

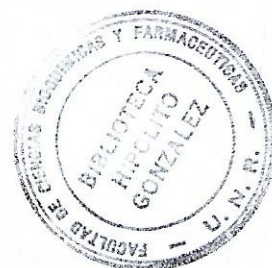
682

6609. C.2682.

8571.

27.5.14. Tesina

Universidad Nacional de Rosario



Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

Identificación del receptor transmembrana de Wnt7b durante el desarrollo dendritogénico de neuronas piramidales de hipocampo

Marcos Cases

Tesina para optar por el título de Licenciado en Biotecnología

Directora: Dra. Silvana B. Rosso

Realizada en el Laboratorio de Toxicología Experimental (LATOEX) de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas

2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a...

Mis padres, quienes me han educado en la moral de la auto-superación y han solventado mis estudios desde el primer día.

Mi hermana Patricia, por su apoyo incondicional.

A todos aquellos que me ayudaron a terminar con esta tesina sin tener ningún compromiso legal ni ético para conmigo: a la licenciada Eugenia Covernton y a la doctora Elena Orellano, entre otros.

ÍNDICE

Índice	1
Abreviaturas	5
Anglicismos	6
Resumen	7
1. Introducción	8
1.1. Morfogénesis neuronal en el Sistema Nervioso Central	8
1.1.1. Ramificación morfogénica en neuronas de vertebrados	8
1.1.2. Regulación de la morfogénesis neuronal	9
1.1.2.1. Factores intrínsecos	9
1.1.2.2. Señales epigenéticas	10
1.1.3. Particularidades del desarrollo dendritogénico	10
1.2. Ligandos Wnt	11
1.2.1. Filogenia de los ligandos Wnt	11
1.2.2. Características estructurales generales	12
1.2.3. Señalización Wnt	12
1.2.3.1. Apreciación global de la señalización Wnt	12
1.2.3.2. Cascadas intracelulares que median la señalización Wnt	14
1.3. Receptores de membrana asociados a señalización Wnt	14
1.3.1. Receptores Frizzled	15
1.3.2. Co-receptores y moduladores	16
1.3.3. Modulación y complejización de la señalización Wnt	17
1.4. Procesos biológicos regulados por ligandos Wnt	19
1.4.1. Wnts y desarrollo en general	19
1.4.2. Wnts y desarrollo del Sistema Nervioso Central	19
1.4.3. Wnts y dendritogénesis	20
1.5. Elección de Fz7 como receptor en estudio	21
1.6. Neuronas piramidales de hipocampo como modelo experimental <i>in Vitro</i>	24
1.6.1. Etapas del desarrollo de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo	25
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo general	27

2.2. Objetivos específicos	27
3. Materiales y métodos	28
3.1. Líneas celulares	28
3.2. Plásmidos	28
3.3. Medios de cultivo y soluciones	28
3.4. Cultivo celular	30
3.4.1. Pasaje o repique de líneas celulares	30
3.4.2. Crio-preservación de líneas celulares	31
3.4.3. Recuperación de líneas celulares congeladas	32
3.5. Transfección de células	32
3.6. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata	33
3.7. Inmunocitoquímica	34
3.8. <i>Western Blot</i>	35
3.8.1. Obtención y preparación de las muestras	35
3.8.1.1. Lisado de células en cultivo	35
3.8.1.2. Homogenado de cerebro	36
3.8.1.3. Cuantificación de proteínas	36
3.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	37
3.8.3. Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	37
3.8.4. Inmunodetección de proteínas	37
3.8.5. Revelado	38
3.8.6. <i>Stripping</i> y re-sondeo de las membranas	39
3.9. Adquisición de imágenes y análisis estadístico	40
4. Resultados y Discusión	41
4.1. Puesta a punto de la técnica de <i>Western Blot</i>	41
4.1.1. Bloqueo de la membrana y soluciones de anticuerpos	44
4.1.2. Tratamiento de la muestra	45
4.2. Caracterización de Frizzled-7 (Fz7) como posible receptor de Wnt7b y mediador del efecto dendritogénico de éste en neuronas piramidales de hipocampo	58
4.2.1. Fz7 se expresa en el cerebro de rata durante el desarrollo dendritogénico	58
4.2.2. Fz7 se expresa en cultivos de neuronas de hipocampo de rata incluso durante la etapa de dendritogénesis	60
4.2.3. Fz7 estimula la dendritogénesis	62

4.2.3.1. Efecto de la sobre-expresión de Fz7 en medio condicionado control	62
4.2.3.2. Efecto de la exposición al ligando Wnt7b de neuronas que expresan sólo EGFP	64
4.2.3.3. Efecto de la sobre-expresión del receptor Fz7 en medio condicionado con Wnt7b	65
4.2.3.4. Efecto de la exposición al ligando Wnt7b de neuronas que sobre-expresan Fz7	66
4.2.3.5. Fz7 podría actuar como receptor para Wnt7b durante la dendritogénesis	67
5. Conclusiones	70
6. Referencias bibliográficas	74

ABREVIATURAS

DMEM	Medio esencial mínimo de Dulbecco
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
Wnt	Wingless Integration
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
Fz7	Frizzled 7
SNC	Sistema Nervioso Central
CRD	Cysteine-Rich Domain
RNasa	Ribonucleasa
PBS	Tampón Fosfato salino
TBS	Tampón Tris salino
ECL	Enhanced chemiluminescence

ANGLICISMOS

BUFFER Solución reguladora, amortiguadora o tampón que permite controlar la concentración libre de un determinado compuesto a pesar de un cambio en su concentración total.

BLOT Película fotográfica que resulta de un procedimiento en el que proteínas o ácidos nucleicos son separados en un gel y luego transferidos directamente a una membrana que los inmoviliza y permite su detección.

STRIPPING Remoción total de los anticuerpos primarios y secundarios de una membrana luego de realizada la inmunodetección. Se efectúa con la finalidad de volver a sondear la membrana con las proteínas inmovilizadas en su superficie.

WILD-TYPE Puede encontrarse como “silvestre” en la literatura en castellano. Es la forma típica de una especie como se da en la naturaleza. Originalmente, la forma silvestre fue conceptualizada como el producto del alelo “normal” (estándar) en un locus, en contraste con aquella producida por un alelo no estándar (“mutante”). Se aprecia ahora que la mayoría o todos los loci génicos existen en una variedad de formas alélicas, las cuales varían en frecuencia a través del rango geográfico de una especie, y que no existe una variante silvestre uniforme. Sin embargo, en general, el alelo más prevalente (por ej., el que presenta la mayor frecuencia génica) es el considerado como wild-type. Su uso se ha extendido hasta designar la forma típica de una raza, gen, o rasgo como se dan en la naturaleza y que se distingue de las variantes mutantes que puedan surgir.

RESUMEN

El crecimiento y la ramificación de las dendritas son episodios críticos en la formación de conexiones neuronales funcionales. Una combinación de factores intrínsecos y ambientales regula la morfología dendrítica de neuronas individuales a través de cambios en el citoesqueleto. Se han identificado varias señales extracelulares y moléculas intracelulares que estimulan o inhiben el crecimiento y la ramificación dendríticas. Estudios en neuronas de hipocampo condujeron al descubrimiento de que la señalización Wnt regula la morfogénesis dendrítica. Wnt7b, que se expresa durante la dendritogénesis en el hipocampo, incrementa el largo y la ramificación de neuronas de hipocampo en cultivo.

Con el objeto de progresar en la identificación del/los receptor/es que media/n el efecto dendritogénico del ligando Wnt7b, se investigó la posible participación de la proteína transmembrana Frizzled-7 (Fz7) en tal fenómeno. Para ello, una vez confirmada la presencia de dicha proteína durante el período de interés del desarrollo neuronal, tanto *in vivo* como *in vitro*, se efectuaron ensayos de ganancia de función del receptor Fz7 en cultivos primarios de neuronas de hipocampo y luego se intentó bloquear la señalización disparada por Wnt7b mediante la sobre-expresión del dominio extracelular rico en cisteínas (CRD) de Fz7 anclado a la membrana plasmática de las neuronas a través de un tallo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesina sugieren que Fz7 estimularía la elongación de las dendritas de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo y la complejización de sus árboles dendríticos, y que dicha proteína podría actuar como receptor para el ligando Wnt7b, mediando el efecto dendritogénico de éste.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Morfogénesis neuronal en el Sistema Nervioso Central

Desde los pioneros estudios neuroanatómicos de Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX, la morfología ha emergido como uno de los principales criterios empleados para la identificación y caracterización de distintas poblaciones de neuronas.

Luego de migrar a sus destinos finales, las neuronas comienzan a formar neuritas.

A medida que el sistema nervioso de los vertebrados se desarrolla, las neuronas individuales migran a sus destinos finales y posteriormente sufren cambios morfológicos significativos. La secuencia de morfogénesis comienza con la excrescencia de neuritas. Estas estructuras se diferencian, luego, en axones o en dendritas, en distintos tipos de dominios citoplasmáticos altamente especializados estructural, morfológica y funcionalmente. Una vez establecidos estos dominios, se desarrolla el proceso de arborización dendrítica y, finalmente, comienza la sinaptogénesis, conduciendo a la maduración de un arreglo de fenotipos asombrosamente diverso. A partir de esta secuencia de morfogénesis comienzan a emerger propiedades funcionales críticas, permitiendo el establecimiento de patrones de actividad apropiados dentro de la red neuronal en desarrollo⁽²⁹⁾. En otras palabras, una correcta funcionalidad del sistema nervioso depende de la complejidad neuronal y del establecimiento de conexiones neuronales adecuadas.

1.1.1. Ramificación morfogénica en neuronas de vertebrados

Puesto que la mayoría de las sinapsis del sistema nervioso central están localizadas en los árboles neuronales, los cambios en el área superficial de estos árboles influyen en la recepción, integración y transmisión de la actividad eléctrica⁽²⁹⁾. Así, la regulación dinámica de la ramificación neuronal durante la morfogénesis es crítica tanto para generar como para mantener la organización funcional del sistema nervioso.

Identificar los principios moleculares de la conectividad neuronal es central para entender cómo se forman y modulan los circuitos neuronales complejos pero también

cómo pueden ser reparados luego de injuria o daño cerebral. Es de esperarse que a medida que se conozca más respecto a las moléculas y mecanismos involucrados en el desarrollo neuronal para establecer la conectividad original del sistema nervioso central (SNC), aumentarán las posibilidades de imitarlo en forma precisa para una regeneración exitosa.

• 1.1.2. Regulación de la morfogénesis neuronal

En general, se considera que las características morfológicas que aparecen sistemáticamente durante el desarrollo neuronal, tanto *in situ* como en condiciones reducidas de cultivo, representan atributos invariantes específicos del tipo celular establecidos por medio de una regulación intrínseca⁽²⁹⁾. Por otro lado, existen también diversas clases de influencias epigenéticas sobre el patrón de morfogénesis neuronal que surgen de señales micro-ambientales restringidas temporal y/o espacialmente.

1.1.2.1. Factores intrínsecos

Mientras que generalmente se acepta que la ramificación de las neuritas involucra señales epigenéticas complejas dentro del micro-ambiente, cada población neuronal está predispuesta a desarrollar ciertas características particulares de árbol a través de restricciones sobre la ramificación específicas del tipo celular. En consecuencia, se ha observado un grado sorprendente de similitud en los patrones de arborización madura dentro poblaciones homogéneas de neuronas de la médula espinal, neuronas corticales y neuronas piramidales de hipocampo, a las que se les permite desarrollarse sobre sustratos carentes de patrón alguno en condiciones reducidas de cultivo. De hecho, el patrón característico del árbol desarrollado por cada tipo de célula neuronal *in vitro* es enormemente similar al patrón de ramificación observado *in situ* para la correspondiente población⁽²⁹⁾.

La regulación intrínseca de la morfogénesis de la ramificación neuronal surge de la combinación de dos factores. Por un lado, un programa celular de expresión génica, mayormente autónomo, que puede controlar cascadas intracelulares de señalización y la síntesis de efectores moleculares y componentes citoplasmáticos que generan la forma neuronal. Por el otro, restricciones estructurales impuestas por las dimensiones

celulares, las propiedades biofísicas de los elementos del citoesqueleto intracelulares (sobre todo, los microtúbulos y la citomatriz de actina), y el control celular autónomo de la topología del árbol y la probabilidad de ramificación⁽²⁹⁾.

1.1.2.2. Señales epigenéticas

Dado que el fenotipo alcanzado por una neurona es en parte determinado por cascadas de señalización disparadas por señales extracelulares capaces de inducir cambios en la organización y la dinámica del citoesqueleto, estudios recientes han intentado caracterizar los factores epigenéticos involucrados en la regulación de la morfogénesis de la ramificación. La evidencia experimental sugiere que muchas de las señales extracelulares que, se sabe, cumplen funciones tempranas en el desarrollo durante la excrescencia de neuritas, tal vez modulen también las etapas más avanzadas de la arborización neuronal. Tales factores epigenéticos incluyen: factores de la matriz extracelular y moléculas de adhesión a la superficie celular, moléculas quimio-atractivas y quimio-repelentes secretadas que actúan localmente o a larga distancia, hormonas y factores tipo hormona, proteínas inductoras de la morfogénesis ósea (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs), factores neurotróficos, y actividad neuronal⁽²⁹⁾.

1.1.3. Particularidades del desarrollo dendritogénico

En relación a las señales ambientales locales que regulan la forma que adquieren las arborizaciones, cabe destacar que, en la mayoría de las poblaciones neuronales de vertebrados, la morfogénesis del axón ocurre bajo condiciones eléctricamente silentes, es decir, con actividad eléctrica nula o bien con niveles bajos de actividad espontánea. Por el contrario, el desarrollo dendrítico procede en presencia de varias formas de actividad neuronal, y un balance de patrones específicos de actividad eléctrica que depende del tipo de célula neuronal parece ser fundamental para esculpir la arquitectura de sus ramas dendríticas. La *hipótesis sinaptotrófica de ramificación dendrítica de Vaughn*, formulada en respuesta a observaciones estáticas al microscopio electrónico, propone que las ramas se forman en regiones de contacto dendrítico con socios aferentes, y que estas ramas nacientes son estabilizadas gradualmente a través de la maduración de las sinapsis. Recientemente, un número de

experimentos de proyección de imágenes de células vivas mediante microscopía de excitación de 2 fotones proveyó evidencia directa para esta teoría⁽²⁹⁾.

Es posible, entonces, que las ramas dendríticas asociadas con conexiones sinápticas inmaduras, inestables y/o débilmente activas, tal vez se retraigan pasivamente debido a una estabilización estructural insuficiente, o quizás activamente en base a una competencia basada en neurotransmisores. Además, se ha observado que el bloqueo global de la actividad eléctrica puede influenciar el patrón general de propagación y ramificación de árboles dendríticos en desarrollo, al tiempo que cambios más locales en la señalización mediada por neurotransmisores pueden modular la estabilización o retracción de ramas dendríticas individuales⁽²⁹⁾.

En resumen, el desarrollo dendrítico estaría regulado por señales dependientes e independientes de la actividad sináptica. Estudios en neuronas corticales mostraron que, en mamíferos, la señales independientes de la actividad sináptica predominarían durante el período embrionario, mientras que las dependientes de actividad cobrarían importancia en el período post-natal, coincidente con la sinaptogénesis⁽³⁾.

En los últimos años se ha vuelto evidente que la familia de proteínas secretadas Wnt juega un rol crucial en la conectividad del sistema nervioso. Los factores Wnt regulan el posicionamiento neuronal, la polarización, el desarrollo axonal y dendrítico, y la sinaptogénesis. Estudios en neuronas de hipocampo condujeron al descubrimiento de la participación de la señalización Wnt en la regulación de la morfogénesis dendrítica. Entre los miembros de la familia Wnt asociados a este proceso se ha identificado a los ligandos Wnt7b⁽⁵⁵⁾ y Wnt2⁽⁷²⁾.

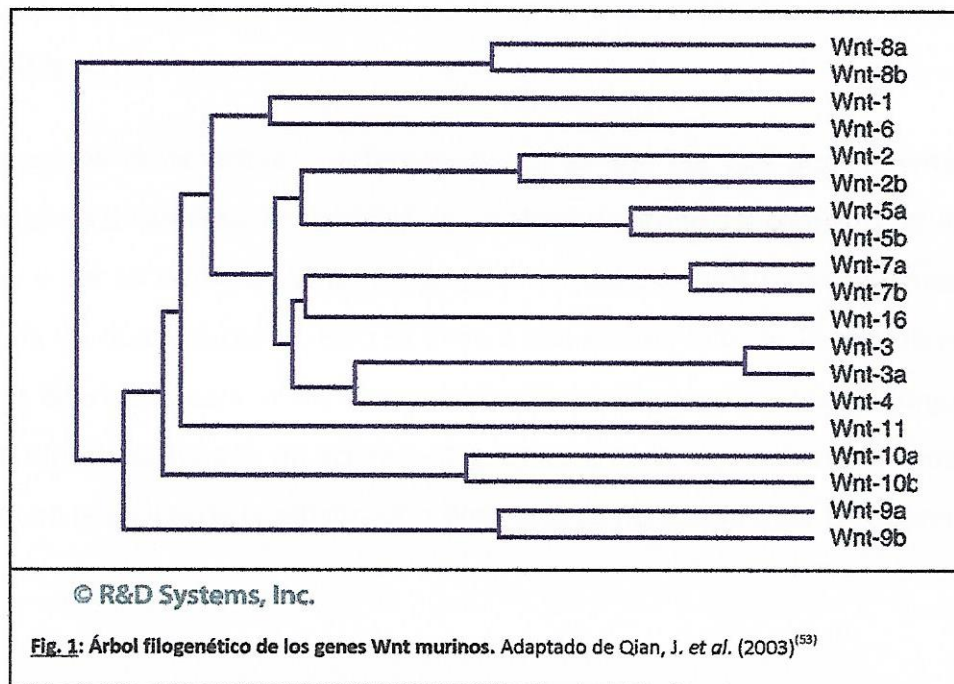
1.2. Ligandos Wnt

Los Wnts comprenden una gran familia proteica que desempeña diversas funciones durante el desarrollo embrionario y promueve la homeostasis de tejido en el adulto.

1.2.1. Filogenia de los ligandos Wnt

A la fecha, se conocen al menos 19 Wnts en humanos, dispersos a lo largo de 10 cromosomas, con una isoforma adicional reportada en humanos para *Wnt-2b/13* y

Wnt-16⁽⁴⁴⁾ (Fig. 1). También se han identificado 19 genes Wnts en ratón y rata, 7 en *Drosophila melanogaster* y 5 en *Caenorhabditis elegans*, encontrándose ausentes en plantas, eucariotas unicelulares y procariotas. Tanto los factores Wnt como sus efectores intracelulares se hallan altamente conservados a través de estas especies animales⁽⁴⁶⁾.



1.2.2. Características estructurales generales

Los factores Wnt son lipo-glicoproteínas secretadas evolutivamente conservadas, de entre 39 y 46 kDa, que contienen un patrón conservado de 22 a 24 residuos de cisteínas distribuidas a lo largo de su secuencia⁽²⁵⁾. Son modificadas post-traduccionalmente con un residuo de ácido palmítico en una de sus cisteínas conservadas^(43, 46), lo que les confiere un carácter hidrofóbico importante para el desempeño de su función⁽⁴⁶⁾. El análisis de la actividad de proteínas Wnt quiméricas en *Xenopus* evidenció que la región C-terminal tendría un rol esencial en la especificidad de respuesta de los distintos Wnt⁽⁴⁴⁾.

1.2.3. Señalización Wnt

1.2.3.1. Apreciación global de la señalización Wnt.

Los Wnts se acoplan a varios receptores y por lo tanto activan diferentes vías de señalización, que han sido clasificadas como canónicas (dependientes de β -catenina) o no-canónicas (independientes de β -catenina). Sin embargo, esta clasificación solo puede servir como una guía aproximada, puesto que dentro de la señalización Wnt canónica y no-canónica se emplean diversas sub-ramas en diferentes contextos celulares⁽⁴⁵⁾. La existencia de *cross-talk* o interferencia entre estas vías suma aún más complejidad (Fig. 2)⁽⁴³⁾.

Si bien numerosos Wnts activan preferentemente ya sea las vías dependientes o independientes de β -catenina, la actividad de los Wnts depende del contexto celular y del receptor, y por lo tanto los Wnts no pueden ser subdivididos rigurosamente de acuerdo con la vía que inducen⁽⁴⁵⁾. Esto se debe a que existen más de 15 receptores y co-receptores diferentes para Wnts, y la combinación particular de estos en conjunto con un dado Wnt determina la vía activada (Fig. 2). Este código combinatorial, una de las preguntas no resueltas de la señalización Wnt, está comenzando a ser elucidado.

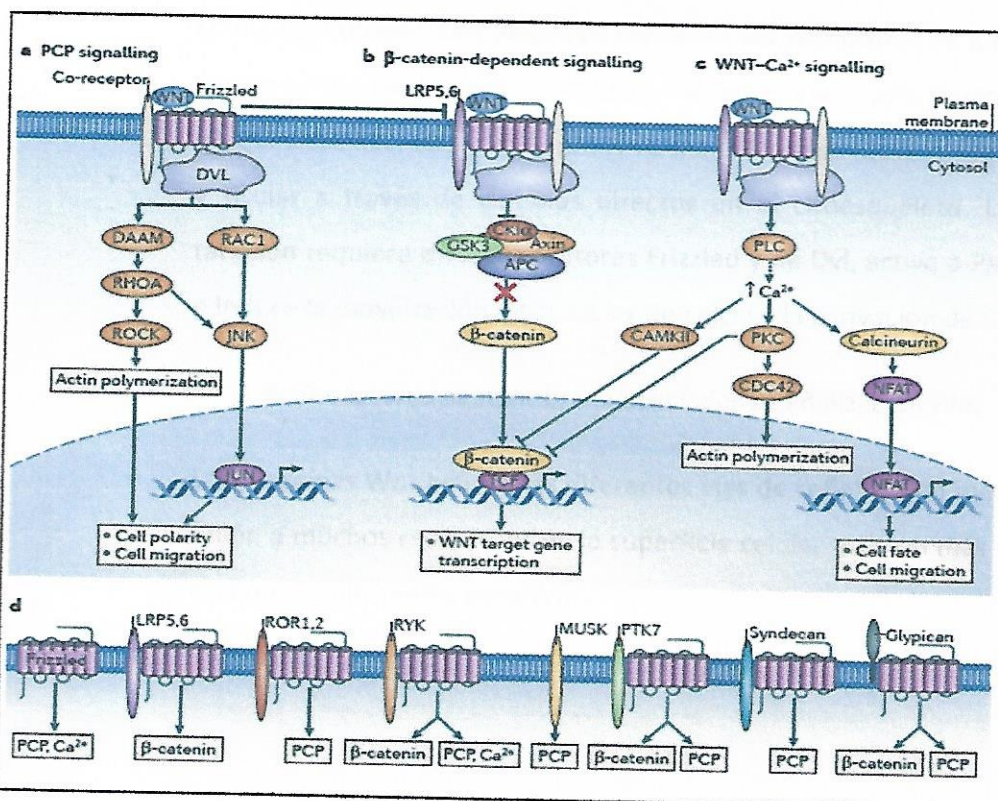


Fig. 2: Vías de señalización Wnt. Esquemas simplificados que muestran las principales vías Wnt dirigidas por interacciones específicas WNT, Frizzled y co-receptores de Wnt. a) señalización de la polaridad celular en el plano (PCP), mediada por las GTPasas RHOA y RAC1 y las quinasas ROCK y JNK b) Activación de genes por β -catenina, mediada por la inactivación del complejo de degradación de la misma. c) Vía Wnt- Ca^{2+} , que regula la transcripción de genes de control del destino celular y la migración celular. Las vías PCP y del Ca^{2+} antagonizan la señalización de β -catenina en varios niveles. d) Principales vías empleadas por los receptores y co-receptores de los ligandos Wnt. Sólo se muestran las tres vías Wnt mejor caracterizadas: la vía dependiente de β -catenina (β -catenina); la vía PCP; y la vía Wnt- Ca^{2+} (Ca^{2+}). Adaptado de Niehrs C. (2012)⁽⁴⁵⁾.

