SMN2* si no en el responsable de la enfermedad, *SMN1*, con el objetivo de restaurar el gen humano funcional a nivel global.

Las principales limitaciones del vector de AveXis son tres: **i)** por un lado, al tratarse de un potencial antígeno vírico es probable que, si existiese la necesidad de un número de dosis mayor en la fase clínica, los pacientes desarrollasen inmunogenicidad; **ii)** su administración sistémica está condicionada por la capacidad de difusión al SNC, que es mayor en los primeros meses de vida al ser entonces la BHE más permeable (Govoni et al., 2017), y; **iii)** por otra parte, además de la necesidad de demostrar aún su eficacia y toxicidad en los ensayos actualmente en curso, si finalmente se aprobase como tratamiento cabe la posibilidad de que no sea posible asegurar la producción a gran escala del vector (Tisdale & Pellizzoni, 2015). Habría que evaluar la actividad de las vías dependientes de SMN en modelos de iPSCs derivadas de MN, modelos de BHE *in vitro* y otros tipos celulares, para valorar mejor la actividad y eficiencia específica en diferentes células, que a su vez podría facilitar la optimización de los regímenes de dosificación (Bowerman et al., 2017).

En las dos terapias mencionadas existe el riesgo de que el rescate de los niveles de SMN sea incompleto en los tejidos periféricos. En el primero por su administración dentro del SNC y, en el segundo, por el riesgo de inmunogenicidad si se administran varias dosis, lo que significa potencial riesgo de desarrollo de patologías externas al SNC más adelante.

10.1.3 Otras terapias dependientes de SMN

Una serie de “moléculas pequeñas”, de administración por vía oral y centradas en incrementar la expresión de *FL SMN2* están siendo desarrolladas actualmente por *Novartis Pharmaceuticals* y *Hoffmann-La Roche* (Bowerman et al., 2017). Al igual que en el caso de la terapia génica, su principal ventaja frente a Nusinersen es la mayor facilidad de su administración, con menos, si no nulos, requisitos técnicos, y el hecho de que permita su distribución a nivel sistémico. Sin embargo, su actividad ha sido valorada únicamente en modelos murinos y celulares de fibroblastos derivados de pacientes con fenotipos severos de la enfermedad, y su mecanismo de acción no es completamente conocido, por lo que podrían existir dianas no deseadas, siendo posible que su paso a través de la BHE esté limitado (Bowerman et al., 2017).

10.2 Estrategias terapéuticas independientes de SMN

Aunque diversas vías no dependientes de SMN y dianas moleculares han sido destacadas en la patología de SMA por su regulación alterada en la enfermedad, su potencial terapéutico aún está lejos de incluirse en el panorama de los ensayos clínicos, a diferencia de las terapias clásicas. Dado que tratan de complementar a las terapias clásicas en las fases tardías de la enfermedad, cuando se hacen más relevantes las consecuencias del déficit de SMN en tejidos no neuronales, pueden ser clasificadas en aquellas que mantienen su diana en el SNC y aquellas que la fijan fuera de éste.

10.2.1 Terapias independientes de SMN que mantienen su diana en el SNC

Olesoxime, desarrollada mediante la cooperación entre *Roche* y *Trophos*, es actualmente el único fármaco independiente de SMN que está siendo evaluado en un ensayo de fase 2 en la fase crónica de la SMA en pacientes tipo II y III, en los que ha conseguido mantener la función motora y reducir los eventos adversos relacionados con la evolución de la enfermedad. Se trata de un compuesto similar al colesterol, de administración oral, con efecto neuroprotector. Inicialmente estudiado en modelos murinos de ALS, Olesoxime estabiliza la membrana mitocondrial externa, ayudando a preservar su integridad ante situaciones de estrés oxidativo. Sin embargo, solo ha conseguido demostrar efectos estabilizadores considerando objetivos secundarios de tratamiento, no primarios (Bowerman et al., 2017; Govoni et al., 2017). Es considerado un medicamento huérfano tanto por la FDA como por la EMA (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

10.2.2 Terapias independientes de SMN que fijan su diana fuera del SNC

Aunque las motoneuronas son la principal diana de la enfermedad, otras células y tejidos pueden tener alteraciones clínicas y/o subclínicas. Existe una amplia base de datos que confirma que la SMA no es una enfermedad limitada a las motoneuronas, sino que también afecta a otros tejidos, entre ellos el músculo esquelético, páncreas, hígado, bazo, corazón y células de Schwann. Por ello, terapias que solo estén dirigidas al sistema nervioso podrían ser insuficientes a largo plazo, sobre todo en los pacientes con SMA tipo I, en los que el déficit de

SMN es más acusado y sus efectos más allá de la infancia son aún poco conocidos (Bowerman et al., 2017). Es decir, es necesario continuar la investigación sobre los cambios fisiopatológicos que acontecen tanto en las motoneuronas como en otros tejidos, para poder desarrollar terapias complementarias a las centradas en SMN y el SNC.

