



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
División de Estudios Profesionales

“Efecto de la activación de la vía Wnt en la reorganización del citoesqueleto y establecimiento de la polaridad neuronal en cultivos de neuroblastoma humano”.

T E S I S

Que para obtener el grado de:
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

Presenta:
ABRIL ESTEFANIA ORTIZ MATAMOROS

Directora de tesis: **Dra. Ana Brigida Clorinda Arias Álvarez**
Sinodales: **Dra. Angélica Zepeda Rivera**
Dr. César Casasola Castro
Dr. Octavio César García González
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

MÉXICO, D.F.

Marzo de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el laboratorio de la Dra. Clorinda Arias Álvarez del departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al PAPIIT por la beca otorgada para la realización de esta tesis de licenciatura durante el periodo 2010-2011 (proyecto IN219509).

Mi agradecimiento para la Dra. Clorinda Arias por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio y por la dirección de este trabajo de tesis, así como por todos los conocimientos que me ha transmitido.

Agradezco a Patricia Ferrera, técnico del laboratorio, por su apoyo indispensable para la realización del trabajo en el laboratorio.

Así mismo, agradezco a mis sinodales por sus valiosas sugerencias, comentarios y correcciones: Dra. Angélica Zepeda Rivera, Dr. César Casasola Castro, Dr. Octavio César García González, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina.

Dedicado a:

mis padres *Alejandra Matamoros y Fernando Ortiz,*

mis hermanos: *Vania, Mario, Ana y Luis.*

In memoriam
Rufina Morales Martínez, mi abuela.

Agradezco:

a mis padres Alejandra Matamoros Morales y Fernando Ortiz Carranza por su inigualable apoyo, su cariño y por alentarme en mis estudios. ¡Gracias por todo!

A mis hermanos Vania Alejandra, Mario Fernando, Ana Belén y Luis Fernando por su importante apoyo y cariño. Son mi ejemplo a seguir.

A Fabián M. por su constante ayuda y su cariño ¡Muchas gracias!

A mi familia Matamoros y mi familia Ortiz por su cariño y apoyo. En especial a Dafne Matamoros por todos los grandes momentos juntas y por hacer aún más especial este día.

A Uri Nimrod Ramírez Jarquín por su apoyo incondicional y su invaluable ayuda, por alentarme a ser cada vez mejor y por los extraordinarios momentos compartidos ¡Mil gracias!

A mi entrañable amiga Melisa E. Chávez Guerrero por todos estos memorables años juntas, por su constante y valioso apoyo, por su excepcional amistad.

A Karina B. Torres Maldonado por su valiosísimo apoyo y por ser una persona sumamente importante para mí.

A la Dra. Lucy Reidl Martinez por su guía y apoyo durante mis estudios de licenciatura.

A Miguel Tapia, técnico de la Unidad de Microscopía del IIB, por su valiosa ayuda en todo lo relacionado con la microscopía y manejo de imágenes.

A Gabriel Orozco, técnico de la Unidad de Microscopía del IFC, por su apreciable ayuda en la captura de imágenes de microscopía confocal.

A mis compañeros del laboratorio del IIB porque cada uno de ellos me ha enseñado y auxiliado en mi algún aspecto importante de mi proyecto, en especial a David por todos los momentos compartidos, a Eva apoyarme y darme ánimos, y a Andrea por su apreciable compañía en este largo y nada fácil camino de la titulación.

A mis compañeros de la carrera de Psicología: Lucía, Beatriz, Ernesto, Dalia, Diana, Laura, Sandra y Adriana.

A mis amigos del INPRF, Areli Huanosta, Gerardo Anaya y Uri Ramírez por su valiosa amistad.

A la familia Ramirez Jarquín por su apoyo y cariño. Gracias Josué por darme ánimos siempre.

A la familia Chávez Guerrero por su apreciable apoyo y cariño.

A mis amigos Octavio Mercado, Javier Martinez, Jesús Cruz y Miguel Ángel Mejía.

Índice

I.	Resumen.....	5
II.	Lista de abreviaturas.....	7
III.	Marco teórico	
	El citoesqueleto.....	9
	Función y principales componentes.....	9
	Microtúbulos (MTs).....	11
	Neurofilamentos (NFs).....	12
	Microfilamentos (MFs).....	12
	Regulación del citoesqueleto.....	14
	Vía de señalización Wnt.....	15
	Secreción y liberación de proteínas Wnt.....	16
	Las proteínas Wnt y sus receptores.....	18
	Señalización intracelular de la vía Wnt.....	19
	Vía canónica de Wnt.....	19
	Vías Wnt no canónicas.....	20
	La Vía Wnt/PCP.....	21
	Vía Wnt/calcio.....	21
	Moduladores negativos de la actividad de Wnt	
	La familia de los sFRPs.....	24
	La familia Dickkopf.....	24
	Efectos de Wnt en el citoesqueleto.....	25
	Reorganización del citoesqueleto de actina.....	29
	Papel de las Rho GTPasas en la morfogénesis (neuronal).....	30
	Cultivos celulares.....	33
IV.	Justificación.....	34
V.	Hipótesis.....	35
VI.	Objetivos.....	35
VII.	Metodología.....	36
VIII.	Resultados.....	42
IX.	Discusión.....	58
X.	Conclusiones.....	68
XI.	Referencias.....	70