1.2.3.2. Cascadas intracelulares que median las vías de señalización Wnt

Al parecer, la unión de los Wnts a sus receptores activa a Dishevelled (Dvl en mamíferos, Dsh en *Drosophila*)⁽⁷⁵⁾, una fosfoproteína citoplasmática presente en un gran número de organismos. Gracias a que esta proteína reúne componentes de señalización⁽³⁹⁾, la vía puede, a partir de ella, ramificarse en al menos 3 cascadas diferentes: la vía canónica o vía de la β -catenina y las vías no-canónicas, aparentemente independientes de β -catenina, que incluyen la vía de polaridad celular (Planar Cell Polarity -PCP- pathway) y la vía Wnt/calcio (Fig 2).

En la vía canónica, receptores Frizzled (Fz) señalizan junto con LRP-5/6 para activar Dvl. Se inhibe la glucógeno sintasa quinasa-3 (Gsk3), que normalmente fosforila la proteína citoplasmática β -catenina dentro de un complejo de degradación que incluye a las proteínas Axin y APC (*adenomatous polyposis coli*). Al inhibirse el complejo se incrementa la estabilidad de la β -catenina, que se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes blanco en asociación con factores de transcripción de la familia TCF/LEF⁽⁹⁾. Una vía canónica divergente en la cual no está involucrada la transcripción también opera en axones en desarrollo⁽⁷⁾ y en el crecimiento y ramificación dendríticas dependientes de actividad.

La vía PCP (Planar Cell Polarity), involucra los receptores Fz junto con un número de componentes núcleo tales como Dvl, Flamingo, van Gogh, Diego, y Prickle, para activar las quinasas Rac, Rho y JNK (Jun N-terminal kinase). Esta vía regula la polaridad celular y tisular a través de cambios directos en el citoesqueleto. La vía Wnt/calcio, que también requiere de los receptores Frizzled y de Dvl, activa a PKC (proteína quinasa C) e induce la movilización intracelular de calcio y la activación de CaMKI⁽⁵⁴⁾.

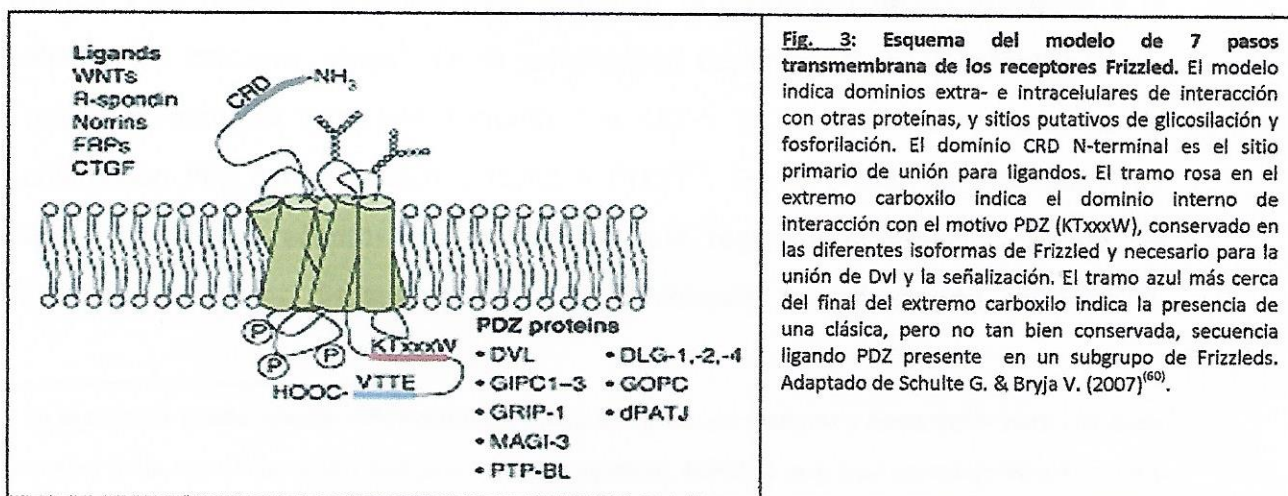
1.3. Receptores de membrana asociados a señalización Wnt

Las proteínas Wnt activan las diferentes vías de señalización mencionadas mediante la unión a muchos receptores en la superficie celular. Existen más de 15 receptores y co-receptores diferentes para Wnts.

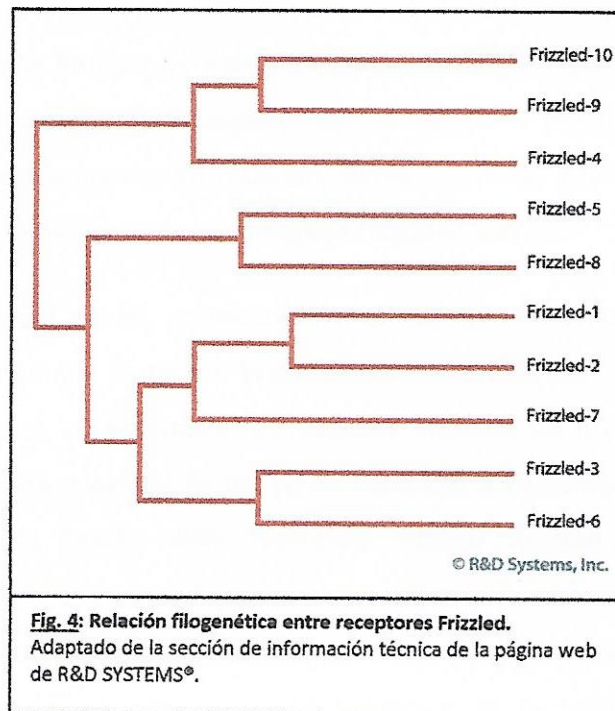
1.3.1. Receptores Frizzled

Los ligandos Wnt actúan, en parte, a través de la unión y activación de ciertos miembros de la superfamilia de receptores asociados a proteína G (GPCR), que son expresados en la membrana plasmática de las células sensibles a Wnt. Estos receptores se conocen con el nombre “Frizzled” (rizado, crispado) en base a un fenotipo observado en el ala de *Drosophila*. A la fecha, se han identificado 10 receptores Frizzled (Fz) en humanos⁽¹⁾.

La porción N-terminal de los receptores Fz, ubicada del lado externo de la membrana, contiene un dominio rico en cisteínas (cysteine-rich domain, CRD). Este dominio participa (con o sin ayuda de co-receptores tales como LRP-5/6) en la unión de agonistas, como las proteínas Wnt, o de antagonistas como miembros de la familia de ligandos Dickkopf⁽²¹⁾. Existen sitios putativos de glicosilación en los bucles extracelulares de los receptores Frizzled los cuales son importantes para la maduración del receptor en el retículo endoplasmático y podrían estar involucrados en la unión del ligando⁽⁹⁾. Los análisis de secuencia y de generación de mutantes revelaron la presencia de un dominio C-terminal (KXXXXW) de unión a dominios PDZ, próximo a la membrana, que está asociado con la unión y la activación de Dvl^(65, 75) y provee al receptor una interfaz de interacción con otras proteínas (**Fig. 3**).



Filogenéticamente, los receptores Frizzled se dividen en 4 grupos (Fig. 4). Fz-1, 2 y 7, y Fz3 y 6 forman dos grupos relacionados, mientras que Fz-5 y 8 comprenden un tercer grupo, y Fz-4, 9 y 10 generan un cuarto grupo distante⁽⁶⁹⁾.



1.3.2. Co-receptores y moduladores

Las proteínas Frizzled son receptores generalizados de alta afinidad para los ligandos Wnt que emplean co-receptores como un determinante regulatorio mayoritario para dirigir la señalización corriente abajo hacia distintas ramas de señalización. Se desconoce y resulta difícil de probar si también pueden funcionar sin co-receptores. En general, los co-receptores son proteínas de la superficie celular que se asocian con un ligando y su receptor primario para estimular la formación de un complejo y la señalización corriente abajo¹. En la señalización dependiente de β -catenina, Wnt-Frizzled forman un complejo ternario con LRP-5 o LRP-6, mientras que en la señalización PCP comprometen a ROR2 o PTK7⁽⁴⁵⁾. En particular, la proteína PTK7 parece ser un co-receptor transmembrana que regularía la especificidad de las respuestas celulares disparadas por Wnt, inhibiendo la señalización canónica⁽⁵⁰⁾.

¹ En la práctica puede resultar difícil distinguir entre la función de receptor y co-receptor para una dada proteína de la superficie celular que une Wnt. Por ejemplo, ROR2 se une a un complejo Wnt-Frizzled y promueve la señalización PCP corriente abajo⁽⁴⁵⁾, indicando una función como co-receptor. Sin embargo, ROR une Wnt directamente y puede disparar la señalización Wnt⁽⁴⁵⁾, y por lo tanto es probable que ROR señalice independientemente de Frizzled. En cambio, aún no existe evidencia de que RYK y MUSK unan Frizzled, lo cual tal vez los defina como receptores adicionales de los ligandos Wnt en ciertos contextos más que como co-receptores.

Frizzled también puede interactuar con RYK para activar las vías de señalización corriente abajo dependientes de β -catenina, PCP y Wnt- Ca^{2+} . Musk actúa como un receptor de Wnt específicamente en músculo, donde da inicio a la formación de la unión neuromuscular como parte de un complejo receptor mayor⁽⁴⁵⁾.

Además de la capacidad de las proteínas Wnt de comprometer una variedad de receptores transmembrana, tanto los Wnts como sus receptores encuentran una multitud de reguladores en el espacio extracelular, muchos de los cuales parecen desempeñar roles duales. Hasta la fecha, se ha descrito a Dkks, Norrin, WISE, WIF, Cerberus, Cthrc1 y la familia sFRP (secreted Frizzled Related Protein) como moduladores extracelulares de la señalización Wnt. Algunos de ellos actúan como una especie de “receptores” solubles secretados que son a menudo asociados con el antagonismo del ligando, es decir, con una inhibición de la señal. Otros, por el contrario, actúan como facilitadores de la señalización. Las interacciones acumulativas entre estos diferentes factores permiten que tengan lugar respuestas celulares flexibles y dinámicas en presencia de la señal Wnt⁽⁴⁵⁾. El resultado de la señalización Wnt es, entonces, regulado mayormente por el tipo de receptores, co-receptores y moduladores presentes en la célula blanco y por la interacción entre ellos, y no por una propiedad particular de los ligandos Wnt.

1.3.3. Modulación y complejización de la señalización Wnt

En la última década se han encontrado numerosos ejemplos que demuestran que no existe una correlación directa entre el tipo de receptor activado y la cascada intracelular desencadenada en respuesta a Wnts⁽⁵⁴⁾. Además, en base a descubrimientos recientes parece más adecuado hablar de “redes” de señalización que de “vías” individuales y bien diferenciadas (**Fig 5**). Por ejemplo, la señalización mediada por la β -catenina parece depender de una activación simultánea de la rama Wnt/JNK⁽⁷⁶⁾. Por otra parte, los receptores Frizzled y los co-receptores de los ligandos Wnt son regulados mediante fosforilación, ubiquitinación y remoción, proteólisis del dominio citoplasmático o liberación del dominio extracelular, con el fin de prevenir una regulación incorrecta de la diferenciación y/o proliferación celular.

Este nuevo modelo de señalización Wnt ha sido discutido recientemente en más detalle⁽⁶⁷⁾. Dependiendo del contexto celular (por ejemplo, de concentraciones de los componentes individuales), se favorecería la activación preferencial de ciertos aspectos de la red. Esto tiene implicaciones directas en la interpretación de los resultados experimentales: el status de la red debe ser analizado en detalle en cada escenario experimental y modelo biológico. Mientras que los estudios *in vitro* y los ensayos bioquímicos son invaluable para diseccionar las funciones individuales de los componentes de la señalización Wnt, su relevancia para el desarrollo, en última instancia, debe ser demostrada *in vivo*. Aquí, la situación se ve complejizada por el hecho de que las células pueden recibir múltiples señales al mismo tiempo, y éstas tal vez funcionen juntas para disparar el efecto deseado.

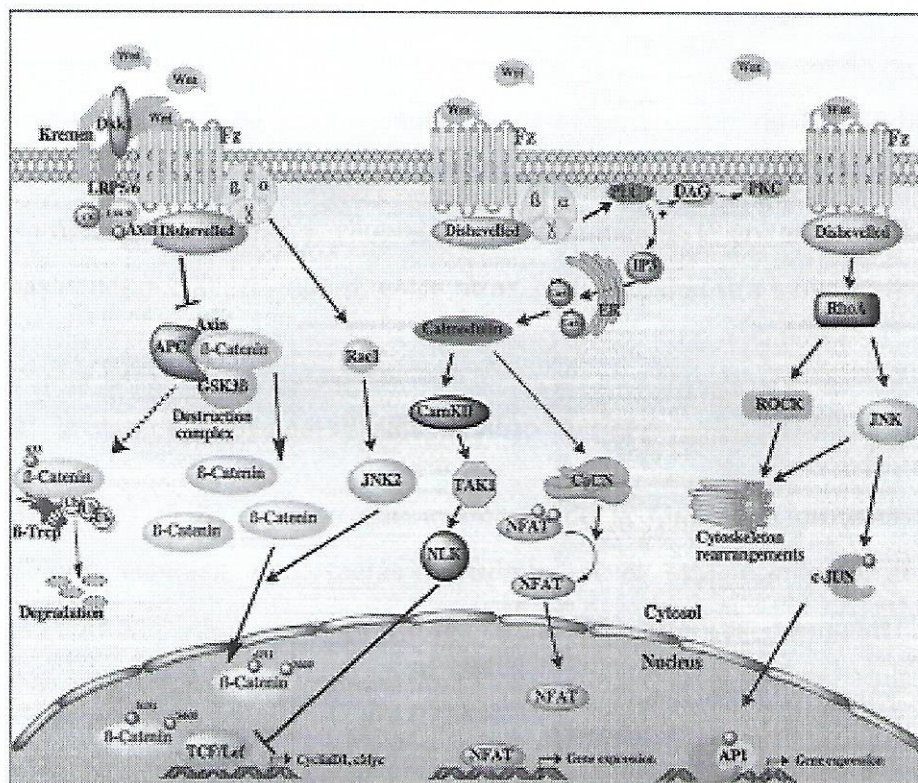


Fig. 5: Apreciación global de la señalización Wnt en forma simultánea e integrada. Vías canónica (izquierda) y no-canónica (derecha). CaCN indica calcineurina. Adaptado de Rao TP, Kühl M. (2010)⁽⁵⁴⁾

1.4. Procesos biológicos regulados por los ligandos Wnt

A nivel celular general, los Wnts controlan la proliferación, diferenciación, supervivencia, movilidad y polaridad de la célula. También afectan la organización del embrión en desarrollo al regular el modelado tisular, la organogénesis y la especificación del plan corporal⁽⁷⁴⁾.

1.4.1. Wnts y desarrollo en general

Durante el desarrollo embrionario, la señalización Wnt controla procesos que incluyen: modelado del eje corporal, especificación del destino celular, proliferación celular y migración celular. Estos procesos son necesarios para la formación adecuada de tejidos en hueso, cerebro y músculo.

Por su parte, en organismos adultos, la señalización Wnt controla la proliferación celular, el mantenimiento de células madre y la determinación de los destinos celulares. Problemas en la regulación de la señalización Wnt han sido asociados a cáncer de próstata, de mama y glioblastoma en humanos y en enfermedades degenerativas como la diabetes tipo II, entre otras, lo cual demuestra su importancia clínica.

1.4.2. Wnts y desarrollo del sistema nervioso central

En los últimos años se ha descrito que miembros de la familia de proteínas de señalización Wnt cumplen importantes funciones en el establecimiento de la conectividad neuronal del SNC, y en las sinapsis periféricas formadas por motoneuronas y fibras musculares esqueléticas^(41, 47).

Los ligandos Wnt regulan diversas funciones celulares durante el desarrollo del SNC que incluyen: la migración y polarización neuronal, el guiado del axón, la remodelación del axón (requerida para la conversión de los conos de crecimiento en botones sinápticos), y la formación de sinapsis mediante la inducción del reclutamiento de componentes pre- y post-sinápticos hacia los futuros sitios sinápticos^(18, 47). De este modo, las proteínas Wnt funcionan como organizadores sinápticos e intervienen en

pasos fundamentales para la formación de conexiones neuronales funcionales tanto en vertebrados como invertebrados⁽⁵⁹⁾.

El modelo prevalente sostiene que los gradientes de factores Wnt, además de actuar como morfógenos durante el desarrollo temprano, regulan luego eventos cruciales que conducen a una conectividad neuronal apropiada⁽⁸⁾. Además, estudios recientes sugieren que la señalización Wnt tal vez regule también la función sináptica en el cerebro adulto. En unas pocas palabras: la señalización Wnt juega un rol clave en la formación, la maduración y el mantenimiento de las sinapsis. Poco se sabe, sin embargo, sobre la localización y la identidad de los receptores involucrados.

1.4.3. Wnts y dendritogénesis

Como ya se expuso previamente, el crecimiento y la ramificación de las dendritas son episodios críticos en la formación de conexiones neuronales funcionales, y una combinación de factores intrínsecos y ambientales regula la morfología dendrítica de neuronas individuales a través de cambios en el citoesqueleto⁽⁴⁹⁾.

Se han identificado varias señales extracelulares^(42, 73) y moléculas intracelulares^(36, 66), tales como las GTPasas Rho, que estimulan o inhiben el crecimiento y la ramificación dendríticas.

Estudios en neuronas de hipocampo condujeron al descubrimiento de que la señalización Wnt regula la morfogénesis dendrítica. Wnt7b, que se expresa durante la dendritogénesis en el hipocampo, incrementa el largo y la ramificación de las dendritas de neuronas de hipocampo en cultivo y lo hace a través de una vía no-canónica que requiere de Dvl, Rac y JKN. El efecto de Wnt7b es bloqueado por el antagonista de Wnt, Sfrp1. Sfrp1 por sí solo perjudica el desarrollo dendrítico, lo cual sugiere que Wnts endógenos regulan este proceso⁽⁵⁵⁾. En concordancia con este hallazgo, Yu & Malenka (2003)⁽⁷⁸⁾ encontraron que las neuronas de hipocampo en cultivo liberan proteínas Wnt al medio condicionado. Estos resultados indican que Wnts endógenos contribuyen con la arborización dendrítica normal en los cultivos de neuronas de hipocampo.

Por otra parte, la actividad eléctrica regula el desarrollo dendrítico mediante el estímulo de la expresión de Wnts. Se ha documentado que la actividad neuronal estimula el crecimiento y el mantenimiento de una arborización dendrítica compleja^(31, 79) y que la activación de los receptores NMDA (receptores N-metil D-aspartato, receptores ionotrópicos de glutamato) y la liberación de calcio median estos procesos⁽⁵⁹⁾. Estudios recientes mostraron que la actividad neuronal regula el crecimiento dendrítico mediante la modulación de la expresión y/o liberación de Wnts. En efecto, el medio condicionado obtenido de neuronas de hipocampo despolarizadas contiene niveles mayores de actividad Wnt que el medio obtenido a partir de células no estimuladas. La señalización Wnt estabilizaría los niveles intracelulares de β -catenina y de este modo influiría en el crecimiento dendrítico. Sin embargo, esta función no es dependiente de transcripción mediada por β -catenina sino de su interacción con N-cadherina y α N-catenina⁽⁷⁸⁾. Más recientemente, Soderling y colaboradores mostraron que la expresión de Wnt2 es estimulada por la actividad neuronal. La actividad eléctrica activa a CaMKK y CaMKI, disparando una cascada de señalización que culmina con la activación transcripcional mediada por CREB de Wnt2⁽⁷²⁾. Wnt2 es esencial para el crecimiento y ramificación dendríticas dependientes de actividad. Por lo tanto, la actividad eléctrica estimula el desarrollo dendrítico a través de factores Wnt.

1.5. Elección de Fz7 como receptor en estudio

La identificación del potencial receptor que media el efecto de una señal requiere, en primer lugar y de modo taxativo, situar a dicho receptor putativo en tiempo y espacio. Es decir, debe observarse su presencia durante la manifestación de los efectos de la señal en el tejido u órgano blanco. En forma particular para el presente trabajo, la identificación del receptor que media el efecto de Wnt7b involucra, inicialmente, detectar la expresión del mismo durante el desarrollo dendrítico de las neuronas piramidales de hipocampo *in vivo*.

Es posible enumerar una serie abrumadora de receptores, pertenecientes a distintas familias, que han sido implicados en la excrescencia de neuritas y algunos de estos, más precisamente, en la dendritogénesis. Además, recientemente se ha demostrado

que muchas señales asociadas originalmente al control de la excrecencia y exploración del axón también afectan la excrecencia de dendritas^(15, 16, 51, 73). Entre los muchos receptores posiblemente involucrados en este proceso, pueden mencionarse:

- Ryk, el homólogo en mamíferos de la proteína Derailed de *Drosophila*, participa en la inducción por Wnt3a de excrecencia de neuritas en explantos de ganglios espinales de rata⁽³⁵⁾.
- Dasm1 (Dendrite Arborization and Synapse Maturation 1), un miembro evolutivamente conservado de la superfamilia de las Inmunoglobulinas expresado en niveles altos en el cerebro, se ha demostrado que juega un rol importante en la excrecencia dendrítica de las neuronas de hipocampo de ratón pero no está involucrado en la excrecencia del axón⁽⁶²⁾.
- ROR1 y ROR2 modulan tanto el crecimiento de las neuritas como sus patrones de ramificación en neuronas de hipocampo y están involucrados en la regulación de la extensión y la ramificación del axón⁽⁴⁸⁾.