Entre estas estrategias, las únicas aproximaciones que están siendo actualmente investigadas en ensayos clínicos son aquellas con dianas musculares.

La primera de ellas, ***CK-2127107*** (CK-107), es una droga desarrollada por *Cytokinetics Inc*., actualmente en ensayo clínico de fase 2 en pacientes con SMA. CK-2127107 es un activador de la troponina esquelética, distribuida de forma anómala en el músculo de pacientes con SMA, que ralentiza la liberación de calcio en las fibras musculares rápidas, mejorando la función muscular. Aunque no presenta una ventana terapéutica concreta, sí que requiere cierto grado de funcionalidad muscular (Govoni et al., 2017). Inicialmente se ensayó en fases preclínica y 1 como fármaco para la insuficiencia cardíaca, atribuyéndole un efecto como potenciador de la función y resistencia de los cardiomiocitos frente al ejercicio, además de en modelos murinos de diferentes miopatías, como la *miastenia gravis* o la ALS, en los que demostró una importante ganancia en fuerza muscular. Ha sido aprobado recientemente como medicamento huérfano para la SMA por la FDA americana (Bowerman et al., 2017).

Otra diana muscular que se encuentra en estudio es la vía ***miostatina-folistatina***; la miostatina es un regulador negativo del crecimiento muscular, inhibido por la folistatina. Esta vía ha intentado modificarse utilizando diferentes aproximaciones que buscaban inhibir la miostatina, bien a través de la sobreexpresión génica de folistatina, bien con inhibidores del receptor promotor de miostatina (ActRIIB-Fc), o bien mediante deleción del gen de miostatina, así como con vectores virales AAV2/8 codificantes de una forma soluble de ActRIIB. El hecho de que únicamente las aproximaciones primera y última demostraran beneficios en cuanto a masa muscular, si bien estas discrepancias podrían deberse a diferencias entre los modelos experimentales utilizados y sus diseños, y el reciente descubrimiento en biopsias de pacientes con SMA de bajos niveles de miostatina y elevados de folistatina, explican que aún no se haya llevado la investigación de esta vía a ensayos clínicos de SMA, aunque sí en diversas patologías musculares como la Distrofia Muscular de Duchenne y/o de Becker (Bowerman et al., 2017).

10.3 Potenciales dianas terapéuticas: vías modificadoras del fenotipo

Los estudios de PTEN, RhoA-ROCK y plastin 3 han situado las terapias moduladoras de actina como potenciales dianas para el desarrollo de terapias de SMA (Bowerman et al., 2017).

La vía RhoA-ROCK está compuesta por la GTPasa RhoA y su efectora serintreonín quinasa ROCK, fundamental en la dinámica de la actina. Se ha observado que esta vía es hiperfuncionante en las neuronas y el músculo esquelético de modelos murinos de SMA, dando lugar a la hiperfosforilación y consecuente estimulación de PTEN (supresor tumoral) por ROCK, con un efecto

negativo en la supervivencia neuronal. Tanto la inhibición farmacológica de ROCK como la supresión de PTEN mediante terapia génica en ratones logra mejorar la esperanza de vida de los animales, convirtiendo la modulación de la vía RhoA-ROCK en una potencial diana terapéutica interesante (Bowerman et al., 2017).