I. Resumen

El citoesqueleto es un sistema muy dinámico y altamente regulable, que determina la estructura y la morfología de las células. Así mismo, está estrechamente relacionado con el proceso de diferenciación celular. Por ejemplo, las neuronas, son células especializadas y polarizadas del sistema nervioso que extienden neuritas para transmitir sus señales; el proceso de polarización neuronal está dirigido por el citoesqueleto y en el participan diversos eventos y vías de señalización como la Wnt, la cual tiene un papel clave en la regulación de procesos como la diferenciación, la dinámica de microtúbulos (MTs) y microfilamentos (MFs), así como, en la organización citoarquitectónica de las proteínas sinápticas, entre otros. Esta vía de señalización está regulada por los genes wnt que codifican una extensa familia de proteínas secretadas ricas en cisteína, involucradas en dos vías de señalización: la canónica, que controla la transcripción de genes blanco a través de la entrada de β -catenina al núcleo; y la no canónica, que tiene a su vez dos rutas de señalización: i) la vía Wnt/Calcio (Ca^{2+}) que se activa por el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} y actúa a través de proteínas dependientes de éste catión como la cinasa C (PKC); y ii) la vía Wnt/PCP compuesta por las GTPasas Rho/Rac y JNK, que regula la polaridad y la migración celular.

En el presente trabajo nos enfocamos en determinar mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal los cambios en el arreglo de los MTs y MFs del citoesqueleto, así como los cambios de la morfología celular inducidos por la activación de la vía Wnt en cultivos de células de neuroblastoma humano diferenciadas e indiferenciadas. Para ello, se activaron farmacológicamente las vías Wnt aplicando un nuevo agonista general de Wnt (aWnt) en concentraciones de 1, 5 y 10 μM . Dado que la vía Wnt se ha visto involucrada en el desarrollo de procesos neuronales como dendritas y axones, y en la elongación de estos procesos en neuronas maduras, se evaluó el efecto del aWnt en cultivos de células de neuroblastoma humano MSN tanto diferenciadas con ácido retinoico y NGF (del inglés, Nerve Growth Factor), como en cultivos de células de neuroblastoma humano no diferenciadas. La duración del tratamiento con el aWnt fue de veinticuatro horas en los cultivos de células de neuroblastoma diferenciadas y de seis días en los cultivos de células no diferenciadas. Brevemente, la activación de esta vía tuvo efectos diferentes en el rearreglo del citoesqueleto de células diferenciadas y células no diferenciadas. En general, se observaron cambios en la organización de las proteínas del citoesqueleto F-actina y α -tubulina, asociados a cambios en la morfología celular, más evidentes en las células de

neuroblastoma no diferenciadas: en el citoesqueleto de actina se observó la formación de filopodios, lamelipodios, fibras de estrés y ondulaciones membranales; mientras que la reorganización de la α -tubulina dio lugar a la formación de centros organizadores de MTs (COMTs), además, se presentó un incremento en su tamaño.

Para dilucidar a través de que vía Wnt (canónica o no canónica) ocurrían los cambios morfológicos observados, se realizaron experimentos con sFRP2 antagonista de la vías vías canónica y no canónica; Dkk-1, antagonista de la vía canónica; así como, con Y-27632, inhibidor de ROCK, proteína que actúa río abajo de la GTPasa Rho, involucrada en la vía de la PCP. Brevemente, Dkk-1 y sFRP2 no previnieron los efectos del aWnt. Sin embargo, la aplicación del inhibidor Y-27632 previno la formación de fibras de estrés en el citoesqueleto de actina, lo cual sugiere la activación predominante de la vía Wnt/PCP y en particular de la GTPasa Rho. Existen trabajos que demuestran que la activación directa de las GTPasas Rho y Rac es capaz de inducir la formación de estructuras semejantes a las observadas (fibras de estrés, filopodios, lamelipodios y ondulaciones membranales) en fibroblastos, lo cual apoya lo antes mencionado. A partir de estos resultados se concluye que la activación de la vía Wnt mediante la aplicación del agonista general aWnt puede modificar la organización de las proteínas F-actina y α -tubulina, lo cual a su vez, cambia la morfología de las células de neuroblastoma humano.

Palabras clave: Wnt, citoesqueleto, morfología celular

II. Lista de abreviaturas

aa	aminoácidos
A β	proteína β -amiloide
APC	Poliposis adenomatosa de colón
AR	ácido retinoico
aWnt	agonista Wnt
BSA	albúmina de suero bovino
CamKII	Calmodulina-dependiente de la proteína cinasa II
Cdc42	del inglés “cell division cycle 42”
Cdk5	proteína cinasa 5 dependiente de ciclina (del inglés “Cyclin- dependent kinase 5”)
CK-1	proteína caseína cinasa
COMTs	centros organizadores de microtúbulos; o MTOCs (del inglés “microtubule-organizing center”)
CRD	dominio amino terminal rico en cisteína
DAPI	diamino-2-phenylindole
DIV	días <i>in vitro</i>
Dkk-1	Dickkopf-1
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dvl	proteína Dishevelled
FI (s)	Filamento(s) intermedio(s)
Fzd	receptor Frizzled
GSK-3	Cinasa sintasa de glucógeno, Glicógeno ó glucógeno sintasa cinasa-3 (del inglés “Glycogen synthse kinase 3”)
GTPasa	Guanosina trifosfatasa o trifosfatasas de guanosina
JNK	del inglés “c-Jun N-terminal kinases”
LDL	lipoproteína de baja densidad
Lef	factor potenciador linfoide (del inglés “lymphoid-enhancing factor”)
LRP	receptor relacionado a LDL (del inglés “low-density lipoprotein receptor-related protein”)
LRP-5/6	lípidos receptor de baja densidad cinco o seis
MAP(s)	proteína(s) asociada(s) a microtúbulos (del inglés “microtubule associated proteins”).