De los 3 tipos de receptores mencionados, dos unen y median los efectos de los ligandos Wnt, pudiendo actuar como receptores o co-receptores. Sin embargo, es conocido que las proteínas Frizzled son los receptores canónicos para los ligandos Wnt⁽⁵⁾. La familia de proteínas Fz, además de tener un importante rol regulatorio durante el desarrollo embrionario, ha sido asociada con una serie de enfermedades, tales como diferentes formas de cáncer, hipertrofia cardíaca, vitreorretinopatía exudativa familiar (VREF) y esquizofrenia, tanto en humanos como en modelos animales^(37, 38). La correspondencia entre los fenotipos observados para la deficiencia en ciertos miembros de la familia Wnt y ciertos miembros de la familia Fz, da sustento a la hipótesis que sostiene que estos últimos son los principales receptores que median la señalización por ligandos Wnt. Además, en el sistema nervioso, se ha demostrado que los receptores Fz median toda una serie de funciones que incluyen la

diferenciación neuronal, la polaridad celular, la migración celular, el guiado axonal y la supervivencia celular⁽⁵⁹⁾, entre otras².

Todo esto sustenta la elección, en el presente trabajo, de un miembro de la familia de receptores Frizzled como receptor putativo que medie el efecto de Wnt7b en neuronas piramidales de hipocampo. Sin embargo, se debió llevar adelante, en primer lugar, un análisis sistemático de la expresión de los distintos miembros de la familia Frizzled en el hipocampo, a fin de identificar aquellos miembros cuyo patrón de expresión sea similar al de Wnt7b, o al menos sean expresados durante el período de desarrollo neuronal de interés, la dendritogénesis. A pesar de tratarse de un modelo experimental diferente al utilizado en el presente trabajo, a fin de evitar este engorroso trabajo, se recurrió a datos previos derivados del examen del patrón de expresión post-natal de los 10 genes Fz en la formación hipocampal de ratón mediante ensayos de hibridación *in situ*⁽⁶³⁾:

- *Fz3* es densamente expresado en el día del nacimiento (P0). Hacia el séptimo día post-nacimiento (P7), su expresión se refina hacia la capa de células piramidales y la capa de células granulares del giro dentado, donde persiste hasta la adultez joven.
- la expresión de *Fz8* es relativamente baja y ubicua en el hipocampo post-natal.
- *Fz1*, *2*, *9* y *10* son expresados homogéneamente en la mayor parte del córtex cerebral. La expresión de *Fz1*, *2* y *9* se observa en las células hilares del giro dentado, en un patrón que se asemeja al de *Wnt5a*.
- *Fz4*, *5* y *6* no exhiben una expresión cortical post-natal relevante.

² En *Drosophila*, la proteína Wnt Wingless (Wg) activa al receptor Fz2, presente en ambos lados de la sinapsis neuromuscular, para regular la señalización pre- y post-sináptica^(4, 47), mientras que en *C. elegans*, la activación del receptor Fz extra-sináptico Lin-17 inhibe la formación de la sinapsis⁽²⁸⁾. En las sinapsis del SNC de mamíferos, proteínas Wnt tales como Wnt7a, Wnt3a y Wnt5a al parecer estimulan la formación de sinapsis en el cerebelo, la espina dorsal y las neuronas de hipocampo^(2, 30). En los cultivos de neuronas de hipocampo, el receptor Fz1 está presente en los sitios pre-sinápticos y media la formación de sinapsis inducida por Wnt3a⁽⁶⁸⁾, mientras que el receptor Fz5 media la sinaptogénesis disparada por la actividad eléctrica al actuar como receptor para el organizador sináptico Wnt7a⁽⁵⁶⁾.

- Fz7 marca la capa de células piramidales pero no el giro dentado al día P0. Hacia el día P7, la expresión de Fz7 marca parte del Cuerno de Amón (CA). La expresión continúa hasta el P20 pero disminuye la extensión de la zona marcada en CA.

En base a esto, se descartaron los miembros Fz4, 5, 6 y 8 debido a su patrón de expresión post-natal. Los miembros Fz1, 3 y 5 fueron descartados debido a que ya se les han asignado funciones en el desarrollo y funcionamiento neuronal³ (si bien no significa que éstos no puedan cumplir múltiples funciones). Esto, sumado al hecho de que el patrón de expresión de Fz7 coincide, aproximadamente, con el reportado para el ligando Wnt7b, condujo a la elección de Fz7 como receptor putativo a estudiar en neuronas piramidales de hipocampo de rata.

1.6. Neuronas piramidales de hipocampo como modelo experimental *in vitro*.

Las líneas celulares continuas (clonales) obtenidas a partir del SNC no son muy ampliamente utilizadas debido a que no forman axones o dendritas bien definidos y no establecen sinapsis. En su lugar, la mayoría de los científicos trabajan con cultivos primarios. En principio, los cultivos primarios de células nerviosas podrían prepararse a partir de cualquier región del cerebro o de la médula espinal. Los cultivos de hipocampo son muy utilizados debido, en parte, a que la población de células nerviosas en el hipocampo es relativamente simple en comparación con la mayoría de las otras regiones del sistema nervioso central. Las neuronas piramidales, el principal tipo celular en el hipocampo, da cuenta de la vasta mayoría de la población neuronal total. El hipocampo también contiene una variedad de interneuronas, en menor número, la mayoría de las cuales son morfológicamente distinguibles en cultivo⁽¹⁰⁾. Otro factor que hace a las neuronas piramidales cultivadas tan útiles como modelo experimental es que expresan muchos rasgos fenotípicos claves: forman dendritas

³ En los cultivos de neuronas de hipocampo, el receptor Fz1 está presente en los sitios pre-sinápticos y media la formación de sinapsis inducida por Wnt3a⁽⁶⁸⁾. Fz3 se expresa en neuronas del giro dentado⁽⁶³⁾ y puede unir Wnt1 y Wnt8^(12, 20). Fz5, presente en el hipocampo de rata, media el efecto sinaptogénico de Wnt7a y su localización en las sinapsis es regulada por la actividad neuronal, un proceso que depende de Wnts endógenos⁽⁵⁶⁾. Además, tiene capacidad de unir Wnt5a, Wnt10b, Wnt2, Wnt8 y Wnt11^(20, 22).

bien definidas atestadas de espinas y forman extensas redes conectadas sinápticamente. Además, las etapas del desarrollo de las neuronas de hipocampo en cultivo han sido bien caracterizadas y son razonablemente consistentes de laboratorio a laboratorio. Finalmente, dado que los cultivos de hipocampo han sido investigados por más de 20 años, existe ya una extensa base de datos que provee el punto de inicio para nuevos experimentos.

Sin embargo, a pesar de que las neuronas piramidales de hipocampo en cultivo son indiscutiblemente un sistema modelo muy valioso para el estudio de la polaridad neuronal, es necesario ser cauteloso al extrapolar resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*. Esto se debe a que la disrupción de las interacciones célula-célula que se darían *in situ* puede alterar la polaridad y la asimetría celular⁽¹⁰⁾. Además, no todas las neuronas “eligen” un axón a partir de numerosas neuritas aparentemente equivalentes, como es el caso de las neuronas de hipocampo en cultivo.

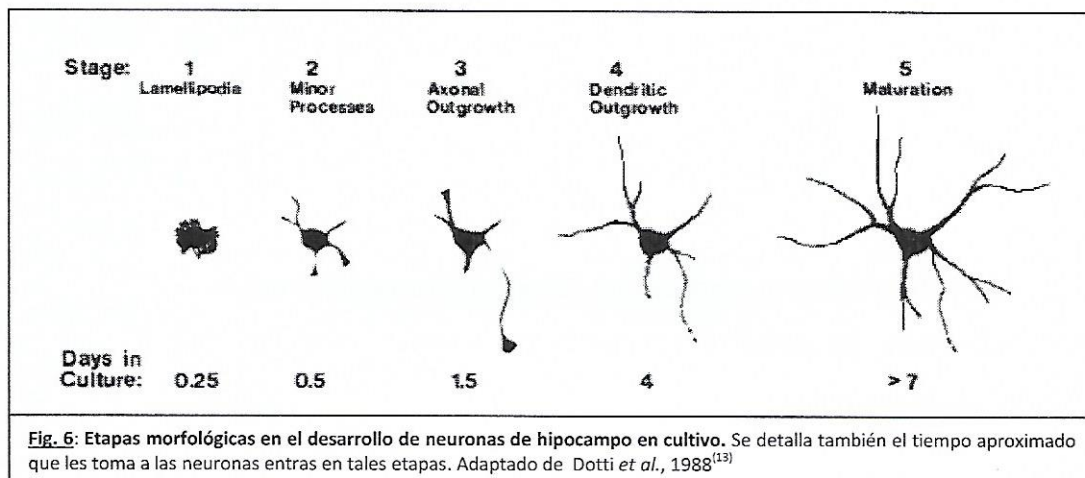
1.6.1. Etapas del desarrollo de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo

Los eventos del desarrollo que conducen al establecimiento de la polaridad neuronal han sido caracterizados muy rigurosamente en cultivos de neuronas de hipocampo de rata. Dotti y colaboradores (1988)⁽¹³⁾ han identificado cinco etapas de desarrollo en base a observaciones de células individuales a lo largo de un período de 7 días en combinación con la inmunotinción de marcadores proteicos apropiados (**Fig. 6**).

La **etapa 1**, que ocurre inmediatamente luego de la unión de la neurona al sustrato, se caracteriza por la formación de un velo o lamellipodio de actina rodeando el cuerpo celular y de filopodios delgados que consisten en extensiones ricas en filamentos de actina. La **etapa 2** está marcada por el crecimiento de cuatro a cinco neuritas cortas, típicamente de 15-25 μm de longitud, denominadas procesos menores, cuyos rasgos no son obviamente axonales ni dendríticos. Entre 12 y 24 horas más tarde, uno de los procesos menores comienza a extenderse rápidamente hasta que se vuelve varias veces más largo que las neuritas restantes, constituyendo el axón de la célula, y su elongación selectiva es la primera evidencia morfológica de polaridad neuronal (**etapa 3**). La **etapa 4** comienza luego de tres o cuatro días en cultivo y se caracteriza por la elongación de los procesos menores restantes y por la adquisición de rasgos

morfológicos que los marcan como dendritas. La **etapa 5** no involucra un cambio en la polaridad, sino que se refiere a la maduración continua de los árboles axonal y dendríticos, incluyendo la ramificación dendrítica, la sinaptogénesis, y la formación de espinas dendríticas⁽¹⁰⁾. Estos eventos posteriores, a diferencia de aquellos que ocurren en las etapas 1 a 4, aparentan estar fuertemente influidos por las interacciones célula-célula.

Estudios de video-microscopía por lapsos de tiempo de neuronas hipotalámicas en cultivo indican que éstas sufren una secuencia prácticamente igual de eventos de desarrollo⁽⁹⁾. La morfología de las neuronas en cultivos de cerebelo sugiere que éstas tal vez también sufran una secuencia similar de cambios morfológicos, a pesar de que su desarrollo no ha sido seguido a nivel de una única célula⁽¹⁰⁾. Existen, sin embargo, numerosos ejemplos de células que no siguen este patrón de desarrollo.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Con el fin de progresar en la identificación del/los receptor/es involucrado/s en la regulación del desarrollo dendritogénico y la maduración neuronal mediada por el ligando Wnt7b, el objetivo general del presente trabajo es caracterizar a la proteína transmembrana Frizzled-7 (Fz7) como posible receptor de Wnt7b e iniciador de la cascada de señalización que regula la dendritogénesis en neuronas piramidales de hipocampo.

2.2. Objetivos específicos

- (1) Poner a punto la técnica de *Western blot* para la detección de Fz7.
- (2) Estudiar el patrón de expresión de Fz7 en el cerebro de rata en diferentes estadios de desarrollo.
- (3) Estudiar el patrón de expresión de Fz7 en neuronas piramidales de hipocampo de rata en cultivo durante los diferentes estadios de diferenciación y comprobar si existe correspondencia entre el comportamiento *in vivo* e *in vitro*.
- (4) Efectuar ensayos de ganancia de función del receptor Fz7 y determinar el fenotipo resultante.
- (5) Bloquear la señalización Wnt sobre-expresando el dominio extracelular rico en cisteínas (CRD) del receptor Fz7 anclado a un tallo de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares

Tabla I – Líneas celulares utilizadas

Línea celular		Descripción
NIH3T3 (fibroblastos de ratón)		Línea celular empleada en los experimentos de transfección transiente a fin de obtener muestras proteicas empleadas para ensayar distintos tratamientos luego del agregado del <i>buffer</i> de siembra, o bien, para evaluar los efectos de la sobre-expresión del receptor Fz7 o la simple exposición de las células a la mezcla de transfección sin DNA alguno.
Rat1b (fibroblastos de rata)	Control	Línea celular empleada para obtener un medio condicionado control con el cual se incubaron las células en los experimentos de cultivo primario de neuronas piramidales de hipocampo una vez que fueron transfectadas.
	Wnt7b-HA	Línea celular transfectada establemente con un plásmido en el que se ha insertado el cDNA de Wnt7b-HA, el cual es secretado al medio. Ésta línea celular se empleó para obtener el medio condicionado con Wnt7b con el cual se incubaron las células en los experimentos de cultivo primario de neuronas piramidales de hipocampo una vez transfectadas.

3.2. Plásmidos

Para la transfección de las células en cultivo se utilizaron plásmidos diseñados para expresar:

- sólo la proteína verde fluorescente (vector EGFP ó pEGFP), ó
- la proteína verde fluorescente (EGFP) y el receptor Fz7 marcado con el epítoto Myc (pEGFP/Fz7-Myc), ó
- EGFP y el dominio extracelular rico en cisteína (CRD) del receptor Fz7 marcado con el epítoto Myc (pEGFP/Fz7CRD-Myc), ó
- EGFP y un short-hairpin RNA diseñado para disminuir, en principio, en forma específica la expresión de Fz7 (pshRNAFz7)

3.3. Medios de cultivo y soluciones

Las soluciones y medios empleados para los cultivos celulares y para el manejo de líneas celulares fueron esterilizados por filtración a través de membranas de acetato

de celulosa (Microclar) de 0,22 μm de diámetro de poro previamente esterilizadas por calor húmedo.

Tabla II - Medios de cultivo

MEDIO	COMPOSICIÓN
Medio de cultivo de células Rat1-b	Medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM - Gibco) suplementado con glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich), piruvato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich), penicilina 100 U/ml (Gibco), estreptomycin 100 mg/ml (Gibco), geneticina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco), y 10% (vol/vol) de suero fetal bovino (Invitrogen). Preparado con agua calidad Milli Q.
Medio de cultivo de células NIH	Medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina (0,29 mg/ml), piruvato de sodio (0,11 mg/ml), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), y conteniendo 10% (vol/vol) de suero fetal bovino. Preparado con agua calidad Milli Q.
Medio para plaqueo de neuronas (DMEM 10)	Medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina (0,29 mg/ml), piruvato de sodio (0,11 mg/ml), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), y conteniendo 10% (vol/vol) de suero de caballo (Gibco). Preparado con agua calidad Milli Q.
Medio definido de mantenimiento neuronal (Medio Neurobasal suplementado con B27 y N2)	Medio Neurobasal (Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, ovoalbúmina 1mg/ml (Sigma-Aldrich), 10% (vol/vol) de suero de caballo, suplemento N2 1%(Gibco), y suplemento B27 2% (Gibco). Preparado con agua calidad Milli Q.

Tabla III – Soluciones

NOMBRE	COMPOSICIÓN		
CMF-HBSS	Solución salina balanceada de Hank (HBSS), libre de calcio, magnesio y bicarbonato, tamponada con HEPES 10 mM, pH 7,3.		
Buffer borato 0.1 M, pH 8.5	Ácido bórico 0,2 M (Sigma-Aldrich), Borato de sodio 0,05 M (Sigma-Aldrich), pH 8,5. Preparado con agua calidad Milli-Q.		
Solución de poli-L-lisina	Poli-L-lisina 0,7 mg/ml (Sigma-Aldrich) disuelta en <i>buffer</i> borato (0,1 M), pH 8,4.		
Tampón Fosfato salino (PBS)	Contiene las sales NaCl 8,0 mg/ml (Sigma-Aldrich), KCl 0,2 mg/ml (Sigma-Aldrich), Na ₂ HPO ₄ 1,15 mg/ml (Sigma-Aldrich) y KH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich) disueltas en agua ultrapura (Milli-Q) y llevadas a pH 7,4		
Tampón T-TBS (Tween-Tris-Buffered Saline)	Tris 50 mM (sigma-Aldrich) y NaCl 150 mM disueltos en agua destilada y llevados a pH 7,6 (esto se conoce como <i>buffer</i> TBS). Luego, se agregó 0,05% V/V del detergente Tween-20 (Sigma-Aldrich).		
Solución tripsina/EDTA	Tripsina (0,25% P/V) y EDTA (0,02%) disueltos en solución salina balanceada de Hank.		
Solución fijadora	Solución de para-formaldehído (PFA) al 4% y sacarosa al 4% en PBS.		
Buffer RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay <i>buffer</i>)	NaCl 150 mM, NP-40 o Triton X-100 (1.0%), deoxicolato de sodio 0.5% (Sigma-Aldrich), SDS (Dodecil Sulfato de Sodio, 0.1%) y Tris (50 mM) disueltos en agua destilada y llevados a pH 8,0. Se agregaron los inhibidores enzimáticos detallados:		
	Inhibidor	Enzima inhibida	Cc final
	Aprotinina	Tripsina, Quimotripsina, Plasmina	2 µg/ml
	Leupeptina	Lisosomales	5-10 µg/ml
	Pepstatina A (en metanol, 1mM)	Proteasas aspárticas	1 µg/ml
	PMSF (en etanol)	Serín y cisteína proteasas	1 mM
	Fluoruro de sodio	Serín/Treonín Fosfatasas	5-10 mM

		Ortovanadato de sodio	Tirosina fosfatasas	1 mM
Reactivo de Lowry		Compuesto por 3 soluciones que se mezclan en el momento de su utilización. 50 ml de Solución A (Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M), 0,5 ml de Solución B (Sulfato cúprico al 1%) y 0,5 ml de solución C (Tartrato sódico-potásico al 2%).		
Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteu		Este reactivo viene preparado comercialmente y se debe mantener en refrigeración. Para su uso se diluye inmediatamente antes de su empleo en una relación de una parte de reactivo y una de agua destilada.		
Buffer Laemmli 2X		SDS (4%), β -mercaptoetanol (10%), glicerol (20%), azul de bromofenol (0.004%) y Tris HCl (0.125 M) disuelto en agua destilada. Se chequeó el pH y se lo llevó a pH 6.8.		
Geles de poliacrilamida	Gel de concentración (4%)	Acrilamida-bis acrilamida (4%) (Sigma-Aldrich), SDS (0,1%), Tris base (125 mM, pH 6,8), APS (0,1%). Preparado en agua destilada y con un agregado posterior de 0,1% del agente polimerizante TEMED.		
	Gel de separación (7,5%)	Acrilamida-bis acrilamida (7,5%), SDS (0,1%), Tris base (250 mM, pH 8,8), APS (0,1%). Preparado en agua destilada y con un agregado posterior de 0,1% del agente polimerizante TEMED.		
	Gel de separación (10%)	Acrilamida-bis acrilamida (10%), SDS (0,1%), Tris base (250 mM, pH 8,8), APS (0,1%). Preparado en agua destilada y con un agregado posterior de 0,1% del agente polimerizante TEMED.		
Buffer de corrida: Buffer Tris-Glicina		Glicina (190 mM), SDS (0,1%), Tris-HCl (25 mM, pH 8,3) en agua destilada.		
Buffer de transferencia		Glicina (190 mM), SDS (0,05%), Tris-HCl (25 mM, pH 8,3) y metanol (20% V/V) en agua destilada.		
Reactivo ECL “casero”		12 μ l de solución de Luminol (Luminol (Sigma) en DMSO, 91,67 mg/ml), 2 μ l de solución de ácido cumárico (ácido p-cumárico (Sigma) en DMSO, 28 mg/ml), 1,6 μ l de H ₂ O ₂ (30% V/V) y buffer Tris (100mM, pH 8,6) hasta alcanzar un volumen final de 5 ml.		
Buffer de stripping		β -mercaptoetanol (100 mM), SDS (2%), Tris-HCl (62.5 mM), llevado a pH 6.7.		

3.4. Cultivo celular

Todos los cultivos fueron incubados en sus correspondientes medios de cultivo en estufa a 37 °C y con una saturación de CO₂ del 5%.

3.4.1. Pasaje o repique de líneas celulares

Las líneas celulares fueron crecidas hasta alcanzar la densidad deseada. Para el mantenimiento de las líneas celulares en cultivo se debieron realizar pasajes sucesivos de las mismas. Con este fin, se retiró el medio agotado en el que las células se encontraban y se las lavó con PBS a 37 °C. Luego se agregó, de acuerdo a si se trataba de una placa o una botella de cultivo, 1 - 2 ml de solución Tripsina/EDTA (solución empleada para remover las células adheridas), se agitó la placa/botella suavemente en forma concéntrica de modo de asegurar que la solución entrara en contacto con toda

la superficie cultivada, y se la descartó. Se incubó la placa/botella de cultivo en estufa a 37 °C y 5% CO₂ durante 2-3 minutos hasta observar al microscopio que las células se redondeaban y se desprendían. Se agregó entonces el medio de cultivo fresco correspondiente para cada línea y se disgregaron las células cuidando de no generar espuma. Se tomó una alícuota de la suspensión de células y se la sembró en una placa/botella de cultivo plástica y estéril nueva a la que se le agregó previamente un volumen apropiado de medio de cultivo.

3.4.2. Crio-preservación de líneas celulares

Para conservar cada línea celular y mantener un stock de las mismas, una vez alcanzada una confluencia de 85 - 95%, las células fueron congeladas. Para ello, se retiró el medio agotado en el que las células se encontraban y se las lavó con PBS a 37 °C. Luego, de acuerdo a si se trataba de una placa o una botella de cultivo, se agregó 1 - 2 ml de solución Tripsina/EDTA, se agitó la placa/botella suavemente en forma concéntrica de modo de asegurar que la solución entrara en contacto con toda la superficie, y se la descartó. Se incubó la placa de cultivo en estufa a 37 °C y 5% CO₂ durante 2 o 3 minutos hasta observar al microscopio que las células se redondeaban y se desprendían. La placa/botella se colocó sobre una placa refrigerante, se le agregó medio de cultivo fresco correspondiente para cada línea enfriado en hielo y se disgregaron las células cuidando de no generar espuma. Se recolectó la suspensión celular obtenida en un tubo Falcon de 15 ml y se la centrifugó durante 2 minutos a 4 °C a 2000 rpm, con el fin de "lavar" las células, eliminando todo posible resto del medio agotado que los lavados con PBS no hubieran arrastrado. Se descartó el sobrenadante, se lo resuspendió en suero fetal bovino certificado (Gibco) enfriado previamente a 4 °C, y se incubó en hielo durante 5 minutos. A continuación, se agregó DMSO muy lentamente y homogeneizando constantemente de manera muy suave hasta alcanzar una concentración final del 5% (50 µl/ml), manteniendo la suspensión en hielo en todo momento. La suspensión se alicuotó en crioviales de 1 ó 1,5 ml, enfriados en hielo, y estos se colocaron en freezer a -20 °C durante 2 horas. En el caso de la línea NIH, los crioviales fueron finalmente almacenados en freezer a -70 °C, mientras que las células Rat1-b, luego de 2 horas en freezer a -70 °C, fueron trasvasadas a un tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

3.4.2.1. Recuperación de líneas celulares congeladas

Las células almacenadas en crioviales se descongelaron rápidamente en baño a 37 °C y se trasvasaron a un tubo Falcon de 15 ml con 2 ml del medio de cultivo fresco correspondiente. Posteriormente, esta suspensión fue centrifugada durante 2 - 3 minutos a velocidad mínima (1000 rpm), se descartó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en el medio de cultivo fresco correspondiente. Finalmente, las células fueron sembradas en placas o botellas de cultivo plásticas estériles.