Por su parte, Plastina3 es una proteína de unión a F-actina estabilizadora del citoesqueleto, propuesta recientemente como factor protector frente a la SMA por varios motivos: **i)** SMN y Plastina3 interactúan (Burghes & Beattie, 2009); **ii)** Plastina3 se encuentra en cantidades mayores en hermanos asintomáticos de pacientes de SMA, aun compartiendo el mismo genotipo (Tisdale & Pellizzoni, 2015); **iii)** la sobreexpresión de Plastina3 en modelos murinos retrasa la degeneración axonal, mejora la función de la UNM y la supervivencia de los animales, y en modelos de pez cebra rescata las alteraciones morfológicas axonales (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Bowerman et al., 2017); **iv)** aunque en modelos murinos severos de SMA la sobreexpresión de Plastina3 no logra mejorar significativamente la supervivencia ni función motora, sí que se observa un mayor número de *inputs* propioceptivos en las MN, mayor agrupación de receptores post-sinápticos de ACh y mayor tamaño de la placa motora, por lo que se asocia a mejoría en la formación y función de las UNM (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Singh et al., 2017); **v)** en modelos murinos de severidad intermedia, la sobreexpresión de Plastina3 sí que logra un importante incremento de la supervivencia, además de la función y arquitectura de las UNM (Singh et al., 2017), y ; **vi)** Plastina3 influye en la endocitosis a través de su interacción con proteínas de unión a actina, y su sobreexpresión restaura los procesos de endocitosis alterados por el déficit de SMN (Singh et al., 2017). Sin embargo, la relación entre PLS3 y SMN es compleja, y este efecto beneficioso no ha podido demostrarse aún en todos los modelos *in vivo* ni *in vitro* (Tisdale & Pellizzoni, 2015; Bowerman et al., 2017).

La ***condrolectina*** es una proteína transmembrana codificada por *Chodl*, un gen cuya expresión es fundamental para el funcionamiento adecuado de las MN (Oriol et al., 2017), capaz de modificar la integridad axonal en modelos murinos de SMA, en los que su expresión está alterada en la médula espinal. El efecto que tendría incrementar la expresión de *Chodl* en estos modelos está actualmente en estudio (Bowerman et al., 2017).

La ciclina dependiente de quinasa ***Cdk5*** se ha encontrado hiperfuncionante en modelos *in vitro* con células iPSC derivadas de MN SMA, así como en modelos murinos *in vivo*, llevando a la hiperfosforilación consecuente de la proteína Tau neuronal. Tanto el hecho de que Cdk5 sea un sustrato del espliceosoma menor, como la demostración mediante modelos murinos SMA *knockout* para Cdk5 de mejoría en la patología sináptica, supervivencia de las MN y denervación de unidades motoras, sitúan a esta ciclina como potencial efectora de la fisiopatología de la SMA con interés terapéutico (Bowerman et al., 2017).

Una de las funciones perdidas de SMN es la reguladora en la homeostasis de ubiquitina. ***Uba1*** es una enzima activadora *ubiquitin-like* con varios efectores *downstream*, entre los que encontramos la β-catenina. Se han encontrado niveles reducidos en todos los tejidos de modelos murinos SMA con acumulación de β-catenina en el tejido neuromuscular. La inhibición farmacológica de β-

catenina consigue mejorar el fenotipo en modelos de pez cebra, *Drosophila* y ratones. En estos últimos, la terapia génica con Uba1 ha logrado también aumentar la supervivencia, por lo que esta vía podría ser interesante a nivel terapéutico (Bowerman et al., 2017).

10.4 La ventana terapéutica

Como se ha destacado en numerosas ocasiones a lo largo de este trabajo, la SMA no puede catalogarse exclusivamente como una enfermedad neurodegenerativa de la MN, pues un importante aspecto de su patología comienza en el neurodesarrollo y existen evidencias cada vez más sólidas sobre la implicación de tejidos no neuronales. La consecuencia más evidente del primer hecho es que instaurar el tratamiento en las fases sintomáticas de la enfermedad implica inevitablemente que ya exista una pérdida establecida de un número variable de motoneuronas (Talbot & Tizzano, 2017). El estudio Nurture ha demostrado que, iniciando el tratamiento en estadios tempranos presintomáticos, es decir, cuando las MN aún están vivas, permite que éstas regeneren sus axones y las sinapsis neuromusculares, logrando un rescate funcional completo de los defectos ya presentes durante el desarrollo fetal. Es decir, el tratamiento precoz puede detener la degeneración de las MN (Govoni et al., 2017). Además, no hay que olvidar que, aunque la mayor parte de la neurodegeneración ocurre en los primeros meses de vida, y en adultos la neurotransmisión en las UNM no dependa de los niveles de SMN, parece que sí es un factor necesario para el mantenimiento de las UNM y la regeneración muscular durante la vida adulta (Govoni et al., 2017).