MF(s)	microfilamento(s)
MTs	microtúbulos
NF(s)	neurofilamento(s)
NGF	factor de crecimiento nervioso (del inglés “nerve growth factor”)
PCP	polaridad celular planar (del inglés “planar cell polarity”)
PDZ	acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas: proteína de densidad postsináptica (PSD95), proteína supresora de tumores en <i>Drosophila</i> (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (zo-1) - que fueron en las primeras en las cuales se descubrió el dominio.
PFA	paraformaldehído
PHF	filamentos helicoidales apareados (del inglés “paired helical filaments”)
Rac	del inglés “Ras-related C3 notulinum toxin substrate 1”
Rho	del inglés “Ras homologous member A”
ROCK	del inglés “Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase”
SFB	suero fetal bovino
sFRP-2	del inglés “secreted Frizzled-related protein”
SNC	sistema nervioso central
Tcf	del inglés “T-cell factor”
Wg	gen Wingless
Wls	<i>Wintless</i>
Wnt	nombre de la vía que deriva del gen <i>Wingless</i> (Wg) y del gen <i>INT-1</i> de ratón. Puede pronunciarse como “wint”.

III. Marco teórico

EL CITOESQUELETO

Las células nerviosas se caracterizan por desarrollar procesos citoplasmáticos conocidos como dendritas y axones, elementos esenciales en la formación y establecimiento de redes neuronales funcionales en el cerebro. Esta morfología polarizada que caracteriza a las neuronas está determinada por el citoesqueleto.

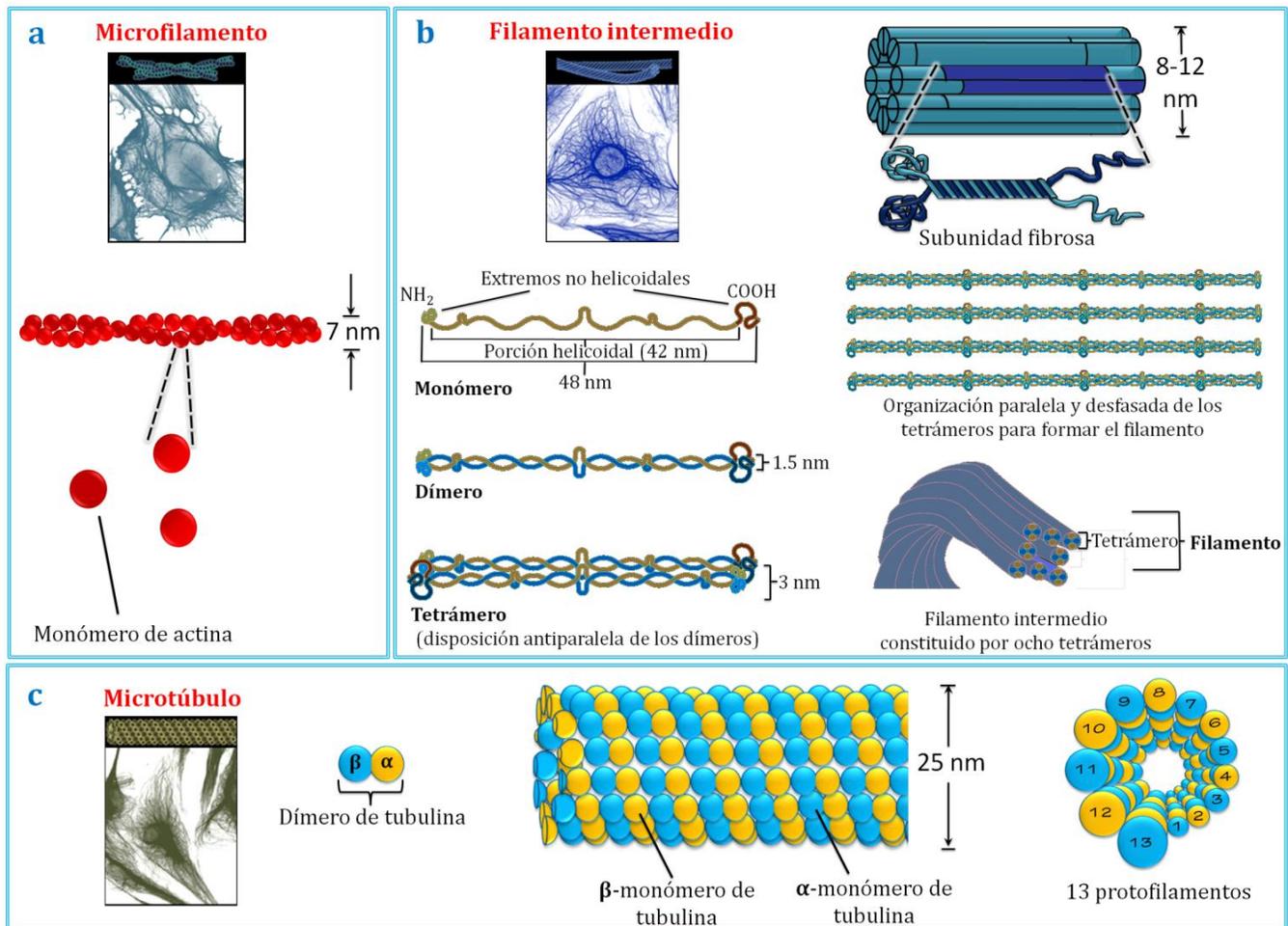
El citoesqueleto celular es una red tridimensional integrada por polímeros filamentosos y proteínas reguladoras que mantienen la integridad de la célula e interviene en diversos procesos como la migración, diferenciación y división celular (Witte y Bradke, 2008; Fletcher y Mullins, 2010; Kaverina y Straube, 2011). El citoesqueleto define la forma y arquitectura celular, lo cual evita la deformación y permite modificar su forma durante el movimiento. Así mismo, participa en el transporte intracelular (p.e. organelos internos) por medio de proteínas motoras y es responsable de la distribución asimétrica de los organelos en el citoplasma. (Rogers y Gelfand, 2000; Kasas, et al., 2005). De manera similar, crea compartimientos, favoreciendo la organización funcional, y participa en procesos de interacciones intracelulares; además de tener un papel importante en la regulación metabólica y en procesos de endocitosis y exocitosis.