3.5. Transfección de células

Las neuronas de hipocampo fueron transfectadas usando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a los 2 días de cultivo *in vitro* (DIV), habiendo sido sembradas en discos de vidrio para cultivo a una densidad de aproximadamente 5×10^4 células por placa p35. Brevemente, se recolectó el medio de cultivo de las neuronas y se lo mantuvo a 37 °C en incubadora junto con las células, a las que se les agregó medio OptiMEM. A continuación, 0,5 µg del plásmido pEGFP, 5 µg del plásmido pEGFP/Fz7-Myc, ó 4 µg del plásmido pEGFP/Fz7CRD-Myc, y 7 µl de LipofectAMINE 2000 se mezclaron con 125 µl de medio OptiMEM (GIBCO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego de una incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo protección de la luz, el complejo DNA-LipofectAMINE 2000 en medio OptiMEM (mezcla de transfección) se adicionó a las neuronas. Éstas fueron incubadas nuevamente a 37 °C. Luego de transcurrida una hora, se retiró la mezcla de transfección, se realizaron 3 lavados con PBS estéril a 37 °C, y se restituyó el medio de cultivo de las neuronas conservado a 37 °C.

Transcurridas 2 hs de finalizada la transfección, las neuronas fueron expuestas durante 16 horas a medio condicionado control o medio condicionado con Wnt7b⁴. Los medios control y condicionado fueron obtenidos de células Rat1-b control y Rat1-b transfectadas de modo estable, respectivamente. Finalmente, las neuronas fueron fijadas a los 3 DIV.

⁴ La ausencia y la presencia de Wnt7b-HA en los medios condicionados control y Wnt, respectivamente, fueron corroboradas en cada repetición independiente del experimento. Para ello, se tomó una alícuota de cada medio y se la procesó para su análisis mediante *Western blotting*, dirigiendo la inmunodetección hacia el epítopo HA con un anticuerpo primario de rata anti-HA (Roche).

Las células de la línea NIH también fueron transfectadas empleando LipofectAMINE 2000, una vez alcanzado un 60 - 70% de confluencia en placa p60. Las células fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP, pEGFP/Fz7-Myc o pshRNA_{Fz7}, o bien simplemente fueron expuestas al complejo reactivo. A diferencia de la transfección de neuronas, se empleó un volumen de 0,5 ml de mezcla de transfección, y la incubación de las células a 37 °C con la mezcla de transfección fue de 1 hora 30 minutos. Luego de 24 horas de concluida la transfección, las células se lisaron con *buffer* RIPA con inhibidores, la muestra proteica se cuantificó por el método colorimétrico de Lowry, y se le agregó un volumen apropiado de *buffer* de siembra 2X. A continuación, esta mezcla se fraccionó y cada fracción recibió diferentes tratamientos detallados en la primera parte del apartado RESULTADOS Y CONCLUSIÓN.

3.6. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata

Se emplearon los cerebros de embriones de ratas Sprague-Dawley de 19 días de gestación. Las ratas macho y hembra que actuaron como progenitores fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR. El manejo de los animales fue llevado a cabo de acuerdo a la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" del Instituto Nacional de Salud, EE.UU (NIH) y el "Reglamento para el manejo y uso de animales de laboratorio" de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. Además, el proyecto de investigación contó con la aprobación del Comité de Bioética en el Uso y Manejo de Animales de Laboratorio de la Facultad.

En los días de disección (día gestacional 19, E19), se mató una rata Sprague-Dawley preñada empleando un método de eutanasia aprobado. Se procedió a realizar la cesárea, extrayéndose ambos úteros, y obteniendo normalmente entre 6 y 12 embriones por rata. Se los colocó en una placa de Petri estéril a 0 °C. A continuación, trabajando en esterilidad bajo una campana de flujo laminar, se removieron los fetos del útero y se diseccionaron los cerebros con ayuda de material quirúrgico previamente esterilizado en alcohol al 70%. Los cerebros se colocaron entonces en una placa con CMF-HBSS. Se extirparon las meninges y se extrajeron los hipocampos bajo lupa estereoscópica binocular. Los hipocampos fueron recolectados en una placa con

CMF-HBSS a medida que eran extraídos. Una vez que se extrajeron todos los hipocampos, se los colocó en un tubo cónico de centrifugación y se agregó CMF-HBSS hasta alcanzar un volumen final de 4,5 ml. Hasta aquí se trabajó en hielo para evitar la degradación del tejido. A continuación, se agregó 0,5 ml de tripsina al 2,5% y se incubó durante 19-20 minutos en baño maría a 37 °C. Luego de 3 lavados con CMF-HBSS frío, el tejido se disoció mecánicamente en medio de plaqueo de neuronas, calentado previamente a 37 °C, mediante un pasaje gentil a través de pipetas Pasteur de vidrio con puntas de diámetro decreciente y pulidas a fuego. Se estimó la concentración de la suspensión obtenida a través del conteo de células empleando la cámara de Neubauer. Luego, las células fueron sembradas a distintas densidades en placas de cultivo plásticas o sobre cubreobjetos contenidos en placas de cultivo plásticas, previamente tratados con el sustrato de adhesión poli-L-lisina y equilibrados con medio de plaqueo. De acuerdo al experimento, las neuronas de hipocampo disociadas fueron sembradas en placas de cultivo p60 a una densidad de aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células por placa (densidad alta), o bien, fueron sembradas en placas p35 (4 cubre-objetos poli-L-lisinados por placa p35) a una densidad de aproximadamente 5×10^4 células por placa (densidad baja) en medio de plaqueo. Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37 °C con 5% de CO₂ (a fin de mantener estable el pH) durante 2 horas. Luego, se reemplazó el medio de plaqueo de neuronas por el medio definido de crecimiento neuronal y se continuó la incubación en estufa a 37 °C con 5% de CO₂. Este punto se consideró como el de inicio del cultivo.

3.7. Inmunocitoquímica

Las neuronas de hipocampo, cultivadas en cubreobjetos poli-L-lisinados contenidos en placas de cultivo p35, fueron lavadas 2 veces con PBS enfriado en hielo, fijadas con solución fijadora durante 20 minutos y permeabilizadas durante 5 minutos con Tritón X-100 al 0,2% en PBS. Luego de varios lavados con PBS enfriado en hielo, las células fueron incubadas con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) al 5% en PBS (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Acto seguido, las células se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios a 4 °C y en cámara húmeda. Las células fueron lavadas exhaustivamente con PBS y luego incubadas en oscuridad con una solución de anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente.

Luego de una serie de 3 lavados con PBS, los cubreobjetos (discos de vidrio con las células fijadas en su superficie) fueron montados en portaobjetos con el reactivo de montaje FluorSave (Calbiochem) para su posterior observación en microscopio confocal.

Los anticuerpos primarios empleados fueron un anticuerpo de conejo anti- β -III Tubulina (marcador específico para neuronas), en una concentración 1:5000, y un anticuerpo de ratón anti-Myc (ABCAM), en una concentración 1:3000, preparados ambos en albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) al 1% en PBS. El anticuerpo secundario anti-mouse, que se encontraba conjugado al fluoróforo Alexa 588, fue preparado a una concentración de 1:600 en albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich) al 1% en PBS.

3.8. Western Blot

3.8.1. Obtención y preparación de las muestras

Para preparar las muestras para correrlas en un gel, las células y los tejidos debieron lisarse para liberar las proteínas de interés lo cual solubiliza a las proteínas de modo que puedan migrar individualmente a través del gel de separación. Se emplearon protocolos diferentes para cultivos y tejidos.

3.8.1.1. Lisado de células en cultivo

Las placas de cultivo celular, ya sea de líneas establecidas o cultivo primario de neuronas, fueron colocadas en hielo y las células se lavaron con PBS frío. Se descartó el PBS, y habiendo agregado un volumen apropiado del *buffer* de lisis (*buffer* RIPA con inhibidores⁵), las células adherentes se rasparon empleando un raspador plástico de células. La suspensión celular así obtenida se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se incubó en hielo durante 15 minutos. Concluida la incubación en hielo, las células fueron disgregadas pasándolas lentamente 3 veces por una jeringa con aguja de 26G x 5/8" (descargando sobre la pared en cada repetición para no generar espuma), y luego se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Parte del sobrenadante fue

⁵ Permite la extracción de proteínas del citoplasma, proteínas de membrana y nucleares.

separado para efectuar la cuantificación de proteínas, mientras que al resto de la muestra se le agregó un volumen apropiado de *buffer* de siembra 2X, se mezcló utilizando vortex y se efectuaron distintos tratamientos de acuerdo a la identidad de las muestras (cultivo de líneas o cultivo primario). Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta volver a ser utilizadas.

3.8.1.2. Homogenado de cerebro

Se extrajo el cerebro completo de ratas en distintos estadios de desarrollo, se los pesó y depositó en un homogeneizador de tejido de volumen apropiado. Inmediatamente se agregó *buffer* RIPA con inhibidores, previamente enfriado a 0 °C, hasta alcanzar una relación final 1:20 (peso del cerebro en gramos : volumen de *buffer* de lisis en ml), y se llevó a cabo la disgregación mecánica del cerebro en un mortero inmerso en hielo. El homogenado se trasvasó a un tubo Falcon de 15 o 50 ml, de acuerdo al volumen del mismo, y se incubó en hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos (4 °C) con el objetivo de eliminar el tejido graso insoluble y restos de tejido de gran tamaño que no hayan logrado disgregarse. Se repartió el sobrenadante en varios tubos Eppendorf de 1,5 ml y se los centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos (4 °C) para remover los núcleos y restos celulares de gran tamaño. Se recuperó el sobrenadante y se determinó su concentración proteica.

3.8.1.3. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas en las muestras proteicas se realizó por el método de Lowry⁽³⁴⁾. Las medidas se efectuaron a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-640.

Se construyó, en paralelo, una curva de calibración con 4 a 12 µg finales de albúmina sérica bovina utilizando una solución testigo de BSA, 1mg/ml (Sigma-Aldrich) y 2 blancos diferentes:

- blanco para los valores de absorción de las soluciones de la curva de calibración: agua destilada.

- blanco para los valores de absorción de las soluciones de muestras incógnita: *buffer* RIPA con inhibidores, a fin de eliminar cualquier interferencia debida al *buffer* de lisis celular.

3.8.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Las proteínas se separaron de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 y 7,5% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10 y 7,5%) (Laemmli, 1970). Antes de la siembra, las muestras fueron desnaturalizadas calentándolas por un cierto tiempo luego del agregado del *buffer* de siembra. Las electroforesis se desarrollaron en equipos Miniprotean III (Bio-rad) a una intensidad constante de corriente aplicada de 30 mA por gel, utilizando *buffer* de corrida. Finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Para la preparación de las muestras previas al sembrado en el gel se utilizaron diferentes protocolos durante la puesta a punto de la técnica, como se detalla en 4.1.

3.8.3. Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) en una cuba de transferencia (Trans-blot, Bio-Rad) durante una hora con agitación permanente, a 4 °C y 300 mA de intensidad constante de corriente aplicada, en *buffer* de transferencia.

3.8.4. Inmunodetección de proteínas

Finalizada la transferencia de las proteínas a la membrana, ésta se trató con una solución de bloqueo para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Se probaron varias composiciones para la solución de bloqueo variando el tipo y concentración de agente bloqueante, utilizándose *buffer* T-TBS como vehículo (ver apartado 4.1.). Esta etapa de bloqueo se extendió durante una hora a temperatura ambiente con agitación continua. Luego, la membrana se incubó a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti Fz7 (rabbit, ABCAM; n. de catálogo: ab64636), anti-HA (rat,

Roche), anti-Myc (mouse, ABCAM; n. de catálogo: ab18185) o anti- β -Actina (mouse, BIO-RAD), cada uno diluido a una concentración particular y empleando distintos soluciones como vehículo de acuerdo a su identidad. Para ello, la membrana se colocó en una bolsa de plástico de tamaño apropiado, posteriormente sellada con calor. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se procedió a retirar la membrana de la bolsa y se efectuaron 3 lavados de 5 minutos con T-TBS para remover el anticuerpo primario residual. La membrana fue entonces incubada durante una hora a temperatura ambiente con una solución de anticuerpo secundario anti-rabbit, anti-mouse o anti-rat, de acuerdo a la identidad del anticuerpo primario. Al igual que con los primarios, los anticuerpos secundarios fueron diluidos a una concentración particular para cada uno, pero todos estaban conjugados a peroxidasa de rabanito (HRP) y para todos se empleó una solución de leche descremada en polvo de origen comercial al 0,2% en T-TBS como vehículo. Se repitieron los 3 lavados de 5 minutos con T-TBS. Todos los lavados y las incubaciones se realizaron con agitación suave y continua, excepto la incubación con el anticuerpo primario, para la cual se adhirió la bolsa que contenía la membrana y la solución de anticuerpo primario a un agitador tipo rocker colocado en heladera durante toda la noche.

3.8.5. Revelado

Una vez lavada, se dejó escurrir la membrana. Sobre su superficie se agregó 0,75 – 1 ml de solución ECL “casero”, preparado en el momento, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se escurrió nuevamente la membrana y se la colocó dentro de un folio en el interior de un cassette de revelado en cuarto oscuro con luz roja. Se expuso entonces un trozo de película de revelado (Hyperfilm ECL, Amersham) a la membrana durante un tiempo acorde a la intensidad de la señal fluorescente (generalmente, detectable a simple vista). Esta etapa de revelado concluyó quitando la placa radiográfica y empapándola con el reactivo revelador de placas radiográficas contenido en una bandeja. Se incubó aproximadamente 1 minuto moviendo la bandeja. Luego se transfirió la película a una bandeja con el reactivo detenedor (ácido acético al 5%), agitando durante aproximadamente 2 minutos. Se retiró la placa y se la empapó con el reactivo fijador de placas radiográficas. Finalmente, se lavó bien con agua corriente.

3.8.6. *Stripping* y re-sondeo de las membranas

Como control de carga para la técnica de *Western Blot* se emplearon los niveles de la proteína β -Actina. Ésta tiene un peso molecular de aproximadamente 43 kDa, muy semejante, dada la resolución que permite el gel, al peso molecular que observado para una de las fracciones del receptor Fz7. A pesar de la movilidad electroforética similar para el receptor Fz7 y la proteína cito-soluble β -Actina, nunca se efectuó un *stripping* de las membranas previo a la incubación con el anticuerpo primario anti- β -Actina. En cambio, se recurrió al re-sondeo directo de las mismas.

Para llevar adelante el re-sondeo secuencial de las membranas con el fin de clarificar o confirmar resultados, en primer lugar, a éstas se les efectuaron 2 lavados de 5 minutos en *buffer* T-TBS a temperatura ambiente, con agitación continua y empleando volúmenes grandes de la solución de lavado. Luego, se procedió de modo diferente de acuerdo a la disponibilidad de las instalaciones del laboratorio: si la membrana debió permanecer almacenada en solución T-TBS en heladera (2 - 8 °C) durante más de 48 horas, se volvió a bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación continua, en una solución de bloqueo adecuada para el anticuerpo primario a utilizar antes de repetir el protocolo de inmunodetección. Ahora bien, si no fue necesario esperar para volver a ensayar la membrana, ésta no se volvió a bloquear y se repitió el protocolo de inmunodetección directamente.

En algunos casos, según se detalla en el trabajo, se aplicó el protocolo de *stripping* para remover completamente los anticuerpos primario y secundario de la superficie de la membrana. Las membranas fueron sumergidas e incubadas en *buffer* de *stripping* durante 30 minutos a 50 °C con agitación ocasional (cada 10 minutos, en realidad). A continuación, se efectuaron 2 lavados de las membranas con *buffer* T-TBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación continua y empleando volúmenes grandes de la solución de lavado. Las membranas fueron bloqueadas nuevamente incubándolas durante una hora a temperatura ambiente y con agitación continua, con una solución de bloqueo adecuada para el anticuerpo primario a utilizar luego. Finalmente, se repitió el protocolo de inmunodetección.

3.9. Adquisición de imágenes y análisis estadístico

Las imágenes de las neuronas fueron adquiridas con el microscopio confocal Nikon Eclipse TE 2000-E y analizadas con el software ImageJ. Para evaluar la morfología celular, en cada experimento se midió la longitud dendrítica total, número total de ramificaciones dendríticas (total dendritic branching tip number, TDBTN), y número de dendritas primarias, secundarias y terciarias. Se cuantificaron sólo entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

Para la variable longitud total de las dendritas se aplicó la técnica de Análisis de la variancia (ANOVA) para un diseño bifactorial (proteínas a tres niveles y medio a dos niveles) y posteriormente comparaciones múltiples de Tukey. El cumplimiento de los supuestos exigidos por la técnica se probó a partir del análisis de los residuos, tanto para normalidad (prueba gráfica y test de Shapiro Wilk) como para igualdad de variancias (prueba gráfica y test de Bartlett). Para las variables TDBTN, DBTN primarias, secundarias y terciarias se aplicó el test de Kruskal-Wallis y posteriormente las comparaciones múltiples de Dunn. Se aplicó esta técnica no paramétrica, considerando seis niveles de un factor en estudio (tratamientos): GFP CCM, GFP WCM, FZ7 CCM, FZ7 WCM, CRD CCM, CRD WCM, por el no cumplimiento de los supuestos exigidos por la técnica ANOVA.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto de la técnica de *Western Blot*

El estudio de un receptor que media el efecto de una señal requiere, en primer lugar y de modo taxativo, situar a dicho receptor en tiempo y espacio. Es decir, debe observarse su presencia durante la manifestación de los efectos de la señal en el tejido u órgano blanco.

En general, al momento de comenzar el trabajo, la atención se centra sobre una serie de proteínas, en busca de una que cumpla con las condiciones necesarias para poder ser considerado receptor putativo. El análisis de los niveles de mRNA resulta útil para llevar adelante un primer sondeo y descartar aquellas proteínas cuyos transcritos no sean detectados en el tejido u órgano de interés, en este caso, el cerebro de rata (más precisamente, en el hipocampo). Ahora bien, detectado un transcripto en particular mediante cualquier técnica que sea lo suficientemente sensible (*Northern blot*, Ensayo de protección de la RNasa o RT-PCR) debe corroborarse que hubo traducción y que, efectivamente, la proteína se halla en el tejido en cuestión. A este fin, puede recurrirse a la técnica de *Western blot* dada su sensibilidad y especificidad una vez optimizada. Sólo luego, podrán hacerse inferencias acerca de su funcionalidad.

En este caso particular, por los motivos expuestos en la sección 1.5., el estudio se centró en uno sólo de los 10 miembros de la familia Frizzled, el receptor Fz7.

Por lo tanto, se realizó una puesta a punto de la detección del receptor Fz7 mediante *Western blot* trabajando con muestras que consistieron en lisados de células NIH3T3 que sobre-expresaban el receptor recombinante Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc) y homogenados de cerebro de rata de distintos estadios de desarrollo. Los resultados obtenidos se detallan a continuación. Al analizar estos resultados, se observó lo siguiente:

- En primer lugar, la intensidad de la señal obtenida luego de la incubación con los anticuerpos anti-Fz7 y anti-Myc fue variable, debiéndose modificar las soluciones utilizadas para el bloqueo de la membrana y como vehículo de los anticuerpos, según se describe en la sección 4.1.1.

- En segundo lugar, una vez lograda una detección tal que permitiera identificar bandas individuales, se observó la aparición de un bandeo variable entre experimentos (ver, por ejemplo, bandas señaladas con flechas rojas y verdes en **Figs. 7A y 7E**). Al respecto, de modo de facilitar la comprensión de las imágenes y el texto asociado, cabe destacar que:
 - a. Independientemente del anticuerpo utilizado, se detectó una banda de 50 kDa (señalada con una flecha verde en cada *blot*, **figs. 7 a 10**) y una banda al inicio del gel de separación ($PM \geq 250$ kDa, señalada con una flecha roja en cada *blot*, **figs. 7 a 10**). Esta última podría ser producto de la multimerización o la aglutinación del receptor y fue el principal problema que intentó solucionarse en esta puesta a punto, según se describe en la sección 4.1.2.
 - b. En algunos casos, también independientemente del anticuerpo utilizado, se observó la aparición de una banda correspondiente a un PM de entre 75 y 100 kDa (señalada con una flecha turquesa en **Figs. 1B, 1E, 8C y 9B**). Esta banda sería coherente con lo reportado por el fabricante del anticuerpo anti-Fz7, que señala que, a pesar de ser Fz7 una proteína de un PM predicho de ~64 kDa, se detecta a 85 kDa. También se reporta la observación de una banda adicional a 90 kDa cuya identidad se desconoce (<http://www.abcam.com/frizzled-7-antibody-ab64636.html>). Una explicación posible de la aparición de bandas de un PM diferente al predicho es la existencia de modificaciones post-traduccionales como la glicosilación⁶. De hecho, existen sitios putativos de glicosilación en los bucles extracelulares de los receptores Frizzled, que podrían estar involucrados en la unión del ligando y son importantes para la maduración del receptor en el retículo endoplasmático⁽⁹⁾. También se han reportado uno o más sitios potenciales para la adición de carbohidratos complejos, conservados estos en todos los miembros de la familia Frizzled⁽⁷¹⁾. Sin embargo, Fz7 se detectó consistentemente como una banda de 50 kDa (en estado monomérico) durante el desarrollo del presente trabajo experimental (flechas verdes en **figs. 7, 8, 9 y 10**).

⁶ Esta hipótesis es fácilmente comprobable sometiendo los lisados celulares al tratamiento con un enzima deglicosilante y observando si tiene lugar un cambio en la migración del receptor.