Por lo tanto, es fundamental centrar los esfuerzos en **i)** terminar de definir el periodo de ***ventana terapéutica*** para cada tipo de SMA, que asegure la intervención terapéutica cuando aún existen suficientes MN; **ii)** implementar un programa de cribado genético neonatal que permita instaurar el tratamiento en este periodo, y; **iii)** definir si las necesidades de SMN cambian a lo largo de la vida adulta y/o si son influenciadas por otros factores, y en ese caso, plantear una estrategia terapéutica específica para fases tardías (Govoni et al., 2017).

En los pacientes con SMA tipo I, más del 95% de las unidades motoras se pierden en los primeros 6 meses de vida, con un deterioro funcional motor paralelo al descenso en la amplitud de los potenciales de acción motores (CMAPs); además, un porcentaje variable de las MN supervivientes muestran signos de apoptosis. En base a los datos electrofisiológicos y autópsicos, la ventana terapéutica óptima para la forma más grave y frecuente de SMA es el primer mes de vida, mejor aún durante la primera semana postnatal, antes de que comience el daño y/o pérdida de las MN. Aunque sigue existiendo beneficio cuando la terapia se administra en los primeros 3 meses de vida, a partir de ese momento la intervención sólo logra resultados subóptimos (Govoni et al., 2017). En los pacientes con SMA tipo II y III, sin embargo, los datos electrofisiológicos pre- y postsintomáticos, así como autópsicos, son limitados. Sí se ha observado que mantienen una función motora estable hasta el año de vida, comenzando el declive a partir de esa edad (Govoni et al., 2017). Tanto por este hecho como por lo mencionado previamente en relación con la SMA tipo I, probablemente el mejor momento para comenzar la terapia sea antes de los 12 meses y/o preferentemente, en los primeros 3 meses de vida. Sin embargo, aún no se ha

definido una ventana terapéutica para estos fenotipos de SMA, y no hay que olvidar que la SMN continúa siendo importante para las MN adultas, si bien con funciones diferentes a las que cumple durante el neurodesarrollo (crecimiento dendrítico y axonal y sinaptogénesis de las UNM frente a su participación en el metabolismo del RNA y el turnover de la actina en las UNM). Este último hecho podría justificar el desarrollo de un plan terapeútico diferente en la SMA tipo I con respecto a la II y III, pues éstas podrían beneficiarse en mayor medida de terapias no dependientes de SMN en la vida adulta y/o necesitar una segunda fase de terapia SMN dependiente durante la misma.

Parece que la instauración de un cribado universal es el siguiente paso lógico una vez las terapias estén disponibles para toda la población. La detección precoz permitirá que los pacientes accedan a terapias ya aprobadas o que sean incluidos en ensayos clínicos en marcha. Además, permitirá planificar los cuidados médicos destinados a prevenir complicaciones posibles, reduciendo costes médicos y mejorando la calidad de vida de los pacientes, así como educar a las familias sobre el cuidado del recién nacido y proporcionarles consejo genético para futura descendencia (Govoni et al., 2017). Técnicamente, determinar si un recién nacido presenta una mutación o deleción en *SMN1* es perfectamente viable actualmente; incluso podría plantearse un segundo paso cuando exista una alteración en *SMN1*, en el que se determinaría el número de copias de *SMN2* del paciente para tratar de predecir así su fenotipo (Talbot & Tizzano, 2017). Sin embargo, como ya se ha mencionado, lo cierto es que el fenotipo final de los pacientes con SMA no es dependiente exclusivamente del número de copias de *SMN2,* por lo que este segundo paso no es recomendable, y además, no modificaría el tratamiento a instaurar. Por otro lado, aunque la detección temprana de los casos significa beneficios obvios para el pronóstico del recién nacido, hay que tener en cuenta el significado de encontrar un portador: no es posible predecir cómo afectará al desarrollo psicológico del individuo o a su futura planificación familiar, pero es probable que, a largo plazo, la incidencia de la enfermedad se viese reducida al acudir éstos a técnicas de diagnóstico prenatal o preimplantacionales (Talbot & Tizzano, 2017).

Finalmente, atendiendo al diferente requisito temporal de SMN durante el desarrollo embrionario, cuando es necesaria para la formación adecuada del sistema neuromuscular, frente a la vida adulta, cuando participa en el mantenimiento de las MN, UNM y FMEE, se podría plantear un modelo terapéutico en el que tras una administración postnatal temprana que incremente los niveles de SMN, se pase a una etapa posterior, en la vida adulta, en la que se reintroduciría la terapia acorde a necesidades específicas en esta fase, como respuesta al propio envejecimiento o a daños intercurrentes (Govoni et al., 2017).