Función y principales componentes

La estructura viscoelástica del citoesqueleto es altamente dinámica y se encuentra en constante ensamblaje y desensamblaje (Fletcher y Mullins, 2010), por lo que puede desarrollar tres funciones principales: organizar espacialmente el contenido de la célula; conectar física y bioquímicamente a la célula con su ambiente externo y generar fuerzas coordinadas que le permiten a la célula moverse y cambiar de forma.

Está constituido principalmente por tres estructuras de tipo fibrilar de diferente diámetro y formadas por componentes diferentes: los microtúbulos (MTs) formados por alfa (α)- y beta (β)-tubulina; los filamentos intermedios (FIs) ó neurofilamentos (NFs) compuestos de citoqueratina en las células neuronales; y los microfilamentos (MFs) formados por actina (Figura 1). Cada una de estas estructuras posee proteínas asociadas que de acuerdo a su función se clasifican en: a) proteínas motoras, que participan en la motilidad, la contracción y cambios de forma celulares, así como en el traslado de macromoléculas y organelos; b) proteínas ligadoras, las cuales conectan los filamentos entre sí y con distintas estructuras celulares; y c) proteínas reguladoras que regulan la polimerización y despolimerización de

los MTs, FIs y NFs. Estos filamentos y sus proteínas asociadas constituyen aproximadamente el 25% del total de proteínas de la neurona (Kandel, 2001).



(Figura modificada de: http://fai.unne.edu.ar/biologia/cel_euca/celula3.htm#E1%20citoesqueleto).

Figura 1. Principales componentes estructurales del citoesqueleto. **a. Microfilamento.** Integrado por moléculas de actina monomérica (actina G), que al polimerizarse forma los filamentos de actina (actina F), tienen un diámetro de 7nm aproximadamente. Son esenciales para funciones celulares como la movilidad, la división celular, en el crecimiento y orientación axonal, así como en la formación y elongación de neuritas, entre otros. **b. Filamento Intermedio** (también conocido como neurofilamento). Constituido por monómeros organizados en estructuras filamentosas. Dos monómeros se unen, enrollados uno alrededor del otro para formar un dímero. A su vez, dos dímeros enrollados uno en el otro, constituyen el complejo tetramérico, la unión de varios de estos complejos forman el protofilamento y dos protofilamentos forman la profibrilla. Tres profibrillas constituyen el NF que tienen un diámetro de 8 a 12nm, su función es la de mantener la dimensión axonal y regular el transporte al interior del axón. Se clasifican en 3 tipos según su tamaño: liviano (NF-L; 61kDa), mediano (NF-M; 90 kDa) y pesado (NF-H; 115 KDa). **c. Microtúbulo.** Es la fibra de mayor diámetro (25nm), formada por la polimerización de un dímero de alfa (α) y la beta (β) tubulina. La pared de cada MT está compuesta por 13 protofilamentos formados por los dímeros de α y β tubulina alternados. Está involucrado en el crecimiento y el mantenimiento de la morfología axonal, transporte axonal, así como en la división celular.

Los tres polímeros principales están organizados en redes que resisten la deformación pero pueden reorganizarse en respuesta a fuerzas externas. Las diferencias

más importantes entre estos tres filamentos (MFs, FIs y MTs) del citoesqueleto son: su rigidez mecánica, la dinámica de su ensamblaje, su polaridad y el tipo de proteínas motoras con las cuales se asocian (Fletcher, 2010). A continuación se describen brevemente cada uno de los tres componentes principales del citoesqueleto.

Microtúbulos (MTs)

Los MTs desempeñan un papel crucial en el desarrollo y el mantenimiento de las prolongaciones neuronales. Son cilindros largos y huecos en forma de armazones que se extienden a lo largo de toda la neurona (Figura 2 a, b, c y e). Un único MT puede alcanzar una longitud de 0.1 mm y está constituido por trece protofilamentos en disposición tubular con un diámetro externo de 25-28 nm. Cada uno de estos protofilamentos consta de varios pares de subunidades de α - y β - tubulina, dispuestas linealmente (Figura 1). La estructura polar del dímero de tubulina crea un extremo positivo y un extremo negativo del polímero. En el extremo positivo es donde se polimerizan o alargan los MTs, mientras que en el negativo se despolarizan o acortan. Las subunidades de α - y β -tubulina están codificadas por una familia multigénica, integrada por lo menos de seis genes. En el cerebro están presentes más de veinte isoformas de tubulina debido a la expresión de diferentes genes y a modificaciones postraduccionales (Kandel, 2001; Amos et al., 2005).