- c. El receptor Fz7 exhibe una migración anómala, incluso en relación a lo reportado por el proveedor del anticuerpo policlonal utilizado para su detección (<http://www.abcam.com/frizzled-7-antibody-ab64636.html>). El motivo por el cual el tamaño observado es diferente al predicho podría residir en que la migración, además de depender del volumen de la proteína, también se ve afectada por otros factores, tales como su carga relativa, que depende de su composición aminoacídica. Es posible que Fz7 tenga una proporción muy alta de aminoácidos cargados y que éstos tengan un comportamiento ácido al pH de corrida. Una explicación más plausible es que puede que la proteína no logre desplegarse por completo bajo las condiciones empleadas, comportándose como una proteína más pequeña.
- d. Ocasionalmente, se detectaron bandas por debajo de 50 kDa (bandas por debajo de 37 kDa en calles 1, 2, 3, 4 y 5 en **fig. 8. A** y en calles 1, 2 y 3 en **fig. 9 A**). Éstas fueron detectadas en lisados de células NIH3T3 pero no en homogenados de cerebro. El significado de la aparición de esta banda es desconocido, pero podría deberse a reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo⁷ o a una degradación parcial de la proteína. También existe la posibilidad de que sean producto del corte del receptor, tal vez, como parte de una vía de señalización, tal como se ha reportado la para el receptor DFrizzled2 en las terminales post-sinápticas de *Drosophila*⁽⁴⁰⁾.
- e. Las bandas que se tuvieron en cuenta para el análisis de los efectos del tratamiento fueron las bandas de 50 y de 250 kDa. La elección se basó no sólo en la correspondencia en la detección con los 2 anticuerpos primarios (el

7 Puede que se trate de inespecificidades producto de:

- haber sembrado 20-25 µg de proteína total por calle. El data sheet de ABCAM menciona el empleo de tan solo 10 µg de proteína total por calle (<http://www.abcam.com/frizzled-7-antibody-ab64636.html>).
- el anticuerpo primario empleado para su detección mediante *western blot* fue un anticuerpo policlonal, desarrollado en conejo mediante el empleo como inmunógeno de un péptido sintético, que se extiende desde el residuo 550 hasta el extremo C-terminal del receptor Fz7 humano, conjugado a KLH (<http://www.abcam.com/frizzled-7-antibody-ab64636.html>).
- pueden estar detectándose otros receptores de la familia Fz debido al alto grado de homología. Por ejemplo, los genes Frizzled-7 y Frizzled-3 humanos, muestran un 98,8% de identidad nucleotídica y codifican para receptores Wnt casi idénticos con sólo 9 sustituciones aminoacídicas⁽²⁷⁾.

dirigido hacia el extremo C-terminal del receptor Fz7 humano wild-type y el desarrollado contra el tag Myc que llevaba el receptor transgénico), sino también en la correspondencia entre los resultados obtenidos con los lisados de fibroblastos y los homogenados de cerebro de rata a través de los ensayos. No obstante, la reproducción de este patrón de dos bandas, una a 50 y otra a 250 kDa, fue relativa: hubo casos en los que una o ambas bandas no se observaron en calles de la misma membrana (variación intra-ensayo), o bien en distintos experimentos (variación inter-ensayo), independientemente del tipo de muestra.

4.1.1. Bloqueo de membrana y soluciones de anticuerpos.

Un paso fundamental en la técnica de *Western blot* es el bloqueo de la membrana, que previene la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y/o secundarios a la misma. Tradicionalmente se utilizan 2 tipos de agentes bloqueantes disueltos en *buffer* TBS o PBS: leche descremada o albúmina sérica. A su vez, las soluciones de anticuerpos a los que se expone la membrana contienen estos mismos agentes en su composición. Es por eso que la elección del tipo y concentración del agente bloqueante es crítica para la eficiencia de la detección, ya que pueden darse interacciones inespecíficas entre el agente bloqueante y los anticuerpos utilizados que produzcan una disminución en la intensidad y/o resolución de la señal.

Durante la puesta a punto de la técnica para el presente trabajo, se enfrentaron numerosos inconvenientes derivados de reacciones cruzadas entre los anticuerpos y los agentes bloqueantes. En primer lugar, se observó que, por razones desconocidas, algunos anticuerpos daban una señal más intensa en membranas bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) que en membranas bloqueadas con leche descremada. Además, se detectaron diferencias en intensidad y resolución de la señal dependientes de la marca de leche descremada utilizada en las soluciones de anticuerpo. Debido a ello, debieron probarse distintos agentes bloqueantes (distintas marcas de leche descremada, albúmina sérica bovina y albúmina sérica humana) y distintas concentraciones de los mismos para el paso de bloqueo de la membrana, así como distintos agentes bloqueantes y distintas concentraciones de estos en las soluciones de

anticuerpo primario y secundario. Se realizaron una serie de experimentos de puesta a punto que permitieron concluir que las condiciones óptimas eran:

- **Bloqueo:** una hora a T_{AMBIENTE} con BSA al 5% en *buffer* TBS-Tween (0,05%).
- **Anticuerpo primario:** Tween20-TBS-BSA(1%) para la solución de anticuerpo policlonal anti-Fz7.

Tween20-TBS-leche descremada(1%) para cualquier otra solución de anticuerpo primario utilizado (anti-myc y anti- β -actina).

- **Anticuerpo secundario:** T-TBS-leche descremada(0,2%) para cualquier solución de anticuerpo secundario utilizado (anti-rabbit y anti-mouse)

Este diseño permite ahora disponer de condiciones apropiadas para futuros estudios del receptor Fz7 utilizando estos anticuerpos.

4.1.2. Tratamiento de la muestra.

Los anticuerpos utilizados para la detección mediante *Western blot* normalmente reconocen una pequeña porción de la proteínas de interés (epítipo). Este dominio puede encontrarse oculto dentro de la conformación tridimensional de la proteína. Para permitir el acceso del anticuerpo a esta porción es necesario desplegar la cadena polipeptídica, es decir, desnaturalizar la proteína, como paso previo a la siembra de la muestra.

En el presente trabajo, debido a las dificultades enfrentadas a la hora de detectar el receptor Fz7, debieron evaluarse varios tratamientos diferentes previos a la siembra de la muestra en el gel. Como control positivo se recurrió al empleo de lisado de células NIH3T3 transfectadas transientemente de modo de sobre-expresar al receptor transgénico Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc). Luego del agregado del *buffer* de siembra y posterior calentamiento, la muestra NIH3T3 Fz7-Myc se sembró en idénticas cantidades a ambos lados de la calle en la que se sembró el marcador de peso molecular. Una vez transferidas las proteínas del gel, la membrana se bloqueó y se cortó por la mitad de la calle del marcador. Luego, cada parte fue incubada por separado con diferentes anticuerpos primarios, uno con capacidad de reconocer

secuencia del extremo C-terminal original del receptor Fz7 humano y otro con capacidad de unión al epítipo Myc en el extremo C-terminal del receptor transgénico. La incubación con este último anticuerpo primario fue, en definitiva, lo que actuó como control positivo. A lo largo de los distintos ensayos, se corrieron, además, otras muestras cuyos resultados podían ser de utilidad para algunos de los objetivos específicos de la tesina en caso de obtenerse resultados concluyentes en esta etapa de puesta a punto. Estas muestras, sin embargo, no fueron tratadas de la misma manera que las mencionadas anteriormente, sino que recibieron el tratamiento estándar previo a la siembra: fueron hervidas a 100 °C durante 5 minutos. La identidad de dichas muestras se detalla al pie de cada figura en la que se hayan analizados.

El protocolo estándar de SDS-PAGE recomienda, para desnaturalizar las muestras proteicas, que se las mezcle con el *buffer* de siembra conteniendo el detergente aniónico y desnaturalizante dodecil sulfato de sodio (SDS) y se las incube, a continuación, durante 5 minutos a 95 – 100 °C. Sin embargo, en el presente trabajo esta temperatura de incubación fue inicialmente reducida a 85°C con la intención de prevenir una posible degradación de las proteínas (**Fig. 7**).

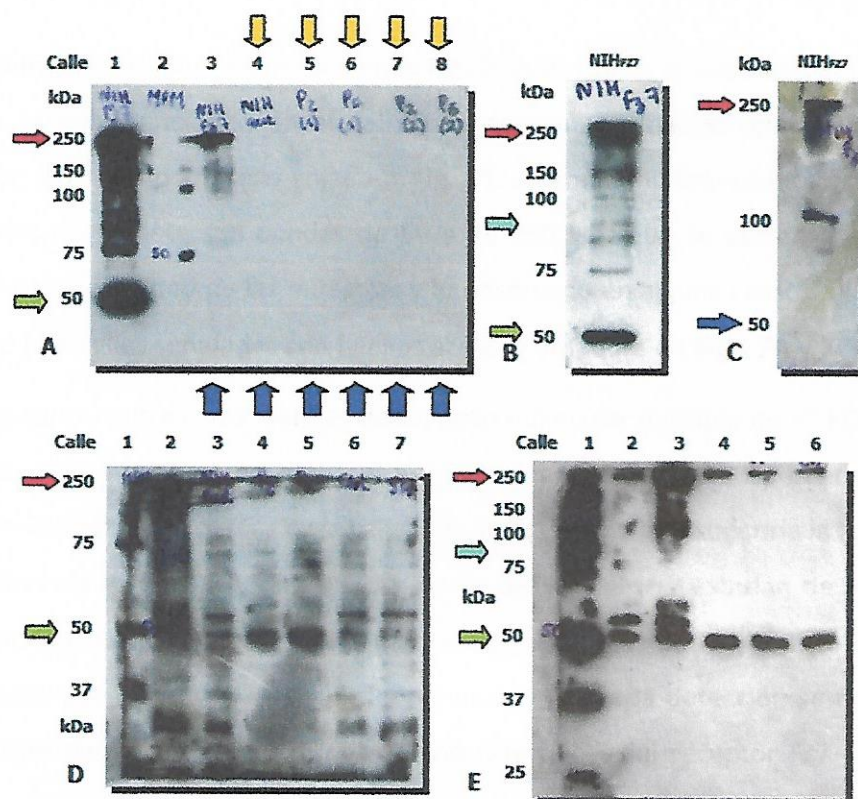


Fig. 7. Puesta a punto de la detección del receptor *Fz7* mediante la técnica *western blot*. (A) Ref. 1: lisado de células NIH3T3 transfectadas transientemente para sobre-expresar el receptor *Fz7*-Myc (NIH3T3 *Fz7*-Myc). 2: Marcador de peso molecular (M.P.M). 3: NIH3T3 *Fz7*-Myc. 4: NIH3T3 control del nivel endógeno del receptor en esta línea (lisado de cultivo de células de la línea NIH3T3). 5: homogenado de cerebro de neo-nato de 2 días de vida. 6: homogenado de cerebro de neo-nato de 6 días de vida. 7: homogenado de cerebro de neo-nato de 2 días de vida. 8: homogenado de cerebro de neo-nato de 6 días de vida. La detección en la calle 1 fue dirigida hacia el epítipo Myc mientras que la detección en las calles 2 a 8 fue efectuada con el anticuerpo policlonal anti-*Fz7*. (B) Calle 1 de (A) al reducir el tiempo de exposición de la película fotográfica a la membrana. (C) 1: NIH3T3 *Fz7*-Myc. Detección dirigida hacia el epítipo Myc. (D) 1: M.P.M. 2: NIH3T3 *Fz7*-Myc. 3: Control del nivel endógeno del receptor en la línea celular NIH3T3. 4: homogenado de cerebro de neo-nato de 2 días de vida. 5: homogenado de cerebro de neo-nato de 6 días de vida. 6: NIH3T3, control del nivel endógeno del receptor en esta línea siendo expuesto el cultivo al mismo tratamiento de transfección pero sin DNA. 7: lisado de cultivo de células NIH3T3 transfectadas transientemente con un plásmido que codifica para un shRNA dirigido específicamente contra *Fz7*. La detección fue efectuada con el anticuerpo policlonal anti-*Fz7*. (E) 1: M.P.M. 2: NIH3T3 control del nivel endógeno del receptor en esta línea. 3: NIH3T3 *Fz7*-Myc. 4: homogenado de cerebro de neo-nato de 2 días de vida. 5: homogenado de cerebro de neo-nato de 6 días de vida. 6: homogenado de cerebro de neo-nato de 13 días de vida. Este experimento no contó con su control positivo. La detección fue efectuada con el anticuerpo policlonal anti-*Fz7*. Se sembraron 20 µg de proteína total por calle en cada experimento. Todas las muestras fueron calentadas durante 5 minutos a 85 °C.

Los resultados iniciales, mostrados en la **Fig. 7**, indicaron que una fracción del receptor Fz7 no estaría ingresando en el gel de separación, quedando retenida en la parte superior del mismo (flechas rojas en **Fig. 7**). Además, es importante notar que en ocasiones no se detectan bandas de 50 y de 250 kDa que se esperaba observar de acuerdo a la identidad de las muestras y lo observado en algunos casos para el control positivo (ver calles señaladas con flechas azules y amarillas en **Figs. 7A y 7C**)⁸.

Se detectaron, entre otras, bandas de un peso molecular múltiplo de 50 kDa tanto con el anticuerpo anti-Myc como con el anticuerpo anti-Fz7 (notar las bandas de ~100, ~150 y ~200 kDa en **Fig. 7B** y en la calle 3 de la **Fig. 7E**), lo que sugeriría la formación de homodímeros y homo-multímeros por parte del receptor y estarían de acuerdo con datos previos respecto al comportamiento electroforético de Fz7⁽²⁴⁾. Esto podría estar promovido por la sobre-expresión del receptor: cuando la detección se realiza con el anticuerpo desarrollado contra el extremo C-terminal del receptor Fz7 wild-type de rata, la detección de las bandas que corresponderían a dímeros y multímeros, se observa en lisados de células NIH3T3 transfectadas con el plásmido pEGFP/Fz7-Myc pero no en lisados de células NIH3T3 sin transfectar (comparar calles 2 y 3 en **Fig. 7E**) ni en homogenados de cerebro de rata de distintos estadios de desarrollo (comparar calles 3 con calles 4, 5 y 6 en **Fig. 7E**).

Ahora bien, inicialmente se postuló que la fracción del receptor que no ingresaba en el gel de separación podría ser producto de una desnaturalización incompleta del mismo debido a la reducción de la temperatura de incubación previa a la siembra. Sin embargo, existen protocolos que indican que calentar a 70 °C durante 5 – 10 minutos no sólo es también aceptable sino que incluso puede ser preferible para el caso en que la proteína en estudio sea de múltiple paso transmembrana, ya que este tipo de proteínas tienden a agregar al hervirse y puede que los agregados no entren en el gel eficientemente (<http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-Electroforesis-protocolos.pdf>; <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>).

⁸ Este problema de detección no homogénea a lo largo de la superficie de la membrana luego se repetiría en otros experimentos, incluso en los que se efectúa control de carga, en los que nuevamente no logran detectarse proteínas que deberían estar en la muestra y que, de hecho, son detectadas en calles aledañas del mismo gel.

A fin de ensayar la posibilidad de que la muestra no se haya desnaturalizado por completo y la posibilidad de que la proteína haya formado agregados al hervirse, se probaron tres condiciones diferentes de incubación previo a la siembra (**Fig. 8**). La variabilidad entre tratamientos radicó sólo en el tiempo y temperatura de incubación tras el agregado del *buffer* de siembra. Para ello, una vez que se dispuso de la muestra proteica (un lisado de cultivo de células NIH3T3 transfectadas en forma transiente para sobre-expresar el constructo Fz7-myc), y luego de agregado un volumen adecuado de *buffer* de siembra 2X, se fraccionaron las mezclas en partes iguales, tantas como condiciones se deseaban comparar, y se aplicó un tratamiento diferente a cada una. Los volúmenes sembrados fueron siempre los mismos a fin de asegurar una variación mínima en la cantidad de la proteína total por calle, si bien necesariamente se debió efectuar un control de carga para corroborarlo. Los tres procesamientos probados fueron:

- **Incubación durante 5 minutos a 100 °C** con el objeto de lograr una desnaturalización completa en el caso de que la incubación a 85 °C durante 5 minutos en el experimento anterior haya sido insuficiente.
- **Incubación durante 5 minutos a 70 °C** con el fin de reducir o eliminar el aglutinamiento, si éste fuera la explicación para la fracción que quedó retenida en la parte superior del gel.
- **Incubación durante 8 minutos a 70 °C** de manera de descartar que el problema haya sido una desnaturalización demasiado brusca.

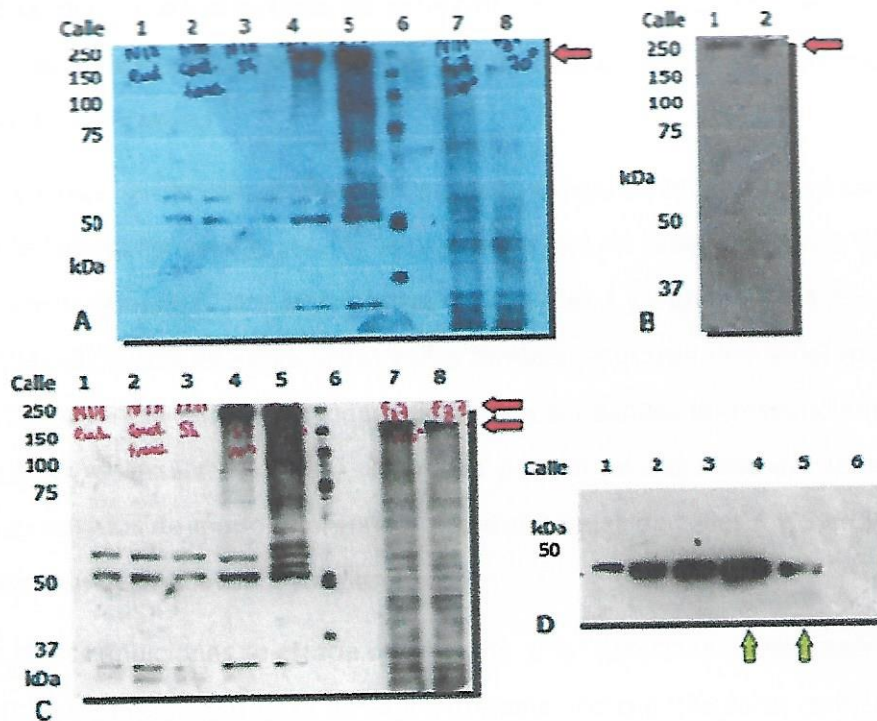


Fig. 8. Efecto de la temperatura de desnaturalización de las muestras sobre la resolución del receptor Fz7-myc en geles desnaturalizantes. (A) Ref: 1: control del nivel endógeno del receptor en la línea NIH3T3 (lisado de células de la línea NIH3T3). 2: control del nivel endógeno del receptor en la línea NIH3T3 siendo expuesto el cultivo al tratamiento de transfección pero sin DNA. 3: lisado de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que codifica para un shRNA dirigido específicamente contra Fz7. Las muestras de las calles 1, 2 y 3 fueron hervidas 5 minutos a 100 °C. 4: lisado de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que sobre-expresa el constructo Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc). La muestra fue hervida 5 minutos a 100 °C. 5: NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue calentada 5 minutos a 70 °C. 6: M.P.M. 7: misma muestra corrida en calle 4. 8: misma muestra corrida en calle 5. La detección en las calles 1 a 6 fue efectuada con el anticuerpo policlonal anti-Fz7. Las calles 7 y 8 fueron incubadas con una solución del anticuerpo anti-Fz7 reciclada. (B) 1: misma muestra corrida en la calle 4 de (A). 2: NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue calentada 8 minutos a 70 °C. Esta membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal dirigido contra el tag Myc. (C) misma membrana que en (A) pero habiendo reducido en tiempo de exposición a la mitad. Las muestras corridas en las calles 4 y 5 en (A) y en la calle 2 en (B) proceden de la misma muestra de células NIH3T3 original. Ésta fue fraccionada luego del agregado del buffer de siembra y cada fracción recibió un tratamiento particular según lo detallado. (D) Ídem calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en (A), es decir, se trata de la misma membrana, sólo que en este caso fue incubada con anticuerpo primario anti-β-Actina. Se sembraron 20 µg de proteína total por calle.

Los resultados indican que al menos una fracción del receptor Fz7 (al menos, el receptor transgénico, revelado con al anticuerpo anti-Myc) quedó retenida en la parte superior del gel de separación (flechas rojas en Fig. 8). Dada la señal intensa

observada, que saturó el sistema de detección, no pudo evaluarse si el cambio en el tratamiento de la muestra previo a la siembra tuvo algún efecto, pero se concluyó que, si existía, éste era menor.

Aparentemente, la fracción retenida al comienzo del gel de separación es considerable y variable (comparar bandas señaladas con flecha roja en calles 1 a 5 en la **fig. 8A**). No parece existir retención para las muestras de las calles 1 y 2 en la **fig. 8A**. Sin embargo, al efectuar el control de carga, estas calles también acusaron una señal menor de β -actina. De hecho, la falta de homogeneidad para las bandas correspondientes a la β -actina (peso molecular: ~ 42 kDa) observada para el mismo volumen de las mismas muestras tratadas de modo diferente (comparar bandas de calles 4 y 5 en la **Fig. 8D** - señaladas con flechas lavanda) sugieren que:

- a. bajo estas condiciones se estaría observando una “detección no homogénea” y, por lo tanto, no podría extraerse de esta estrategia una cuantificación confiable. Por lo tanto, la variación de intensidad de la misma banda entre diferentes calles también podría deberse a la falta de homogeneidad en la detección y no a una diferencia real en la cantidad de proteína presente en las muestras. O bien,
- b. la diferencia de temperatura y tiempo de incubación tendría un efecto marcado en el comportamiento de proteínas solubles como la β -Actina. Sin embargo, esto es poco probable, dado que la desnaturalización de proteínas ocurre aún cuando éstas sean incubadas con SDS a temperatura ambiente.

Descartada la explicación **b**, queda discutir la posibilidad **a**. De tratarse de dispersión experimental no evidente, ésta probablemente radique en la incubación de la membrana con un volumen demasiado pequeño de la solución del anticuerpo primario. Se esperaría que la falta de homogeneidad en la detección se resolviera recurriendo al modo estándar de incubación de la membrana con la solución de anticuerpo primario. Es decir, debería de colocarse la membrana ya bloqueada en un recipiente de un tamaño que permita que la membrana se desplace sobre la solución del anticuerpo (un volumen de ~ 6 ml) al aplicar agitación continua. Esto aseguraría un contacto uniforme entre la solución y la membrana, garantizando que no haya áreas más ni menos expuestas al anticuerpo.