11 PERSPECTIVAS DE FUTURO EN LA SMA

La SMA está bien definida si la comparamos con otras enfermedades neurodegenerativas, pero sigue siendo un área fértil de investigación con numerosos frentes abiertos y dudas por resolver. Es importante acabar de definir el amplio espectro de funciones de SMN, los requisitos espaciales y temporales de la proteína, y los procesos celulares alterados ante su déficit que determinan en última instancia el fenotipo (Tisdale & Pellizzoni, 2015).

La función chaperona de SMN en el ensamblaje de snRNPs es la mejor caracterizada hasta la fecha, haciéndola fundamental para la génesis de la maquinaria de splicing. Se ha documentado una regulación temporal específica en la médula espinal durante el desarrollo de la biogénesis de snRNPs, diferente con respecto a otros tejidos (Cauchi, 2010); además, las anormalidades del splicing descritas en la SMA ocurren desde fases iniciales, aunque predominen en estadios tardíos de la enfermedad (Zhang et al., 2008; Bäumer et al., 2009). Es posible que el papel esencial de SMN en la supervivencia celular esté relacionado con el splicing de uno o varios genes fundamentales en el desarrollo del SNC, que junto al déficit de SMN en un momento en el que la necesidad de biogénesis de snRNPs es más alta, explicaría la gran pérdida de población de MN en la fase aguda de la enfermedad. En fases posteriores, predominaría la afectación global del splicing que ocurre de forma secundaria, dando lugar a la disfunción del sistema motor (que a su vez, depende del adecuado desarrollo de los circuitos neuronales, no solo del número de MN supervivientes). Es decir, en la fase aguda de la enfermedad, el déficit de SMN sería responsable de la mayor vulnerabilidad de las MN al suponer alteraciones del splicing de uno o varios transcritos esenciales para la supervivencia de las MN, mientras que en la fase crónica las MN supervivientes y las demás células de la médula espinal desarrollarían las consecuencias del déficit crónico de SMN en el metabolismo del RNA, y en última instancia, la disfunción celular responsable del fenotipo. Por lo tanto, quedaría por definir cuál es el transcrito o grupo de ellos necesarios para la supervivencia celular, y cuáles son exactamente las rutas del metabolismo del RNA afectadas en fases ulteriores. Particularmente, en la fase crónica de la enfermedad es fundamental considerar las funciones no canónicas de SMN, relacionadas no con la supervivencia, sino con el procesamiento y transporte de mRNAs, regulación de la transcripción y traducción, regulación de la apoptosis y vías de ubiquitinación, maduración neuronal, desarrollo y mantención de las UNM, así como la integridad del disco Z, señalización y transporte nuclear, y procesos de traducción local en la sarcómera, además de otras posibles funciones desconocidas aún en el músculo esquelético (Cauchi, 2010). Todas estas funciones adicionales pueden ser desarrolladas por SMN por sí misma, y no como parte del complejo SMN, igual que las demás proteínas del complejo son capaces de realizar funciones por su cuenta.

Además de las diferentes líneas de investigación dedicadas a la patogenia de la SMA y la caracterización de su proteína protagonista, también se están dedicando importantes esfuerzos a perfeccionar las terapias actualmente disponibles, así como al diseño de otras que las complementen, si bien es cierto que estas últimas avanzan en la medida que le permiten las primeras. Aún hay que valorar la eficacia, seguridad y la forma de administración de las diferentes terapias antes de establecerlas como definitivas, y es necesario desarrollar mejores herramientas para medir los resultados de las mismas (biomarcadores, test funcionales para puntuar los hitos de desarrollo motor logrados), así como escalas de valoración pronósticas. A medida que se van desvelando los mecanismos de la enfermedad, se desarrolla una lista progresivamente mayor de potenciales dianas terapéuticas para la SMA. El objetivo final es desarrollar una terapia combinada, que englobe estrategias dependientes e independientes de SMN, tratando de asegurar la distribución sistémica de la misma y cubrir las necesidades tanto de los tejidos nerviosos como de los periféricos. La evaluación

óptima de la seguridad y eficacia de estos “cocktail” terapéuticos debe realizarse utilizando múltiples modelos tanto *in vivo* como *in vitro* y aproximaciones moleculares, con el objetivo de estudiar el efecto de éstos en diferentes estadios de la enfermedad (Bowerman et al., 2017). Además, mientras se publican resultados cada vez más prometedores de los diferentes ensayos clínicos que están en marcha, se hace más evidente la necesidad de finalizar los mismos, para poder comenzar a comparar la seguridad y eficacia de cada estrategia y optimizar su uso según las características clínicas de cada paciente (Govoni et al., 2017).