La polimerización de los dímeros de tubulina y la organización de los MTs se da a partir de centros organizadores especializados que controlan su localización y orientación en el citoplasma. El centro organizador principal en las células animales es el centrosoma o citocentro, que se encuentra cerca del núcleo y está formado por estructuras en forma de anillo que contienen gama (γ) tubulina, una forma especial de tubulina que puede interactuar con los dímeros de α y β -tubulina. La función principal del centrosoma es la nucleación y anclaje de los MTs, por lo cual es una estructura que de forma genérica se denomina centro organizador de MTs (COMTs). Brevemente, los anillos actúan como centros de enucleación (crecimiento) de MTs; de esta manera, los dímeros de tubulina se añaden al anillo de gama tubulina con una orientación específica, siempre el “extremo -” de cada MT queda dentro del centrosoma y el crecimiento se produce por “extremo +”. En general, las funciones del COMTs están relacionadas con la motilidad celular y con la organización del citoesqueleto (Kollman et al., 2011).

Los MTs experimentan ciclos rápidos de polimerización y despolimerización en las células en división, pero son mucho más estables en las dendritas y axones maduros. Esto

se debe a su interacción con proteínas asociadas a los MTs, las cuales también son concidas como MAPs (del inglés Microtubule-Associated Proteins), que favorecen la polimerización orientada y el ensamblaje de los MTs. Estas proteínas se encuentran distribuidas de manera diferencial, por ejemplo, en axones se encuentran tau y MAP3, mientras que en dendritas se encuentra principalmente MAP2 (Amos et al., 2005).

Neurofilamentos (NFs)

Los NFs, tienen un diámetro de 10 nm, son los “huesos” del citoesqueleto neuronal y los componentes fibrilares más abundantes del axón (en promedio, existen en el axón de 3 a 10 veces más NFs que MTs; Figura 2 c y f). Están relacionados con los FIs de otros tipos celulares, y ambos pertenecen a una familia de proteínas llamadas citoqueratinas (algunos ejemplos son: la vimentina, la proteína ácida fibrilar de la glía, la desmina y la queratina). A diferencia de los MTs, los NFs son muy estables y están casi totalmente polimerizados en la célula (Lee y Cleveland, 1996; Herrmann y Aebi, 2004).

Microfilamentos (MFs)

Los filamentos de actina o MFs tienen un diámetro de 3-5 nm, son los más finos (de menor diámetro) de los tres tipos de fibras que componen el citoesqueleto. Son polímeros polares de monómeros de actina (cada uno de ellos portador de un ATP o ADP) enrollados en una hélice de doble filamento. La actina es un componente importante de todas las células, y quizá la proteína animal más abundante en la naturaleza. Se han identificado varias formas moleculares de actina estrechamente emparentadas, cada una de las cuales es codificada por un gen diferente: la actina α del músculo esquelético, y por lo menos otras dos formas moleculares, β y γ . La actina neuronal está compuesta por una mezcla de la β y γ , que difieren de la actina muscular en unos pocos residuos de aminoácidos (aa) (Kandel, 2001). La mayor parte de la molécula de actina está muy conservada, no sólo en diferentes células de animales sino también en organismos lejanamente emparentados como los seres humanos y los protozoarios.

A diferencia de los MTs y los NFs, los filamentos de actina forman polímeros cortos y están concentrados en la periferia de la célula en el citoplasma cortical situado inmediatamente por debajo del plasmalema, donde junto con un número muy elevado de proteínas ligadoras de actina forman una densa red (Figura 2 b, d y g). Esta matriz desempeña un papel esencial en la función dinámica de la periferia celular en procesos

como: la motilidad, la formación de conos de crecimiento durante el desarrollo, la generación de microdominios especializados en la superficie celular y la formación de especializaciones morfológicas pre y postsinápticas (Cingolani y Goda, 2008).

De forma similar a los MTs, los MFs se encuentran en estado dinámico, experimentan ciclos de polimerización y despolimerización (Papakonstanti y Stournaras, 2008). El estado de la actina en el centro de la célula está controlado por las proteínas ligadoras, las cuales facilitan el ensamblaje y bloquean los cambios de longitud del polímero cubriendo su extremo o cortándolo. Otras proteínas ligadoras establecen enlaces entrecruzados o forman haces de MFs (Winder y Ayscough, 2005). El estado permanentemente dinámico de los MTs y los MFs, permite a la neurona madura la retracción de las prolongaciones viejas y la extensión de nuevas prolongaciones citoplasmáticas.

Además de formar parte del citoesqueleto, los MTs y los filamentos de actina actúan como vías para el transporte de organelos y proteínas mediante motores moleculares como la cinesina y la dineína citoplásmica. Como estos polímeros filamentosos son polares, cada motor impulsa su carga de organelos en una sola dirección. En el axón todos los MTs están dispuestos en paralelo, con el extremo positivo alejado del cuerpo celular y el extremo negativo hacia el cuerpo celular. Esta orientación sistemática permite el movimiento ordenado de distintas clases de organelos a lo largo del axón, manteniendo así su distribución espacial por toda la célula. Los motores de actina, llamados miosinas, median otros tipos de motilidad celular, incluida la extensión de prolongaciones. Así mismo, se cree que la miosina también se ocupa de la translocación de los organelos membranosos en el citoplasma cortical o ectoplasma (región membranal externa, implicada en el movimiento celular; Kandel, 2001). En conjunto, los MTs y los MFs le dan a la célula estructura y movimiento.