En cuanto al problema de la fracción retenida al principio del gel de separación, existen protocolos alternativos, aplicados para la detección de otros miembros de la familia de receptores Frizzled, que consisten en una incubación de la muestra durante 10 minutos a 60-65 °C⁽²⁴⁾ o de 15 minutos a 37 °C⁽¹⁴⁾ tras el agregado del *buffer* de siembra. Luego del fracaso del último intento de mejorar la corrida, se procedió a probar el efecto de ambos tratamientos en el comportamiento electroforético del receptor Fz7. Al igual que en el experimento anterior, luego del agregado de un volumen apropiado de *buffer* de siembra 2X a una muestra proteica obtenida por lisis de cultivos de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que sobre-expresa al receptor transgénico Fz7-Myc, se sometió a cada fracción a uno de 3 tratamientos posibles tras el agregado del *buffer* de siembra. Las condiciones testeadas fueron:

- Incubación de 5 minutos a 100 °C.
- Incubación de 10 minutos a 60 °C.
- Incubación de 15 minutos a 37 °C.

Estas condiciones fueron probadas con el objetivo de determinar si una entrega paulatina de calor a la muestra tiene un efecto positivo en la desnaturalización y solubilización efectiva del receptor Fz7. Los resultados se muestran en la **Fig. 9**.

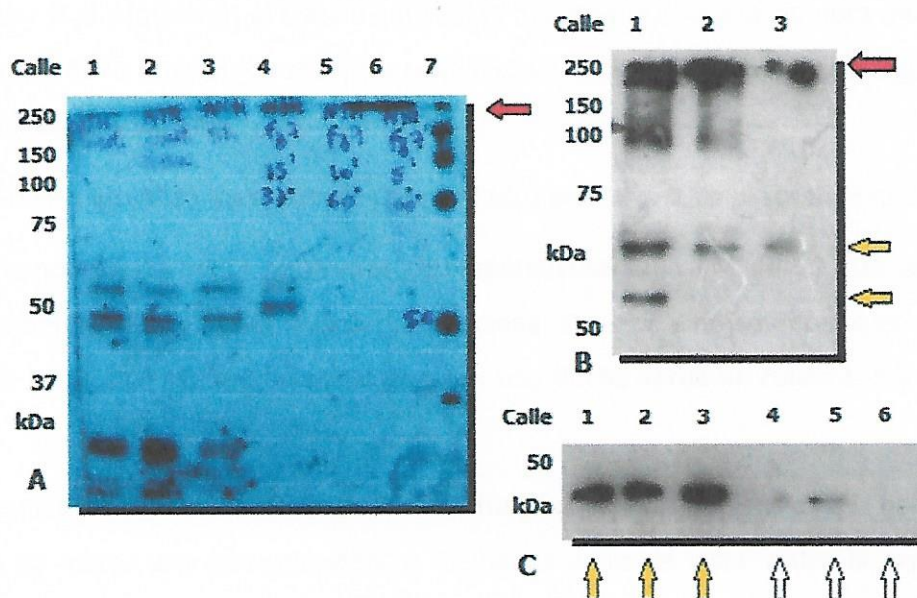


Fig. 9. Resultados de la aplicación de los tratamientos alternativos reportados para otros miembros de la familia Frizzled. (A) Ref: 1: control del nivel endógeno del receptor en la línea NIH3T3 (cultivo de células de la línea NIH3T3). **2:** control del nivel endógeno del receptor en la línea NIH3T3 siendo expuesto el cultivo al tratamiento de transfección pero sin DNA. **3:** cultivo de células NIH3T3 transfectadas en forma transientes con un plásmido que codifica para un shRNA dirigido específicamente contra Fz7. Estas 3 muestras fueron hervidas 5 minutos a 100°C. **4:** muestra obtenida a partir de un cultivo de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que sobre-expresa al constructo Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc). La muestra fue incubada 15 minutos a 37 °C. **5:** NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue calentada 10 minutos a 60 °C. **6:** NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue hervida 5 minutos a 100 °C. **7:** M.P.M. Las muestras corridas en las calles 4, 5 y 6 proceden de la misma muestra de células NIH original. Ésta fue fraccionada y cada fracción recibió un tratamiento particular según lo detallado. La detección fue efectuada con el anticuerpo policlonal anti-Fz7 adquirido de ABCAM. **(B) 1:** M.P.M. **2:** NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue incubada 15 minutos a 37 °C. **3:** NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue calentada 10 minutos a 60 °C. **4:** NIH3T3 Fz7-Myc. La muestra fue hervida 5 minutos a 100 °C. Estas 3 muestras son las mismas corridas en las calles 4, 5 y 6 en (A), sólo que en este caso, la membrana es incubada con un anticuerpo primario anti-Myc lo cual permitiría, en principio, detectar únicamente al receptor transgénico. **(C) Ídem (A),** es decir, se trata de la misma membrana, pero en este caso es incubada con anticuerpo primario anti-β-Actina. Se sembraron 20 µg de proteína total por calle.

Nuevamente, se observa que una fracción del receptor Fz7 queda retenida en la parte superior del gel de separación en todas las condiciones probadas, tanto cuando la detección se realiza utilizando un anticuerpo anti-Fz7 como cuando se utiliza un anticuerpo anti-Myc (flechas rojas en Figs. 9A y 9B, respectivamente). No se pudo

evaluar si el cambio en el tratamiento de la muestra previo a la siembra modificó de algún modo la fracción de receptor retenida, sin embargo a simple vista sigue siendo considerable y variable.

Del análisis visual de los resultados presentados en la **Fig. 9**, se desprende que:

- la banda previamente observada correspondiente a un PM de 50 kDa se detectó únicamente al emplear el anticuerpo policlonal anti-Fz7 y no se detectó en todas las calles (comparar las bandas señaladas con una flecha verde en calles 4, 5 y 6 en **Fig. 9A**).

- que en aquellas calles donde efectivamente se observa la presencia de la banda de 50 kDa, no existe una correspondencia, al menos a simple vista, entre la cantidad de proteína retenida al principio del gel de separación y la cantidad que efectivamente ingresa. Al realizarse la detección utilizando el anticuerpo anti-Fz7 de ABCAM, parece existir un aumento en la fracción retenida a medida que aumenta la temperatura de incubación, lo cual sería congruente con la desaparición observada de la banda a 50kDa (comparar bandas de 50 y 250 kDa en calle 4 con calles 5 y 6 en **Fig. 9A**). Sin embargo, al realizar la detección utilizando el anticuerpo anti-Myc, no sólo no se observó la banda de 50 kDa en ninguna de las 3 calles, sino que, a simple vista, la fracción retenida no parece guardar la misma relación con la temperatura de incubación (comparar bandas señaladas con flecha roja en calles 1, 2 y 3 de la **Fig. 9B**).

- en la detección con el anticuerpo anti-Myc se observan 2 bandas entre 50 y 75 kDa (señaladas por flechas amarillas en **Fig. 9B**). Una de ellas podría ser la proteína Myc endógena (la proteína c-Myc tiene 439 aminoácidos y un peso molecular estimado de 49 kDa, pero generalmente se detecta como una banda de entre 57 y 70 kDa - <http://www.scbt.com/datasheet-40-c-myc-9e10-antibody.html>), y la otra banda podría tratarse de un producto de degradación del receptor transgénico o bien un producto de degradación de la proteína c-Myc endógena. Por supuesto, siempre es posible una detección inespecífica del anticuerpo primario, pero en este caso la inespecificidad es poco probable por tratarse de un anticuerpo comercial monoclonal ampliamente utilizado en este tipo de ensayos.

- al igual que lo observado en la **Fig. 8C**, se obtuvo una detección diferencial para las bandas correspondientes a la β -Actina (comparar, en la **Fig. 9C**, bandas señaladas por flechas amarillas en las calles 1, 2 y 3 con las bandas señaladas por flechas blancas en calles 4, 5 y 6). Notar que nuevamente las variaciones en la detección se dan incluso para muestras cuya única diferencia consiste en el tratamiento recibido luego del agregado del *buffer* de siembra (comparar entre sí las bandas señaladas por flechas blancas en calles 4, 5 y 6 en **Fig. 9C**).

A partir de estos resultados, se probaron varias modificaciones en el diseño experimental en forma simultánea. Si bien este proceder no es útil para descartar las posibles explicaciones de la exclusión de una fracción del receptor, los ensayos se realizaron con la intención de solucionar este problema o, al menos, hacer inferencias respecto a su naturaleza. Las modificaciones ensayadas fueron:

- se trabajó con homogenados de cerebro en lugar de lisados de células NIH3T3 transfectadas de modo de sobre-expresar el constructo Fz7-Myc. Esta modificación tiene la ventaja comparativa de evitar cualquier posible artificio en la detección de Fz7 derivado de su sobre-expresión. Sin embargo, tiene a su vez la desventaja de que se espera que el anticuerpo utilizado, anti-Fz7, tenga menor fidelidad que el anticuerpo anti-Myc por ser policlonal.
- Por otro lado, teniendo en cuenta que son ampliamente conocidos los inconvenientes para resolver proteínas de membrana por PAGE-SDS y otros métodos de análisis, especialmente aquellas con pasos transmembrana⁽⁶¹⁾ y que una de las posibles soluciones al problema es no hervir las muestras, se decidió probar esto mismo con el receptor Fz7, dado que, por análisis predictivo, éste es un receptor multi-paso⁽⁶⁰⁾.
- A fin de aumentar la resolución en la parte superior del gel, se decidió correr las muestras en un gel con un contenido de acrilamida del 7,5%. De esta manera, se intentó determinar si existían asociaciones supra-moleculares del receptor Fz7 en forma de homo- y/o heteromultímeros.⁹ Así, la presencia de bandas

⁹ Los dominios CRD de diferentes receptores Fz son capaces de interactuar entre sí^(11, 58) y con los dominios CRD de otras proteínas. Además, se ha reportado que los miembros Fz1, 2, 4, 7 y 9

correspondientes a especies con pesos moleculares aproximadamente múltiplos de 50 kDa indicaría que el problema de ingreso al gel de separación se debe a la formación de homo-multímeros (en principio, de orden superior a 4 - 5) y no al aglutinamiento del receptor.

- Por último, para descartar que los problemas de detección se debieran a una preparación incorrecta del reactivo empleado en la etapa de revelado, se compararon los resultados obtenidos con ECL comercial y ECL casero.

Los resultados obtenidos en la corrida luego de estas modificaciones experimentales se presentan en la Fig. 10.

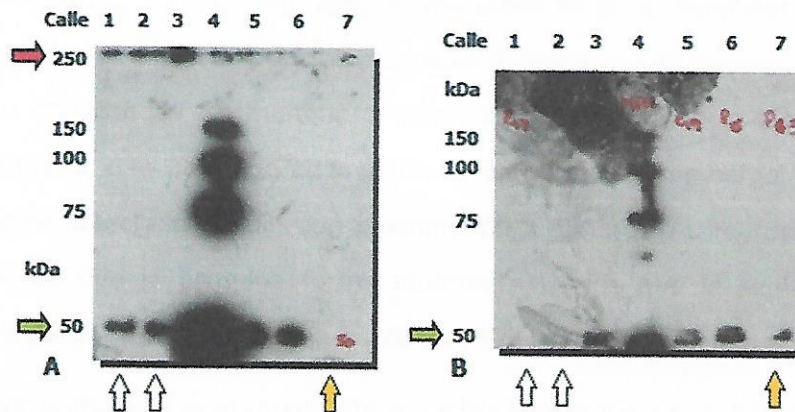


Fig. 10. Efecto de la temperatura de desnaturalización y del sistema de revelado sobre la resolución de Fz7 en PAGE-SDS. (A) 1: homogenado de cerebro de embrión de rata de 19 días de gestación (E19). **2:** homogenado de cerebro de rata de 6 días de vida (P6). **3:** homogenado de cerebro de rata de 13 días de vida (P13). Estas 3 muestras fueron hervidas 5 minutos a 100 °C. **4:** M.P.M. **5:** homogenado de cerebro de embrión de rata de 19 días de gestación (E19). **6:** homogenado de cerebro de rata de 6 días de vida (P6). **7:** homogenado de cerebro de rata de 13 días de vida (P13). Estas 3 muestras no fueron hervidas

oligomerizan al ser sobre-expresados en células 293T⁽²⁴⁾: al parecer, aquellos Fzs que más similares en su secuencia aminoacídica interactúan en mayor medida excepto por Fz7, el cual interactuó con todos los otros Fzs ensayados. Estas observaciones indican que a pesar que la homo-oligomerización es probablemente una propiedad general de los Fzs, existe alguna selectividad en la extensión de la hetero-oligomerización entre Fzs distintos. El estado oligomérico de muchos receptores es regulado por sus respectivos ligandos⁽²⁴⁾. Se reportó en esta misma publicación que Fz1 y Fz2 forman homo- y hetero-oligómeros constitutivamente, es decir, independientemente de la unión del ligando, a pesar de que no se pudo excluir la posibilidad de que la oligomerización ocurriera en respuesta a la expresión de 1 o más de los 19 ligandos Wnts de mamífero en las células 293T, la línea celular empleada para los ensayos. Por otra parte, el aglutinamiento tal vez estaría de acuerdo con un modelo en el que el receptor esté contenido en balsas lipídicas a nivel de la membrana plasmática⁽²⁶⁾.

tras el agregado del *buffer* de siembra. La detección fue efectuada mediante incubación con el anticuerpo poiclonal anti-Fz7. Las primeras 3 calles fueron reveladas empleando el reactivo ECL comercial mientras que las calles 5, 6 y 7 fueron reveladas empleando ECL casero. (B) ídem (A) pero el tiempo de exposición fue la mitad (15''). Se sembraron 20 µg de proteína total por calle.

A partir de los resultados obtenidos y las observaciones realizadas pueden enumerarse algunas inferencias, las cuales podrían ser ampliadas por nuevos experimentos:

- Hervir las muestras 5 minutos a 100 °C luego del agregado del *buffer* de siembra conduciría a la retención de una fracción del receptor en la parte superior del gel, aún al agrandar el tamaño promedio de los poros (bandas señaladas por flechas rojas en calles 1, 2 y 3 en **Fig. 10A**). El marcador de peso molecular de 250 kDa tampoco ingresó al gel. En principio no puede definirse si esta fracción excluida del receptor consiste en un multímero (compuesto por al menos 4 o 5 cadenas polipeptídicas) o es producto de la aglutinación de Fz7. Sin embargo, el hecho de no haberse detectado bandas correspondientes a dímeros o trímeros (esperables en caso de que la proteína forme multímeros) hace que la explicación más probable para la exclusión de una fracción de Fz7 sea su agregación.
- No hervir la muestra aparentemente reduciría la fracción de receptor que queda retenida en la parte superior del gel, sin eliminarla por completo (ver calles 5, 6 y 7 en **Fig. 10A**). Sin embargo, no es posible afirmarlo con certeza porque sigue habiendo problemas para lograr una "detección homogénea", como queda evidenciado por el hecho de que bandas de ~50 kDa que aparecen en la **Fig. 10A** desaparecen en la **Fig. 10B** (comparar bandas de 50 kDa en las calles señaladas por flechas blancas en **Fig. 10A** y **10B**). Una posible explicación para la desaparición de estas señales podría ser el menor tiempo de exposición de la película en **B** respecto a la película en **A** (el tiempo de exposición fue disminuido a la mitad). Sin embargo, la ausencia en la **Fig. 10A** de bandas que sí se evidencian en la **Fig. 10B** parece indicar que esta no sería la causa de esta diferencia de detección (comparar bandas de 50 kDa en calles señaladas por flechas amarillas en **Fig. 10A** y **10B**). En otras palabras: en principio, no se puede afirmar con certeza que la ausencia de una banda en la parte superior del gel al no hervir la muestra se deba

a que la fracción excluida es menor, ya que puede deberse a una falla en el sistema de detección.

- Sí puede descartarse que la falla se deba a una preparación incorrecta del reactivo ECL casero porque esta variación se observa también con el reactivo comercial.

4.2. Caracterización de Frizzled-7 (Fz7) como posible receptor de Wnt7b y mediador del efecto dendritogénico de éste en neuronas piramidales de hipocampo

4.2.1. Fz7 se expresa en el cerebro de rata durante el desarrollo dendritogénico

Se ha reportado la presencia de transcritos de Fz7 en la formación hipocampal post-natal de ratón⁽⁶³⁾. Al valernos de este dato, aún si se desestima el “salto inter-especie” y la falta de información respecto a los niveles de transcritos del receptor Fz7 en la etapa pre-natal, debe tenerse en cuenta que la presencia de un determinado transcritos no necesariamente implica que la proteína para la que éste codifica haya sido traducida, ni mucho menos que esta última sea funcional. Por esta razón, se realizó en primer lugar una caracterización de la expresión *in vivo* de Fz7. Para ello, se prepararon homogenados de cerebro de embriones de 19 días de gestación (representativos de la etapa pre-natal), de neonatos con distintos tiempos de vida (correspondientes a la etapa post-natal) e incluso de rata adulta (hembra) y se procedió a la detección de Fz7 mediante *western blot*. No se efectuó control negativo en ningún ensayo. Cuando se incluyó un control positivo, se empleó como tal un lisado de células NIH3T3 transfectadas con el plásmido pEGFP/Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-myc) y dirigiendo la detección hacia Fz7 y no el epítipo Myc. Los resultados del análisis se muestran en la **Fig. 11**. Se observaron 3 fracciones del receptor: una fracción que se comportó como una proteína de 50 kDa, otra que migró como una proteína de entre 75 y 100 kDa, y una tercera fracción que, al igual que el marcador de peso molecular de 250 kDa, resultó excluida del gel de separación.

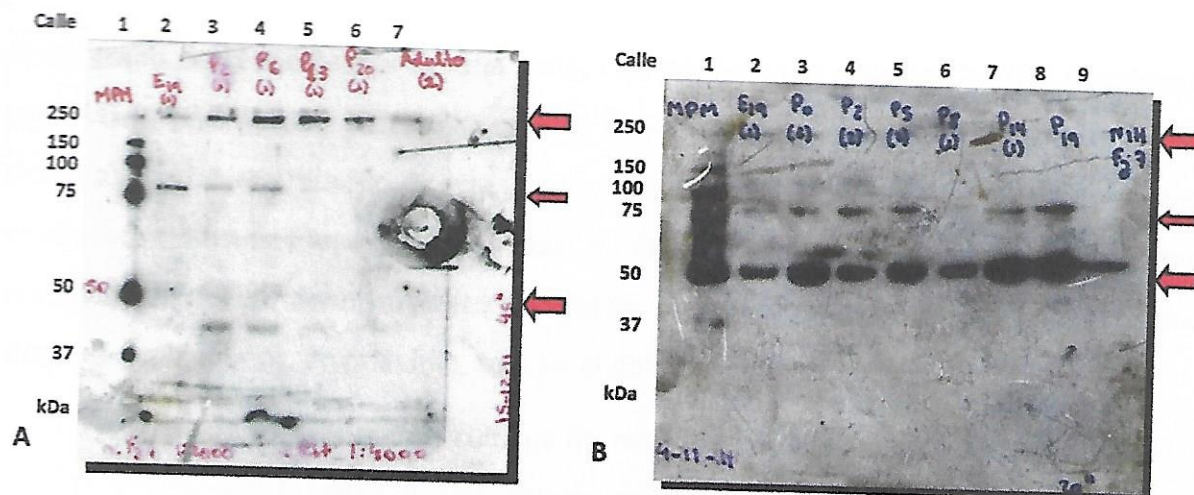


Fig. 11. Expresión de Fz7 en el cerebro de rata en diferentes estadios del desarrollo. (A) Curva de expresión de Fz7 *in vivo* elaborada con homogenados de cerebro de ratas de distintos estadios de desarrollo: Ref: 1: M.P.M. 2: diecinueve días de gestación (E19); 3: dos días post-nacimiento (P2); 4: seis días post-nacimiento (P6); 5: trece días post-nacimiento (P13); 6: veinte días post-nacimiento (P20); 7: rata adulta (~50 días post-nacimiento). (B) Curva de expresión de Fz7 *in vivo* elaborada con homogenados de cerebro de ratas de distintos estadios de desarrollo: Ref: 1: M.P.M. 2: diecinueve días de gestación (E19); 3: día del nacimiento (P0); 4: dos días post-nacimiento (P2); 5: cinco días post-nacimiento (P5); 6: ocho días post-nacimiento (P8); 7: 14 días post-nacimiento (P14); 8: diecinueve días post-nacimiento (P19). 9: muestra obtenida a partir de un cultivo de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que sobre-expresa al constructo Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc). En todos los casos, las muestras fueron hervidas 5 minutos a 100 °C y la detección se efectuó con el anticuerpo policlonal anti-Fz7 adquirido de ABCAM. Se sembraron 20 µg de proteína total por calle. Las bandas correspondientes a las distintas fracciones del receptor Fz7 se señalan con flechas rojas.

Debido a la imposibilidad de cuantificar los niveles proteicos, no fue posible establecer una relación fina entre el patrón de expresión de Fz7 y el desarrollo neuronal en el sistema nervioso central. Lo único que puede afirmarse es que el receptor Fz7 se expresa en forma continua tanto en estadios embrionarios como en ratas recién nacidas, y que esta expresión persiste a lo largo del desarrollo post-natal, hasta la vida adulta.

Una vez corroborada la presencia del receptor putativo en el cerebro durante la etapa de desarrollo dendrítico, debería continuarse con la caracterización del patrón de expresión del receptor y su correlación con el desarrollo neuronal. Para ello, en el futuro, resultaría enriquecedor estudiar, mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal de fluorescencia, la localización tisular de Fz7 en el cerebro de rata y su distribución subcelular a lo largo de las distintas etapas de desarrollo neuronal, sobre todo, durante la dendritogénesis temprana. Además, la localización subcelular del receptor putativo

involucrado en la mediación de una señal morfogénica, tal como es la dendritogénesis estimulada por Wnt7b, independiente de la transcripción mediada por β -catenina⁽⁶⁶⁾, debería guardar una relación directa con el efecto disparado puesto que el impacto sobre el citoesqueleto se espera que tenga lugar en forma local. Entonces, de actuar Fz7 como mediador del efecto dendritogénico de Wnt7b, se esperaría encontrarlo en los procesos dendríticos, al menos, en principio, sólo en el dominio somatodendrítico.

4.2.2. Fz7 se expresa en cultivos de neuronas de hipocampo de rata incluso durante la etapa de dendritogénesis.

A continuación se examinó la expresión del receptor Fz7 en cultivos de neuronas de hipocampo de rata tras diferentes períodos de incubación medidos como días *in vitro* (DIV). Los resultados se presentan en la **fig. 12**. Aparentemente, también se observaron 3 fracciones del receptor: una fracción que se comportó como una proteína de 50 kDa, otra que migró como una proteína de entre 75 y 100 kDa, y una tercera fracción que resultó excluida del gel de separación.