Desde su descripción inicial, el manejo de los pacientes con SMA se basaba fundamentalmente en terapias de soporte y cuidados paliativos. Desde el descubrimiento del gen SMN en 1995, avances en diferentes campos de la medicina han supuesto un importante cambio en este respecto. En la última década, los conocimientos sobre cuidados respiratorios, nutricionales, ortopédicos, rehabilitación, y problemática social y emocional han permitido, junto a los avances en terapias ASOs y génica, una aproximación global mejor adaptada a las necesidades de estos pacientes (Kolb & Kissel, 2011). Gracias a los avances en terapias moleculares desarrolladas en los últimos 20 años, en un futuro próximo los clínicos se encontrarán con complicaciones derivadas del envejecimiento de pacientes que hasta no hace tanto, no hubiesen alcanzado esa edad; la ganancia en supervivencia no ha conseguido aún salvar el deterioro neurológico y motor, ineludiblemente asociado al propio envejecimiento y más marcado en estos pacientes (Kolb & Kissel, 2011). Es importante potenciar la función neuromuscular durante la infancia y adolescencia, periodos de la vida en los que tiene lugar el máximo crecimiento esquelético, y en la edad adulta, cuando los procesos degenerativos asociados a la edad comienzan a tener lugar, pudiendo contribuir al deterioro progresivo de la función motora intrínseco a la enfermedad. Actualmente, se está llevando a cabo la revisión y actualización de la guía de manejo clínico publicada en 2007 por Wang y colaboradores, que trataba precisamente de establecer un documento estándar de referencia que atendiese a los diferentes problemas médicos que aparecen en pacientes SMA al envejecer (Kolb & Kissel, 2011).

12 REFERENCIAS

1. Aartsma-Rus A. Genetic therapies for spinal muscular atrophy type 1. Lancet Neurol [Internet]. 2018;17(2):111–2. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30436-2

2. Bäumer D, Lee S, Nicholson G, Davies JL, Parkinson NJ, Murray LM, et al. Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. PLoS Genet. 2009;5(12).

3. Beattie CE, Carrel TL, McWhorter ML. Fishing for a Mechanism: Using Zebrafish to Understand Spinal Muscular Atrophy. J Child Neurol [Internet]. 2007;22(8):995–1003. Available from: http://jcn.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0883073807305671

4. Bernabò P, Tebaldi T, Groen EJN, Lane FM, Perenthaler E, Mattedi F, et al. In Vivo Translatome Profiling in Spinal Muscular Atrophy Reveals a Role for SMN Protein in Ribosome Biology. Cell Rep. 2017;21(4):953–65.

5. Bowerman M, Becker CG, Yáñez-Muñoz RJ, Ning K, Wood MJA, Gillingwater TH, et al. Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. Dis Model Mech [Internet]. 2017;10(8):943–54. Available from: http://dmm.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dmm.030148

6. Burghes, Arthur H M; Beattie CE. The NIH Public Access Policy. Brain Behav Immun [Internet]. 2008;22(5):4109. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554561

7. Cauchi RJ. SMN and Gemins: 'We are family' ... or are we?: Insights into the partnership between Gemins and the spinal muscular atrophy disease protein SMN. BioEssays. 2010;32(12):1077–89.

8. Darras BT, Monani UR, Vivo DC De. 139 - Genetic Disorders Affecting the Motor Neuron: Spinal Muscular Atrophy. Swaiman's Pediatr Neurol (Sixth Ed [Internet]. 2017;1057–64. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323371018001399

9. Denes A, Pradillo JM, Drake C, Buggey H, Rothwell NJ, Allan SM. Surgical manipulation compromises leukocyte mobilization responses and inflammation after experimental cerebral ischemia in mice. Front Neurosci. 2014;8(8 JAN):1–12.