En cuanto a su organización, los filamentos de actina pueden formar distintos tipos de proyecciones según la situación de la célula, una de ellas son las lamelipodios (con forma de lámina) y filopodios (con forma filamentosa, forman adhesiones locales con el sustrato), las cuales son estructuras que surgen de la membrana celular y que permiten el movimiento de la célula. Los lamelipodios son la base citoplasmática que asegura la proyección de los filopodios, los cuales son proyecciones microfilamentosas (Etienne-Manneville, 2004; Pollard y Cooper, 2009). Para una mayor claridad, en la siguiente figura se ilustra la disposición del citoesqueleto y sus componentes en una célula neuronal (Figura 2).

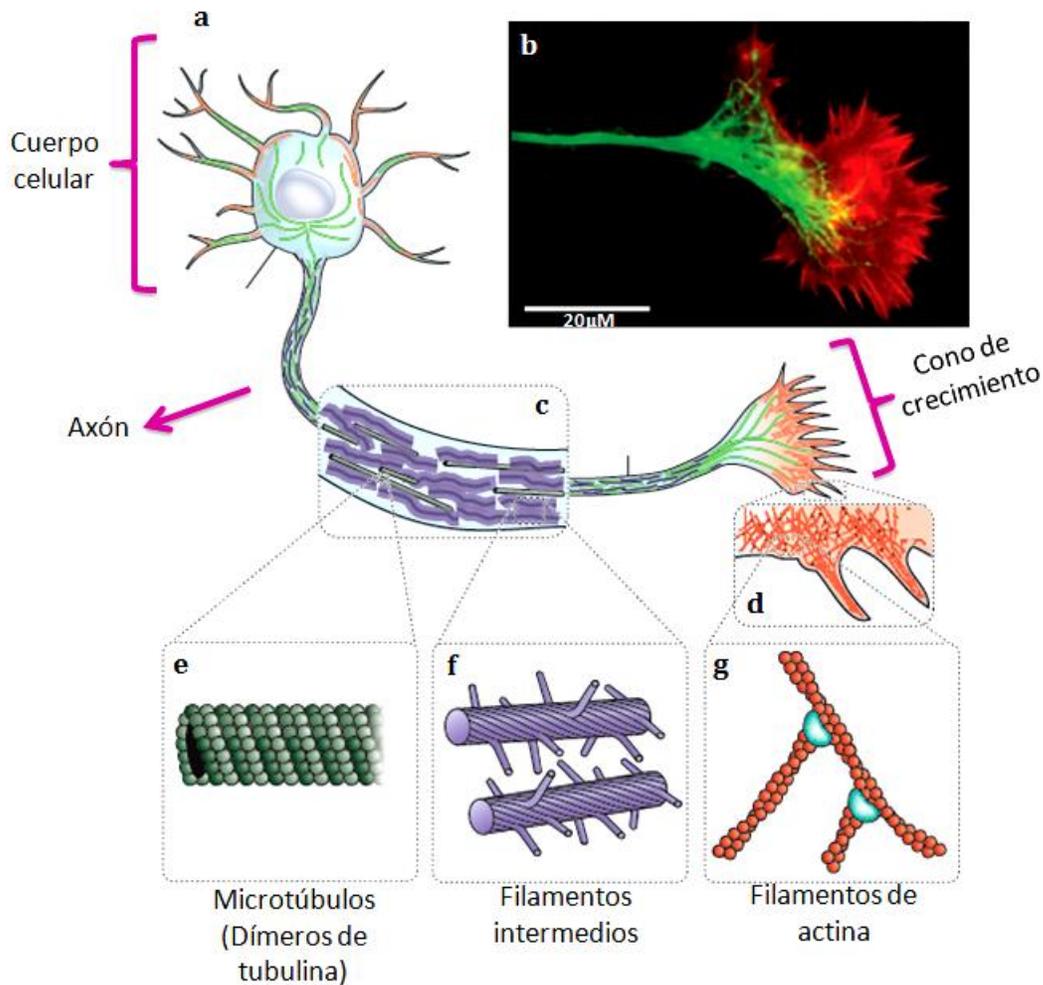


Figura 2. Elementos del citoesqueleto de una neurona. **a.** Esquema de una neurona, en ella se ilustran los tres polímeros principales: MTs (verde), FI (morado) y filamentos de actina (rojo). **b.** Micrografía de un cono de crecimiento en el cual se inmunomarcaron fluorescentemente los MTs (verde) que emanan del axón, y las redes de filamentos de actina (rojo) que forman estructuras similares a pliegos (ó pliegues) y protrusiones en la punta. **c.** Porción del axón en la que se ilustran los MTs y filamentos intermedios. **d.** Esquema del cono de crecimiento en el cual se ilustran las redes y filopodios paralelos de filamentos de actina. **e.** Esquema de los MTs en la que se observa que están compuestos por 13 protofilamentos de dímeros de tubulina, formando un tubo hueco. **f.** Ilustración de los NFs los cuales tienen brazos de polímeros flexibles que repelen los NFs cercanos y determinan el diámetro del axón. **g.** Los filamentos de actina están dispuestos en redes, las cuales pueden tener diversas arquitecturas, incluyendo estructuras ramificadas. Tomada y modificada de Fletcher y Mullins, 2010.