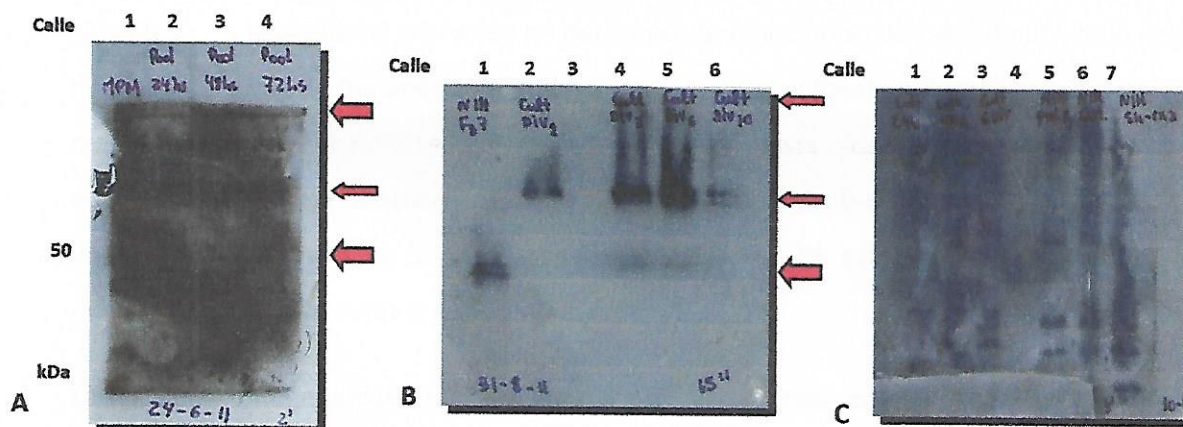


Fig. 12. Expresión de Fz7 en neuronas de hipocampo cultivadas. (A), (B) y (C) *Blots* representativos de las curvas de expresión de Fz7 *in vitro* tras diferentes períodos de incubación que demuestran la expresión sostenida de Fz7 en cultivos de neuronas piramidales de hipocampo transcurridos 1, 2, 3, 6 y 10 DIV. (A) Ref: 1: M.P.M. 2: pool de lisados de cultivos de neuronas de 1 DIV. 3: pool de lisados de cultivos de neuronas de 2 DIV. 4: pool de lisados de cultivos de neuronas de 3 DIV. Las muestras se corrieron en un gel con 12% de acrilamida. (B) 1: muestra obtenida a partir de un cultivo de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que sobre-expresa al constructo Fz7-Myc (NIH3T3 Fz7-Myc). 2: lisado de un cultivo de neuronas de 1 DIV. 3: calle vacía. 4: lisado de un cultivo de neuronas de 3 DIV. 5: lisado de un cultivo de neuronas de 6 DIV. 6: lisado de un cultivo de neuronas de 10 DIV. Las muestras se corrieron en un gel con un 10% de acrilamida. (C) 1: lisado de un cultivo de neuronas de 1 DIV. 2: lisado de un cultivo de neuronas de 2 DIV. 3: lisado de un cultivo de neuronas de 6 DIV. 4: calle vacía. 5:

NIH3T3 Fz7-Myc. **6**: control del nivel endógeno del receptor en la línea NIH3T3 siendo expuesto el cultivo al tratamiento de transfección pero sin DNA. **7**: lisado de un cultivo de células NIH3T3 transfectadas con un plásmido que codifica para un shRNA dirigido específicamente contra Fz7. Las muestras se corrieron en un gel con un 10% de acrilamida. En todos los experimentos las muestras fueron hervidas 5`a 100 °C y se sembraron 20 µg de proteína total por calle. Las bandas correspondientes a las distintas fracciones del receptor Fz7 se señalan con flechas rojas.

Los niveles proteicos no pudieron ser cuantificados por las limitaciones expuestas durante la puesta a punto de la detección por *western blot*. En consecuencia, no pudo establecerse una relación exacta entre el patrón de expresión de Fz7 *in vitro* y el desarrollo neuronal en cultivo. Sólo puede decirse que el receptor Fz7 se expresa en forma sostenida en los cultivos de neuronas piramidales de hipocampo de rata desde el primero hasta el décimo día de incubación *in vitro*. Esto significa que el receptor Fz7 se expresa a lo largo de todo el proceso de desarrollo neuronal *in vitro* (lo cual incluye la dendritogénesis temprana).

Tal como fue señalado en la sección anterior para el comportamiento de Fz7 *in situ*, en el futuro, resultaría sumamente valioso estudiar la localización del receptor a nivel subcelular en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata, recurriendo para ello a las técnicas de inmunocitoquímica y microscopía confocal de fluorescencia. De esta manera podría determinarse con mayor certeza si existe una correspondencia exacta entre el comportamiento (nivel de expresión y distribución sub-celular) del receptor Fz7 *in vivo* e *in vitro* y el avance de la diferenciación neuronal. De esta forma se estaría dando una mayor validez al modelo experimental.

La falta de homogeneidad entre las bandas que se observan en el *blot C* de la **Fig. 12** no se debe a que tenga lugar una migración diferente del receptor en las distintas muestras sino que, nuevamente, es producto de la falta de homogeneidad en la detección debido a la insuficiente cantidad de solución de anticuerpo y falta de agitación adecuada con la que se incubó la membrana. Esto fue corroborado por repetición del proceso de detección (las imágenes correspondientes a las repeticiones no se muestran debido a que, por su opacidad, no logra evidenciarse en la imagen digital lo observado en la placa). De cualquier manera, cabe destacar que en este ensayo tampoco hubo control negativo y se empleó como control positivo un lisado de

células NIH3T3 transfectadas con plásmido pEGFP/Fz7-Myc (calle 1) y detección contra Fz7 en lugar del epítipo Myc.

4.2.3. Fz7 estimula la dendritogénesis

El hecho de que se evidencie una expresión sostenida de Fz7 en el cerebro durante toda la etapa post-natal hasta la adultez (comportamiento *in vivo*), así como durante los primeros 10 días de cultivo (lo cual abarca las cinco etapas del desarrollo neuronal *in vitro*), junto con la observación de que los receptores murinos Frizzled-1, -2, -4 y -7 pueden unirse a proteínas de la familia PSD-95, las cuales están implicadas en el ensamblaje y localización de complejos multiproteicos de señalización en el cerebro⁽¹⁹⁾, indicaría que Fz7 podría cumplir alguna función en el desarrollo de las neuronas piramidales de hipocampo. El interés de este trabajo residió en probar si Fz7 pudiera cumplir algún rol en la dendritogénesis de cultivos jóvenes de neuronas piramidales de hipocampo de rata, de modo similar a como se ha demostrado para el ligando Wnt7b⁽⁵⁵⁾.

Para corroborar esta hipótesis, se realizaron varios ensayos de inmunocitoquímica con cultivos de neuronas expuestos a una de cuatro condiciones diferentes, producto de la combinación del tipo de plásmido con el que eran transfectadas transientemente las neuronas a los 2 días de incubación *in vitro* y del tipo de medio en el que eran incubadas durante otras 16 horas (luego de 2 horas de finalizada la lipofección).

4.2.3.1. Efecto de la sobre-expresión de Fz7 en medio condicionado control

En primer lugar se realizaron ensayos de ganancia de función en los que se comparó el desarrollo dendritogénico de neuronas piramidales de hipocampo que expresaban EGFP (control) con aquel de neuronas que, además de EGFP, expresaban el receptor transgénico Fz7-Myc.

Entonces, con el fin de que actuaran como punto de referencia, luego de 2 días *in vitro*, un grupo de neuronas fueron transfectadas con un plásmido diseñado para expresar la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) y tratadas con medio condicionado control durante 16 horas. Luego de 3 días *in vitro*, las neuronas control mostraron una morfología

piramidal típica con axones largos y finos y varias dendritas cortas (propia de la etapa 3 del desarrollo en cultivo)⁽¹³⁾. No se incluyen en el presente trabajo imágenes de estas neuronas control.

Por su parte, al ser incubadas durante 16 horas con medio condicionado control, las neuronas transfectadas de manera de sobre-expresar el receptor Fz7 exhibieron una mayor longitud dendrítica total (p-value < 0,05) con un número mayor de ramas dendríticas totales (medido como TDBTN, p-value < 0,05). Un análisis más detallado del orden de ramificación dendrítica reveló que la sobre-expresión de Fz7 no afecta significativamente el número de ramas primarias ni terciarias, pero sí el número de ramas secundarias (p-value < 0,05) (los resultados se presentan en la **fig. 13**). No se efectuó medición alguna para determinar si la sobre-expresión de Fz7 afectó o no el remodelado del axón en esta etapa.

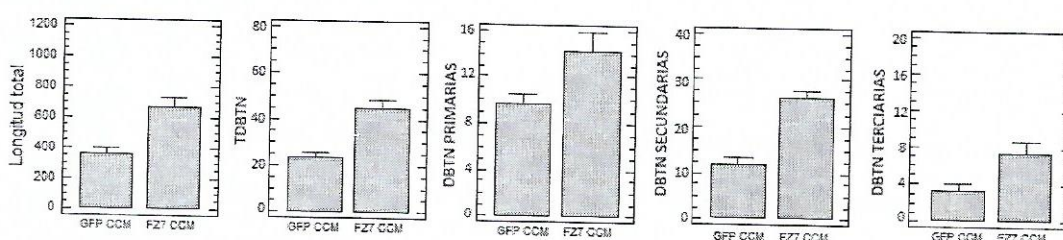


Fig. 13. Fz7 estimula la formación de dendritas. Cuantificación de la longitud dendrítica total, número total de ramificaciones dendríticas (total dendritic branching tip number, TDBTN), y orden de ramificación dendrítica (primarias, secundarias y terciarias) de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV incubadas en medio condicionado control (CCM) y transfectadas de modo de sobre-expresar EGFP o EGFP y el receptor Fz7. Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

El hecho de que se haya observado un efecto dendritogénico por sólo sobre-expresar Fz7 podría indicar que existe actividad Wnt endógena. Esto estaría de acuerdo con lo reportado en otras publicaciones^(55, 72). Sin embargo, también es posible que la sobre-expresión conduzca a la dimerización del receptor, y que ésta sea suficiente para activarlo y disparar la señalización. Esto estaría de acuerdo con lo observado para otros miembros de la familia Frizzled en otros organismos modelo y en relación a la vía canónica de señalización⁽⁶⁾.

Estos resultados mostrarían que la ganancia de función de Fz7 imita sólo en parte el efecto dendritogénico reportado previamente para el ligando Wnt7b en cultivos jóvenes de neuronas piramidales de hipocampo de rata⁽⁵⁵⁾. La falta de una correspondencia exacta entre los efectos dendritogénicos observados por separado para cada uno de estos dos elementos de señalización sugeriría que la proteína transmembrana Fz7 no es el receptor que media el efecto del ligando Wnt7b, o bien, que Fz7 sólo media el aumento en la longitud dendrítica total y el número de ramas dendríticas secundarias disparados por éste ligando. Sin embargo, tampoco se logró reproducir lo reportado previamente para el ligando Wnt7b.

4.2.3.2. Efecto de la exposición al ligando Wnt7b de neuronas que expresan sólo EGFP

A los 2 días de cultivo, un grupo de neuronas transfectadas de modo de expresar EGFP se incubó con medio condicionado control (grupo de referencia) y otro grupo fue incubado con medio condicionado con el ligando Wnt7b de manera de corroborar si el agregado del ligando al medio afectaba el desarrollo dendritogénico de las neuronas piramidales de hipocampo. En ambos casos la incubación duró 16 horas. Al incubarlas con el medio condicionado con Wnt7b, obtenido a partir de células de la línea Rat1-b transfectadas establemente para expresar y secretar Wnt7b-HA al medio, las neuronas presentaron una longitud dendrítica total mayor a la observada para las neuronas control (p-value <0,001), pero no se encontró que tuvieran un número mayor de ramas dendríticas totales (medido como TDBTN), ni que existiera una diferencia significativa en el número de ramas primarias, secundarias o terciarias. Los resultados se presentan en la **fig. 14**. Tampoco se efectuó medición alguna para determinar si Wnt7b afectó o no el remodelado del axón en esta etapa en la que las neuronas ya han extendido sus axones.

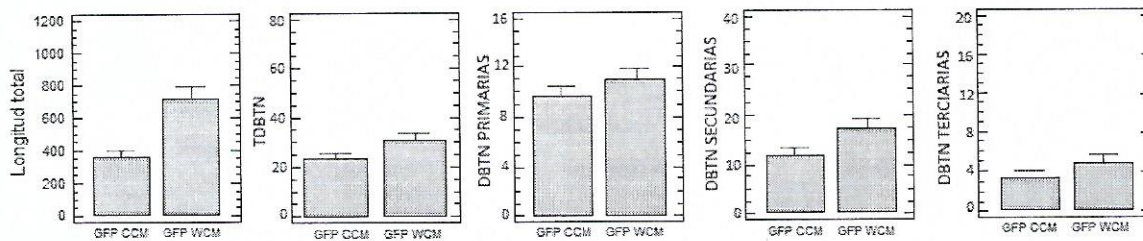


Fig. 14. Efecto del ligando Wnt7b sobre neuronas transfectadas para sobre-expresar EGFP. Cuantificación de la longitud dendrítica total, TDBTN, y número de dendritas primarias, secundarias y terciarias de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV transfectadas de modo de sobre-expresar EGFP e incubadas en medio condicionado control (CCM) o medio condicionado con el ligando Wnt7b (WCM). Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

Por lo tanto, sólo se logró reproducir parte de lo reportado previamente en relación a los efectos sobre el desarrollo dendrítico de neuronas piramidales de hipocampo en cultivo al ser expuestas al ligando Wnt7b⁽⁵⁵⁾. No son claros los motivos por los cuales no logró reproducirse la totalidad de los resultados reportados previamente, sin embargo, la diferencia podría deberse, al menos en parte, a la insuficiente cantidad de imágenes analizadas y/o al hecho de no haberse mantenido constante la relación ligando agregado/células en cultivo.

4.2.3.3. Efecto de la sobre-expresión de Fz7 en medio condicionado con Wnt7b

Al compararse neuronas que expresaban EGFP incubadas en medio con Wnt7b durante 16 horas con neuronas que sobre-expresaban el receptor Fz7 expuestas a las mismas condiciones de cultivo se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables medidas para evaluar el desarrollo dendrítico. Los resultados se detallan en la **fig. 15**. Al igual que en los experimentos previos, no se evaluó el efecto de la sobre-expresión de Fz7 sobre el remodelado axonal.

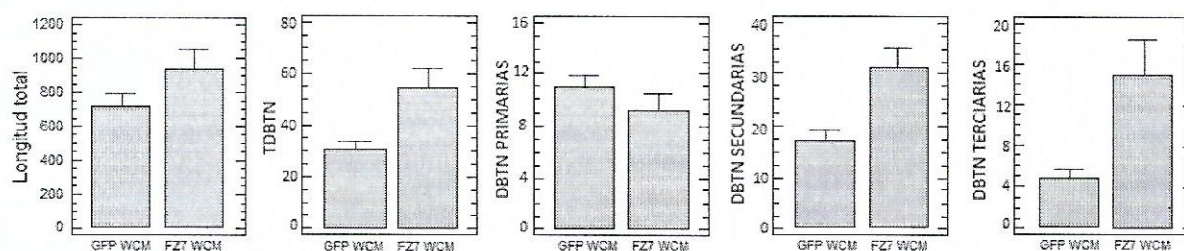


Fig. 15. No existe efecto sinérgico entre el receptor Fz7 y el ligando Wnt7b. Cuantificación de la longitud dendrítica total, TDBTN, y orden de ramificación dendrítica de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV incubadas en medio condicionado con Wnt7b (WCM) y transfectadas de modo de sobre-expresar EGFP o EGFP y el receptor Fz7. Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

4.2.3.4. Efecto de la exposición al ligando Wnt7b de neuronas que sobre-expresan Fz7

La exposición de neuronas que sobre-expresaban el receptor Fz7 a un medio conteniendo el ligando Wnt7b no modificó las variables morfológicas analizadas respecto a las observadas para las mismas neuronas expuestas a medio condicionado control. Los resultados se muestran en la **fig. 16**. Tampoco en este caso se evaluó si existió efecto alguno sobre el remodelado del axón.

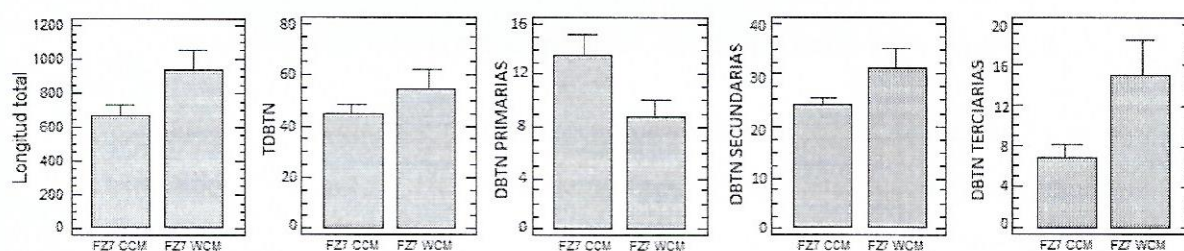


Fig. 16. No existe efecto sinérgico entre el receptor Fz7 y el ligando Wnt7b. Cuantificación de la longitud dendrítica total, TDBTN, y número de dendritas primarias, secundarias y terciarias de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV transfectadas de modo de sobre-expresar el receptor Fz7 e incubadas en medio condicionado control (CCM) o medio condicionado con el ligando Wnt7b (WCM). Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

Puesto que el aumento simultáneo de los niveles de Wnt7b y Fz7 tiene un efecto similar al aumento por separado de los niveles de dichos elementos de señalización, podría ser que señalicen a través de una vía común.

4.2.4. Fz7 podría actuar como receptor para Wnt7b durante la dendritogénesis en cultivos jóvenes.

Se ha postulado que Wnt7b estimula la dendritogénesis en neuronas piramidales de hipocampo de rata⁽⁵⁵⁾, pero el receptor que media este efecto no ha sido identificado aún. Si bien la sobre-expresión de Fz7 no reprodujo exactamente ni el efecto dendritogénico reportado previamente para la exposición de las neuronas a ligando Wnt7b exógeno, ni el efecto dendritogénico observado para Wnt7b como parte de este trabajo de tesina, igualmente se procedió a probar si Fz7 podría funcionar como un receptor para Wnt7b. En relación a esto, por un lado, estudios previos han demostrado que los ligandos Wnt se unen al dominio rico en cisteína (CRD) de Fz y que este dominio se requiere para la señalización^(32, 52). Por otro lado, se ha reportado que Fz7 tiene capacidad de unión a Wnt5a, Wnt8 y Wnt11^(20, 64, 65). Por lo tanto, resulta necesario demostrar, en primer lugar, que Wnt7b se une al dominio CRD de Fz7, y, además, que lo hace específicamente. Para ello, debiera realizarse ensayos de “binding” y/o ensayos de inmunoprecipitación probando toda combinación posible entre los miembros de la familia Wnt y los de la familia Frizzled de los que se haya reportado que se expresan en neuronas piramidales de hipocampo durante el período en estudio. Sin embargo, por cuestiones de tiempo no se pudieron realizar los ensayos correspondientes a todas las interacciones posibles, ni siquiera entre Fz7 y Wnt7b.

Para investigar si Fz7 funciona como un receptor para Wnt7b, se examinó si una versión trunca del receptor Fz7, a la que se llamó Fz7CRD-Myc, tenía algún efecto en la dendritogénesis de neuronas en cultivo. La versión trunca del receptor Fz7 consistió en el extremo amino terminal de dicha proteína transmembrana (la cual contiene al dominio CRD) marcado con el epítotope Myc y anclada a la membrana plasmática del lado extracelular por unión a glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

Neuronas de hipocampo transfectadas con plásmidos que expresaban EGFP o EGFP y Fz7CRD-Myc-GPI fueron expuestas a medio control (CCM) durante 16 horas (**fig. 17**).

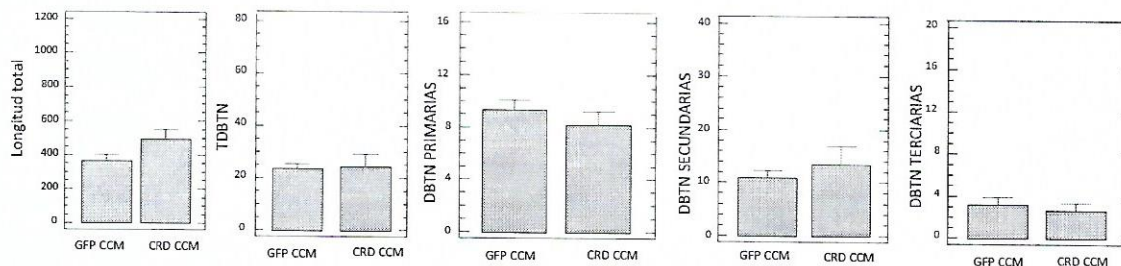


Fig. 17. No se detecta señalización endógena al sobre-exresar el dominio CRD del receptor Fz7.

Cuantificación de la longitud dendrítica total, TDBTN, y número de dendritas primarias, secundarias y terciarias de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV incubadas en medio condicionado control (CCM) y transfectadas de modo de sobre-exresar EGFP o EGFP y el dominio CRD del receptor Fz7 en la superficie celular. Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

Al incubarlas en medio condicionado control, neuronas que expresaban EGFP y Fz7CRD-Myc-GPI no revelaron ningún efecto estadísticamente significativo respecto a las variables en estudio al comparar los resultados obtenidos con neuronas que expresaban sólo EGFP. Debido al efecto dendritogénico observado por la sola sobre-expresión de Fz7 y la muy probable actividad Wnt endógena deducida de esta observación (ver sección 4.2.3.1), de existir una interacción entre el dominio CRD de Fz7 y Wnt7b o cualquier otro Wnt presente en el medio CCM o secretado por las neuronas, se esperaría que la expresión del dominio extracelular del receptor anulara el efecto dendritogénico de su ligando natural. Los resultados obtenidos con este ensayo, en principio, indicarían que no existe una interacción entre el dominio CRD de Fz7 y cualquier Wnt presente en el medio CCM o secretado por las neuronas, o bien, que existe redundancia genética a nivel del ligando y del receptor involucrados en la dendritogénesis temprana¹⁰, o bien, que hubo un error en el diseño del experimento y/o en la cuantificación que no permitió observar el efecto realmente existente.

¹⁰ Un enfoque común para comprender la función de un gen en particular en un tejido o proceso de desarrollo es examinar el fenotipo que resulta de su knockout. En algunos casos, los patrones de expresión y los fenotipos mutantes se correlacionan en forma cercana y demuestran claramente el requerimiento que aquél Wnt en particular en un evento específico del desarrollo. Numerosos ejemplos ilustran que la redundancia genética entre los componentes de la señalización Wnt probablemente influencia enormemente nuestra capacidad para discernir e interpretar los fenotipos mutantes Wnt⁽³³⁾. En vertebrados, donde los patrones de expresión de los componentes Wnt y Fz tal vez sean más

Por otra parte, se investigó que ocurría con el desarrollo dendrítico de neuronas que fueron transfectadas para sobre-expresar transientemente EGFP y Fz7CRD-Myc cuando éstas eran incubadas con medio condicionado control o medio condicionado con Wnt7b-HA (Fig. 18).