10. Doktor TK, Hua Y, Andersen HS, Brøner S, Liu YH, Wieckowska A, et al. RNA-sequencing of a mouse-model of spinal muscular atrophy reveals tissue-wide changes in splicing of U12-dependent introns. Nucleic Acids Res. 2017;45(1):395–416.

11. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. Lancet [Internet]. 2016;388(10063):3017–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8

12. Gabanella F, Butchbach MER, Saieva L, Carissimi C, Burghes AHM, Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. PLoS One. 2007;2(9):1–12.

13. Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, Crawford TO, Gogliotti RG, Didonato CJ, et al. Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. Hum Mol Genet. 2008;17(8):1063–75.

14. Gillingwater TH. Dawn of a new therapeutic era for spinal muscular atrophy. Lancet [Internet]. 2016;388(10063):2964–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32390-X

15. Hamilton G, Gillingwater TH. Spinal muscular atrophy: Going beyond the motor neuron. Trends Mol Med [Internet]. 2013;19(1):40–50. Available from: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84871718500&partnerID=40&md5=bed7192b50dbd5d837c2a8fb24875192

16. Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. Nat Genet. 2000;24(january):66–70.

17. Jangi M, Fleet C, Cullen P, Gupta S V., Mekhoubad S, Chiao E, et al. SMN deficiency in severe models of spinal muscular atrophy causes widespread intron retention and DNA damage. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2017;114(12):E2347–56. Available from: http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1613181114

18. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: A timely review. Arch Neurol. 2011;68(8):979–84.

19. Lafarga M, Tapia O, Romero AM, Berciano MT. Cajal bodies in neurons. RNA Biol. 2017;14(6):712–25.

20. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell. 1995;80(1):155–65.

21. Li DK, Tisdale S, Espinoza-Derout J, Saieva L, Lotti F, Pellizzoni L. A Cell System for Phenotypic Screening of Modifiers of SMN2 Gene Expression and Function. PLoS One. 2013;8(8):1–13.

22. Li DK, Tisdale S, Lotti F, Pellizzoni L. Regulation To Motor Neuron Disease. 2014;1–8.

23. Lotti F, Imlach WL, Saieva L, Beck ES, Hao LT, Li DK, et al. An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. Cell [Internet]. 2012;151(2):440–54. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.012

24. Mains PE, Sulston IA, Wood WB. Dominant maternal-effect mutations causing embryonic lethality in Caenorhabditis elegans. Genetics. 1990;125(2):351–69.

25. Matera AG, Wang Z. A day in the life of the spliceosome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(2):108–21.

26. Mora Pardina J. Esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades de la motoneurona. 2008;34:797–826.

27. Murray B, Mitsumoto H. Disorders of Upper and Lower Motor Neurons. In: Neurology in Clinical Practice [Internet]. 2012. p. 1855–89. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437704341000992

28. Pillai RS, Grimmler M, Meister G, Will CL, Lührmann R, Fischer U, et al. Unique Sm core structure of U7 snRNPs: Assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. Genes Dev. 2003;17(18):2321–33.

29. Rodriguez-Muela N, Litterman NK, Norabuena EM, Mull JL, Galazo MJ, Sun C, et al. Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. Cell Rep. 2017;18(6):1484–98.

30. Sleigh JN, Gillingwater TH, Talbot K. The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy. Dis Model Mech [Internet]. 2011;4(4):457–67. Available from: http://dmm.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dmm.007245

31. Strzelecka M, Trowitzsch S, Weber G, Lührmann R, Oates AC, Neugebauer KM. Coilin-dependent snRNP assembly is essential for zebrafish embryogenesis. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(4):403–9.

32. Talbot K, Tizzano EF. The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. Gene Ther [Internet]. 2017;24(9):529–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/gt.2017.52

33. Tapia O, Narcís JO, Riancho J, Tarabal O, Piedrafita L, Calderó J, et al. Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. Neurobiol Dis. 2017;108(2017):83–99.

34. Tisdale S, Pellizzoni L. Disease Mechanisms and Therapeutic Approaches in Spinal Muscular Atrophy. J Neurosci [Internet]. 2015;35(23):8691–700. Available from: http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0417-15.2015

35. Wan L, Dreyfuss G. Splicing-Correcting Therapy for SMA. Cell [Internet]. 2017;170(1):5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.028

36. Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. J Child Neurol [Internet]. 2007;22(8):1027–49. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761659

37. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, et al. SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of snRNAs and Widespread Defects in Splicing. Cell. 2008;133(4):585–600.