Regulación del citoesqueleto

La dinámica de los diferentes componentes del citoesqueleto se modula por diversas vías de señalización, una de ellas es la vía Wnt cuyas moléculas están involucradas en diversos eventos morfológicos (Shibamoto et al., 1998) y tienen un papel crucial en el establecimiento de la conectividad en el sistema nervioso. Inicialmente, se describió la participación de la vía Wnt en el control de diversos procesos biológicos durante el desarrollo del Sistema Nervioso

Central (SNC) y la homeostasis de tejidos (Logan y Nusse, 2004). Sin embargo, aunque el rol de las proteínas Wnt en neuronas maduras no es totalmente claro, estudios recientes sugieren que la vía Wnt puede regular de manera importante la morfología neuronal, la función sináptica, la neurogénesis y la plasticidad sináptica en el cerebro adulto (Mercado-Gómez, 2008; Lie et al., 2005; Zhang et al., 2011). Existen evidencias que demuestran que la señalización de esta vía interviene en la formación y la modulación de los circuitos neuronales por medio de su participación en funciones celulares como el posicionamiento, migración y polarización neuronal, así como en el desarrollo dendrítico y axonal, la orientación axónica y la formación de sinapsis (sinaptogénesis) (Salinas y Zou, 2008). Recientemente, se ha mostrado que las proteínas Wnt también tienen una función crucial en la fisiología sináptica, ya que es capaz de modular el ciclo de vesículas sinápticas, el tráfico de receptores y de neurotransmisores, así como la interacción de estos receptores con proteínas de andamiaje en regiones postsinápticas (Inestrosa y Arenas, 2010). La diversidad de papeles en los que estas proteínas Wnt participan, se debe no sólo al gran número de ligandos y receptores que posee, sino también a su habilidad para señalar intracelularmente a través de diferentes vías, así como a los contextos del desarrollo neuronal (Salinas y Zou, 2008).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

Los genes wnt codifican una amplia familia de polipéptidos secretados esenciales para un amplio rango de procesos fisiológicos y del desarrollo. El nombre de la vía Wnt deriva del gen Wingless (Wg) de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y del gen INT-1 del ratón, y puede pronunciarse como “wint”. Actualmente se conocen diecinueve genes wnt en mamíferos, los cuales pueden dividirse en 12 subfamilias, muchas altamente conservadas en organismos multicelulares simples. La mayoría de los genes wnt contienen cuatro exones de codificación, y la metionina de iniciación en el exón 1. Los genes wnt que difieren de éste patrón incluyen wnt-14 con tres exones; wnt-2, wnt-5b y wnt-11, con cinco exones, y wnt-8b con seis exones. Varios genes wnt como wnt-2b, wnt-13, wnt-8a/d, y wnt-16, tienen terminales amino o carboxilo alternativos, los cuales resultan del uso alternativo de exones 5' ó 3' (Miller, 2002).

En humanos, se han identificado diecinueve proteínas Wnt y aunque poco se sabe acerca de su estructura, todas presentan patrones conservados de 23 a 24 residuos de cisteína cuyo espaciamiento está altamente conservado, con secuencias de amino ácidos

muy similares (del 27% al 83%; Coudreuse y Korswagen, 2007; Miller, 2002), lo que sugiere que el plegamiento de la proteína Wnt puede depender de la formación de varios puentes disulfuro intramoleculares.

El análisis de la actividad de señalización de las proteínas Wnt quiméricas ha mostrado que la región carboxilo terminal de estas proteínas puede ser importante en la determinación de la especificidad de las respuestas (Du et al., 1995). Además, mutantes por delección carentes del tercer carboxilo-terminal de una proteína Wnt, pueden actuar como dominantes negativos, sugiriendo que la región amino-terminal puede mediar las interacciones con los receptores Wnt pero requiere el carboxilo terminal para la activación del mismo.

Todas las proteínas Wnt muestran características comunes esenciales para su función, incluyendo un péptido señal (secuencia señal amino-terminal) para la secreción, muchos sitios de glicosilación potenciales y múltiples residuos de cisteína responsables de un adecuado plegamiento y secreción. Con pocas excepciones (Wg, Wnt3/5, y Wnt4), las proteínas Wnt tienen generalmente cerca de 350-400 aa y tienen un peso aproximado de 40 kDa. Todas las proteínas Wnt humanas son muy similares en tamaño, ya que su peso varía entre 39kDa (WNT7a) a 46kDa (WNT10a) (Miller, 2002).

Secreción y liberación de proteínas Wnt

En la célula, el proceso de transformación de las proteínas Wnt de precursores inmaduros a moléculas de señalización capaces de interactuar con complejos receptores específicos en células blanco localizadas hasta de 20-30 diámetros celulares (de la célula liberadora) de distancia ocurre de la siguiente manera (Willert et al., 2003; Mikels y Nusse, 2006): las proteínas Wnt se sintetizan inicialmente como precursores que contienen un péptido señal N-terminal hidrofóbico que dirige la proteína inmadura al retículo endoplásmico (RE). En el RE, una proteasa residente corta al péptido señal y la proteína Wnt se modifica ampliamente por la adición de azúcares y lípidos para asegurar su secreción eficiente, su liberación intercelular, y para maximizar su actividad biológica en las células blanco (Hausmann et al., 2007). Probablemente la modificación más significativa que ocurre es la adición de una fracción de palmitato al residuo conservado de las Wnts Cys 77, que las convierte en proteínas hidrofóbicas (Willert et al., 2003). Esta modificación es esencial para su actividad biológica en líneas celulares, ya que la inhibición de la enzima aciltransferasa (que suele ser necesaria para la modificación de lípidos) o mutaciones en el sitio de modificación del

residuo conservado de Cys Wnt, resulta en una proteína que no es hidrofóbica ni activa (Willert et al., 2003; Zhai et al., 2004). Una segunda lipidación de importancia, es la adición de palmitato a la serina 209, cuya mutación resulta en la acumulación de Wnt-3A en el RE y la falla en su secreción (Takada et al., 2006).