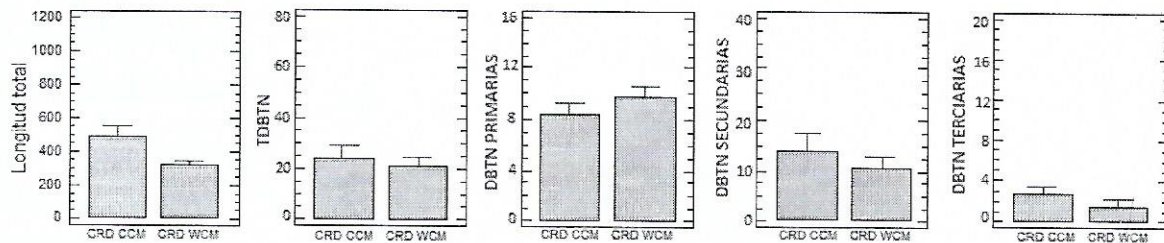


Fig. 18. Bloqueo de la señalización al sobre-expresar el dominio CRD del receptor Fz7. Cuantificación de la longitud dendrítica total, TDBTN, y número de dendritas primarias, secundarias y terciarias de neuronas piramidales de hipocampo de 3 DIV transfectadas de modo de sobre-expresar el dominio extracelular rico en cisteínas del receptor Fz7 (CRD) e incubadas en medio condicionado control (CCM) o medio condicionado con el ligando Wnt7b (WCM). Las barras corresponden al error estándar en el valor obtenido para cada variable tras la cuantificación de entre 5 y 14 neuronas por condición, provenientes de 3 experimentos independientes.

De la comparación se desprende que la expresión (teóricamente, en la membrana) de Fz7CRD-Myc anula el efecto dendritogénico de Wnt7b-HA, observado como parte de este trabajo de tesina (ver sección 4.2.3.3). Esto indicaría que sí existe una interacción entre el CRD de Fz7 y Wnt7b, aunque no puede descartarse que un error en el diseño del experimento y/o en la cuantificación haya conducido a resultados incorrectos.

elaborados, y donde Fz tal vez incluso interactúe con otros ligandos tales como Norrin⁽¹⁷⁾, las interacciones y relaciones solapantes entre Wnts, otras moléculas de unión a Frizzled, y Fzs son probablemente muy complejas. En ratón, las mutaciones de pérdida de función dirigidas han revelado fenotipos mutantes en el desarrollo para la mayoría de los 10 genes que codifican los receptores de la familia Frizzled. En muchos casos, se observa una redundancia parcial, especialmente entre Frizzleds que están relacionados cercanamente en secuencia⁽⁷⁷⁾.

5. CONCLUSIONES

Durante el presente trabajo se realizó un análisis de las condiciones de corrida y resolución electroforética y detección por anticuerpos de Fz7 y se lograron definir varias condiciones apropiadas para el estudio de Fz7 mediante *Western blot*. Entre los aspectos que se detectaron que debieran mejorarse se encuentra lograr una “detección homogénea” en toda la superficie de la membrana. Esto, no sólo para poder determinar en forma adecuada la presencia o ausencia del receptor, deducir rasgos moleculares a partir de su comportamiento electroforético (formación de multímeros, glicosilación, proteólisis, etc.) y poder llevar adelante una caracterización apropiada de su patrón de expresión temporal, sino también poder emplear la técnica en otros ensayos como los de inmunoprecipitación y los de interferencia de la expresión por shRNA, útiles a los objetivos específicos de esta tesina.

En segundo lugar, respecto a la fracción del receptor que queda retenida en la parte superior del gel de separación, puede concluirse que la temperatura de desnaturalización de la muestra tiene un efecto marcado en el comportamiento electroforético de la proteína Fz7. Claramente, una conclusión indudable de nuestros experimentos es el hecho de que el tratamiento a alta temperatura (100 °C) de la muestra con SDS conduce a la retención de una fracción de la proteína Fz7 en la parte superior del gel de separación (probablemente, debido a su aglutinación). Al respecto, otros tratamientos alternativos también podrían ser:

- 1) emplear como *buffer* de siembra el *buffer* Laemmli pero con un pH final de 7 y DTT (5 -10 mM en EDTA, preparado en el momento) en lugar de β -mercaptoetanol como agente reductor. El β -mercaptoetanol tiene mayor tendencia a permitir que las proteínas de la muestra formen multímeros (si el problema resultara ser ese), dado que es peor reductor que el DTT. Las muestras se calientan durante 5 – 15 minutos a 50 - 70 °C tras el agregado del *buffer* de siembra.
- 2) agregar urea a la muestra (final 8 M) y DTT (5 - 10 mM en EDTA, preparado en el momento). En este caso, la muestra no se calienta. El gel debe tener una

concentración de urea 6 M. La urea es un agente caotrópico muy fuerte; interfiere con las reacciones hidrofóbicas de las proteínas y debe incluirse en el tampón de la muestra y en todos los que se empleen para la preparación de los geles.

Por último, en el caso de que la banda que se observa en la parte superior del gel de separación corresponda a la aglutinación del receptor y no a multímeros de orden 4 - 5 o superior (lo cual quedó descartado por no haber motivo *a priori* para que no se formen dímeros ni trímeros), queda por contestar por qué se aglutina sólo una fracción del receptor Frizzled 7 y no todo. En otras palabras: ¿por qué una fracción, la que se observa a 50 kDa, logra “escapar”? El hecho de que esta banda, a la que se identificó como correspondiente al monómero, se haya observado tanto en células NIH3T3 *wild-type* como en homogenados de cerebro de rata de distintos estadios de desarrollo, llevaría a descartar que se deba a un artificio de la sobre-expresión del receptor.

Ahora bien, las vías de señalización activadas por factores morfogénicos que actúan durante el desarrollo neuronal, tales como los Wnts, están recién comenzando a ser entendidas. Sin embargo, la identidad y la localización de sus receptores permanecen pobremente caracterizadas. Es el caso del ligando Wnt7b, del que se ha reportado que tiene un efecto dendritogénico sobre neuronas piramidales de hipocampo en cultivos jóvenes⁽⁵⁵⁾. En este trabajo de tesina se intentó identificar el receptor que media la señal de dicho factor morfogénico. Se centró la atención en el miembro Fz7 de la familia de receptores de membrana, del que se había reportado que se expresa en el hipocampo de ratón, al menos a nivel transcripcional, durante la etapa post-natal⁽⁶³⁾, período en el que tiene lugar la maduración neuronal y la formación de conexiones neuronales, presentando un patrón de expresión similar al de *Wnt7b*.

En esta tesina se informa que el receptor Fz7 estaría presente en el cerebro de ratas en forma sostenida desde la última etapa del período embrionarios (en los que tendría lugar una dendritogénesis temprana) hasta la adultez. Fz7 también se expresaría en neuronas piramidales extraídas del hipocampo de embriones de rata de 19 días de gestación y cultivadas *in vitro*, haciéndose presente desde, al menos, la segunda o tercera hasta la quinta y última etapa del desarrollo neuronal *in vitro*. Además, Fz7

estimularía la elongación de las dendritas de neuronas piramidales de hipocampo en cultivos jóvenes y la complejización de sus árboles dendríticos al aumentar, al menos, el número de dendritas secundarias.

Si bien el fenotipo observado con los ensayos de ganancia de función de Frizzled-7 en cultivos jóvenes de neuronas de hipocampo no es exactamente idéntico al reportado previamente para el ligando Wnt7b⁽⁵⁵⁾ ni se corresponde con el efecto dendritogénico observado para Wnt7b como parte de este trabajo de tesina, existiría la posibilidad de que el efecto dendritogénico de dicho ligando sea mediado por Fz7, como se discute en la sección 4.2.4. Sin embargo, los datos recolectados no sólo son insuficientes, sino que incluso son contradictorios, haciendo imposible confirmar o rechazar que Fz7 actúe o no como receptor para Wnt7b.

En resumen, en el futuro, para concluir que Fz7 es un receptor para Wnt7b en neuronas de hipocampo, resultaría importante:

- 1) Llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica con cortes de cerebro de rata de distintos estadios de desarrollo a fin de confirmar la presencia y patrón de expresión de Fz7 en el hipocampo de rata.
- 2) hacer ensayos de inmunocitoquímica a partir de los cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Se debería poder confirmar una correspondencia entre el comportamiento del receptor *in vivo* e *in vitro*.
- 3) realizar ensayos de binding y/o inmunoprecipitación entre todos los miembros de la familia Wnt y de la familia Frizzled que se expresan en el hipocampo de rata durante la dendritogénesis, buscando detectar posibles pares interactuantes e identificar los potenciales mediadores de la señal.
- 4) repetir los experimentos de incubación con Wnt7b, ganancia de función con Fz7-Myc, y de sobre-expresión de Fz7CRD-Myc-GPI en la membrana de las neuronas, obteniendo un mayor n. de imágenes que le den un mayor soporte estadístico a los resultados¹¹ y ajustando ciertos aspectos del diseño experimental.

11 La mayoría de los métodos más modernos de transfección de cDNA a células en cultivo se basan en compuestos lipídicos, y varios de estos funcionan bien con los cultivos de neuronas. La mayoría da niveles elevados de expresión,

- 5) realizar ensayos de reducción (knock down) de la expresión de dicho receptor mediante el uso de tecnología de interferencia (más precisamente, short-hairpin RNA –shRNAs), habiendo descartado previamente, posibles interacciones de Wnt7b con otros miembros de la familia Frizzled. Dada la posibilidad de inespecificidad (“off-target effect”) de la técnica de silenciamiento por shRNAs, deberá chequearse que sólo los niveles del miembro Fz7 están siendo disminuidos.

Por último, estimo importante señalar que, aún en el caso de demostrarse que 1) Frizzled-7 tiene exactamente el mismo efecto dendritogénico que Wnt7b, 2) existe una interacción específica entre ambos componentes de la señalización, y 3) el efecto de Wnt7b desaparece al bloquear la interacción entre ellos, a la luz de la evidencia¹² y modelos que se manejan actualmente respecto a los mecanismos de especificidad de la señalización Wnt^(26, 45, 67, 69), y los datos de que se disponen respecto a las vías en las que activan y procesos de desarrollo en los que participan el ligando Wnt7b y el receptor Fz7, probablemente no se habrá identificado “EL” receptor que media la señal de Wnt7b, sino más bien uno de los miembros de un probable complejo receptor.

pero la eficiencia de transfección en cultivos de neuronas es comparativamente baja (1 - 10%). Kaech & Banker (2007)⁽²³⁾ han reportado que Lipofectamine 2000 resulta satisfactoria para sus aplicaciones. En sus manos, la eficiencia de transfección varía durante el curso de vida de los cultivos y consiguen los mejores resultados **entre 3 y 10 días en cultivo**. En estas etapas, 1 – 3% de las neuronas expresan el transgen.

Además, hay que tener en cuenta que la transición de la etapa 1 a la etapa 2 y de la etapa 2 a la etapa 3 no ocurre en forma sincronizada a lo largo de la población de neuronas en cultivo. Bajo condiciones óptimas, la mitad de las neuronas alcanzan la etapa 3 24hs luego de haber sido sembradas; más del 80% alcanza la etapa 3 para las 36-48hs de cultivo.⁽²³⁾

12 Notablemente, se ha demostrado que los componentes de virtualmente cada nivel de la cascada de transducción de la señal Wnt afectan tanto las respuestas dependientes de la β -catenina como las independientes, dependiendo del contexto celular. Esto es válido para las proteínas Wnt mismas, así como para sus receptores y algunos mensajeros intracelulares⁽⁶⁷⁾. En lugar de concluir que estas proteínas son compartidas entre vías, probablemente sea el balance neto total de señales el que determina en última instancia la respuesta de la célula receptora. En el contexto de un organismo intacto y en desarrollo, las células reciben señales de entrada (inputs) múltiples, dinámicas, a menudo simultáneas y a veces incluso conflictivas, todas las cuales son integradas para disparar el comportamiento celular apropiado en respuesta. Así, las diferentes vías de señalización tal vez estén más íntimamente entrelazadas que lo concebido previamente. De hecho, desde la perspectiva de un biólogo del desarrollo, sería incorrecto verlas como vías separadas en absoluto⁽⁶⁷⁾.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adler P. N., Lee H.** (2001) Frizzled signaling and cell–cell interactions in planar polarity. *Curr Opin Cell Biol.* **13**: 635–640.
2. **Ahmad-Annur A., Ciani L., Simeonidis I., Herreros J., Fredj N. B., et al.** (2006) Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* **174**:127–39.
3. **Arikkath, J.** (2012). Molecular mechanisms of dendrite morphogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **6**:61.
4. **Ataman B., Ashley J., Gorczyca D., Gorczyca M., Mathew D., et al.** (2006) Nuclear trafficking of *Drosophila* Frizzled-2 during synapse development requires the PDZ protein dGRIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**:7841–46.
5. **Bhanot, P. et al.** (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* **382**:225–230.
6. **Carron C., Pascal A., Djiane A., Boucaut J. C., Shi D. L., Umbhauer M.** (2003) Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci.* **116**:2541-50.
7. **Ciani L., Krylova O., Smalley M. J., Dale T. C., Salinas P. C.** (2004) A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *J Cell Biol.* **164**(2):243-53.
8. **Ciani L., Salinas P. C.** (2005) WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci.* **6**:351-62.
9. **Clevers H.** (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* **127**:469–80.
10. **Craig A. M., Banker G.** (1994) NEURONAL POLARITY. *Annu Rev Neurosci.* **17**:267-310.

11. **Dann C. E., et al.** (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*. **412**: 86-90.
12. **Deardorff M. A. , Tan C., Saint-Jeannet J. P., Klein P. S.** (2001) A role for frizzled 3 in neural crest development. *Development*. **128**:3655-3663.
13. **Dotti C. G., Sullivan C. A., Banker G. A.** (1988) The Establishment of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture. *The Journal of Neuroscience*. **8**(4):1454-1488.
14. **Endo E., Beauchamp E., Woods D., et al.** (2008) Wnt-3a and Dickkopf-1 Stimulate Neurite Outgrowth in Ewing Tumor Cells via a Frizzled3- and c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **28**:2368-2379.
15. **Furrer M. P., Kim S., Wolf B., Chiba A.** (2003) Robo and Frazzled/DCC mediate dendritic guidance at the CNS midline. *Nat. Neurosci.* **6**: 223-230.
16. **Godenschwege T. A., Simpson J. H., Shan X., Bashaw G. J., Goodman C. S., Murphey R. K.** (2002) Ectopic expression in the giant fiber system of *Drosophila* reveals distinct roles for roundabout (Robo), Robo2, and Robo3 in dendritic guidance and synaptic connectivity. *J. Neurosci.* **22**(8):3117--3129.
17. **Guo N., Hawkins C., Nathans J.** (2004) Frizzled 6 controls hair patterning in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**(25):9277-9281.
18. **Hall A. C., Lucas F. R., Salinas P. C.** (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*. **100**:525-35.
19. **Hering Heike, Sheng Morgan** (2002) Direct interaction of Frizzled-1, -2, -4, and -7 with PDZ domains of PSD-95. *FEBS Letters* **521**:185-189.
20. **Holmen S. L., Salic A., Zylstra C. R., Kirschner M. W., Williams B. O.** (2002) A novel set of Wnt-Frizzled fusion proteins identifies receptor components that activate beta-catenin-dependent signaling. *J Biol Chem*. **277**: 34727-34735.

21. **Hsieh J. C.** (2004) Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci.* **9**:1333-8.
22. **Ishikawa T. et al.,** (2001). Mouse Wnt receptor gene Fzd5 is essential for yolk sac and placental angiogenesis. *Development.* **128**: 25-33.
23. **Kaech S., Banker G.** (2007) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* **1**(5):2406-15.
24. **Kaykas A., Yang-Snyder J., Héroux M., Shah K. V., Bouvier M., Moon R. T.** (2004) Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat Cell Biol.* **6**(1):52-8.
25. **Kikuchi A., Yamamoto H., Sato A. & Matsumoto S.** (2011) New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **291**:21–71.
26. **Kikuchi A., Yamamoto H., Sato A.** (2009) Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* **19**(3):119-29.
27. **Kirikoshi H., Sekihara H., Katoh M.** (2001) Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer. *Int J Oncol.* **19**(1):111-5.
28. **Klassen M. P., Shen K.** (2007) Wnt signaling positions neuromuscular connectivity by inhibiting synapse formation in *C. elegans*. *Cell.* **130**(4):704-16.
29. **Kollins K. M., Davenport R. W.,** (2006) Branching Morphogenesis in Vertebrate Neurons in Branching Morphogenesis, pp 8-65. Eureka.com and Springer Science+Business Media, Inc.
30. **Krylova O., Herreros J., Cleverley K., Ehler E., Henriquez J., et al.** (2002) WNT-3, Expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron.* **35**:1043.

31. Libersat F., Duch C. (2004) Mechanisms of dendritic maturation. *Mol. Neurobiol.* **29**:303–20.
32. Liu C., Wang Y., Smallwood P. M., Nathans J. (2008) An essential role for Frizzled 5 in neuronal survival in the parafascicular nucleus of the thalamus. *J Neurosci.* **28**(22):5641-53.
33. Logan C. Y., Nusse R. (2004) The WNT signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**:781-810.
34. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**:265-75.
35. Lu W., Yamamoto V., Ortega B., Baltimore D. (2004) Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell.* **119**(1):97-108.
36. Luo L. (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**:601–35.
37. Luo J. *et al.* (2007) Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab. Invest.* **87**:97–103.
38. Malaterre J. *et al.* (2007) Wnt-Frizzled signalling and the many paths to neural development and adult brain homeostasis. *Front. Biosci.* **12**:492–506.
39. Malbon C. C., Wang H. Y. (2006) Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **72**:153–66.
40. Mathew D., Ataman B., Chen J., Zhang Y., Cumberledge S., Budnik V. (2005) Wingless signaling at synapses is through cleavage and nuclear import of receptor DFrizzled2. *Science.* **310**(5752):1344-7.
41. Mathew D., Franco B., Bogdanik L., Bobinnec Y., Debec A., Bockaert J., Parmentier M. L., Grau Y. (2004) Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila*. *J Neurosci.* **24**:6573-7.

42. **McAllister A. K.** (2000) Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb. Cortex.* **10**:963–73.
43. **Mikels A. J., Nusse R.** (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene.* **25**:7461-8.
44. **Miller J. R.** (2001) The Wnts. *Genome Biology.* **3**:reviews3001.
45. **Niehrs C.** (2012) The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **13**(12):767-79.
46. **Nusse R.** (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* **15**:28-32.
47. **Packard M., Koo E. S., Gorczyca M., Sharpe J., Cumberledge S., Budnik V.** (2002) The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell.* **111**:319–30.
48. **Paganoni S., Ferreira A.** (2005) Neurite extension in central neurons: a novel role for the receptor tyrosine kinases Ror1 and Ror2. *J Cell Sci.* **118**: 433–446.
49. **Parrish J. Z., Emoto K., Kim M. D., Jan Y. N.** (2007) Mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**:399–423.
50. **Peradziryi H., Kaplan N. A., Podleschny M., Liu X., Wehner P., Borchers A., Tolwinski N. S.** (2011) PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J.* **30**: 3729–3740.
51. **Polleux F., Morrow T., Ghosh A.** (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature.* **404**:567-573.
52. **Povelones M., Nusse R.** (2005) The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *EMBO J.* **24**:3493-3503.

53. Qian J., Jiang Z., Li M., Heaphy P., Liu Y. H., Shackleford G. M. (2003) Mouse *Wnt9b* transforming activity, tissue-specific expression, and evolution. *Genomics*. **81**:34–46.
54. Rao T. P., Kühl M. (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res*. **106**(12):1798-806.
55. Rosso S. B., Sussman D., Wynshaw-Boris A., Salinas P. C. (2005). Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci*. **8**, 34-42.
56. Sahores M., Gibb A., Salinas P. C. (2010) Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development*. **137**: 2215-2125.
57. Saitoh T., Hirai M., Katoh M. (2001) Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region. *Int J Oncol*. **19**(1):105-10.
58. Saldanha J., Singh J., Mahadevan D. (1998) Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci*. **7**(8):1632-5.
59. Salinas P. C., Zou Y. (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci*. **31**:339-58.
60. Schulte G., Bryja V. (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. **28**(10):518-25.
61. Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*. **1666**:105– 117.
62. Shi S. H., Cox D. N., Wang D., Jan L. Y., Jan Y. N. (2004) Control of dendrite arborization by an Ig family member, dendrite arborization and synapse maturation 1 (Dasm1). *PNAS*. **101**:13341–13345.

63. Shimogori T., VanSant J., Paik E., Grove E. A. (2004) Members of the Wnt, Fz, and Frp Gene Families Expressed in Postnatal Mouse Cerebral Cortex. *J Comp Neurol.* **473**(4):496-510.
64. Sumanas S., *et al.* (2000) The putative Wnt receptor *Xenopus* frizzled-7 functions upstream of beta-catenin in vertebrate dorsoventral mesoderm patterning. *Development.* **127**:1981-1990.
65. Umbhauer M., Djiane A., Goisset C., Penzo-Mendez A., Riou J. F., Boucaut J. C., Shi D. L. (2000a) The C-terminal cytoplasmic LysThr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J.* **19**:4944-4954.
66. Van Aelst L., Cline H. T. (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**:297-304.
67. Van Amerongen R., Nusse R. (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development.* **136**:3205-3214.
68. Varela-Nallar L., Grabowski C. P., Alfaro I. E., Alvarez A. R., Inestrosa N. C. (2009) Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Development.* **4**:41.
69. Verkaar F., Zaman G. J. (2010) A model for signaling specificity of Wnt/Frizzled combinations through co-receptor recruitment. *FEBS Lett.* **584**(18):3850-4.
70. Vincent J. P., Beckett K. (2011) Off-track takes Frizzled off the canonical path. *EMBO J.* **30**(18):3665-6.
71. Wang H. Y., Liu T., Malbon C. C. (2006) Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal.* **18**(7):934-41.
72. Wayman G. A., Impey S., Marks D., Saneyoshi T., Grant W. F., *et al.* (2006) Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron.* **50**:897-909.

73. **Whitford K. L., Marillat V., Stein E., Goodman C. S., Tessier-Lavigne M., et al.** (2002) Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions. *Neuron*. **33**:47–61.
74. **Wodarz A., R. Nusse** (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:59–88.
75. **Wong H. C., Bourdelas A., Krauss A., Lee H. J., Shao Y., Wu D., Mlodzik M., Shi D. L., Zheng J.** (2003) Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*. **12**:1251-1260.
76. **Wu X., Tu X., Joeng K. S., Hilton M. J., Williams D. A., Long F.** (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell*. **133**:340–353.
77. **Yu H., Ye X., Guo N., Nathans J.** (2012) Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Development*. **139**:4383-4394.
78. **Yu X., Malenka R. C.** (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **6**:1169–77.
79. **Yuste R., Bonhoeffer T.** (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**:1071–89.