La eficiencia en la secreción de las proteínas Wnt es un proceso complejo que requiere de la acción concertada de varios genes conservados. Esto es evidente por el descubrimiento de otro gen llamado *Wntless* (Wls), el cual codifica una proteína de siete cruces transmembranales altamente conservada desde gusanos (*mom-3*) hasta el hombre (hWLS). La inactivación de este gen en células productoras de Wnt acorta el circuito de secreción de estas glicoproteínas y conduce a la retención de la proteína Wnt dentro de la célula. Aunque no se conoce la función precisa de Wls, se sabe que reside en gran medida en el aparato de Golgi (AG) donde interactúa físicamente con las proteínas Wnt. Esto ha llevado a especular que Wls puede actuar como una chaperona que guía a las proteínas Wnt a través de modificaciones post-traduccionales necesarias para su eficiente secreción ó para regular su tráfico intracelular entre diferentes compartimientos celulares camino a su liberación en el espacio extracelular (Clevers, 2006. Figura 3).

Existen otras proteínas involucradas en el control del destino de Wnt y en su paso a través de los mecanismos de secreción de las células. Antes de su secreción, estas proteínas residen en un complejo llamado retrómero, implicado en el tráfico intracelular en muchas especies. (Coudreuse et al., 2006). Dicho complejo está compuesto por cinco subunidades Vps5, Vps17, Vps26, Vps29 y Vps35, y media el tráfico de proteínas membranales entre los endosomas y el AG (Attar y Cullen, 2010; Hausmann et al., 2007). Recientemente, varios trabajos han reportado que el complejo retrómero se requiere para la recuperación y el reciclamiento de Wls desde el endosoma hasta el Golgi (Belenkaya et al., 2008; Franch-Marro et al., 2008b; Pan et al., 2008; Port et al., 2008; Yang et al., 2008), estos procesos son mediados por la interacción directa entre Wls y la subunidad Vps35 del retrómero. La pérdida de la función del retrómero causa que Wls sea degradado en los lisosomas, lo que lleva a la reducción de Wls y por lo tanto de la secreción de Wnt.

Una vez secretadas, las proteínas Wnt se asocian con glicosaminoglicanos en la matriz extracelular, los cuales modulan su distribución, difusión y transducción de señales, ya que están estrechamente ligados a la superficie de la célula (Bradley y Brown, 1990; Reichsman et al., 1996; Logan y Nusse, 2004).

Las proteínas Wnt son morfógenos clásicos, es decir, moléculas de señalización cuya actividad depende de su concentración, y por lo tanto forman gradientes a grandes distancias capaces de activar la señalización en células diana que se encuentran a una distancia de 20-30 diámetros celulares de la célula liberadora de Wnt (Logan y Nusse, 2004).

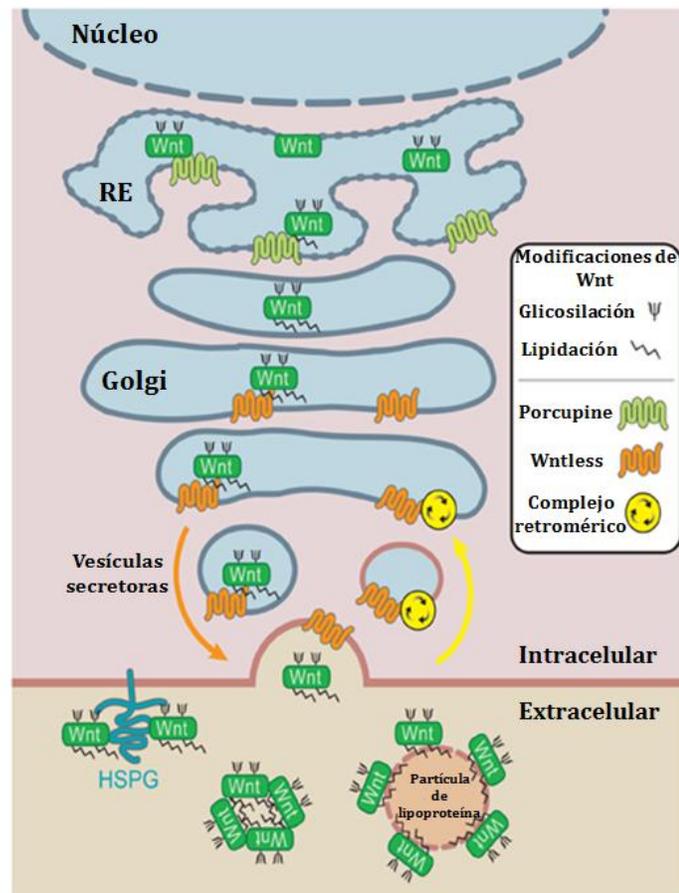


Figura 3. Ruta de la biogénesis y secreción de Wnt. Al ingresar al RE, las proteínas Wnt son reconocidas por Porcupine quien la acompaña durante su proceso de glicosilación hasta su llegada al AG, en donde Wnt se asocia a Wls para después ser lipidada. Al abandonar el AG, Wnt junto con Wls se transportan en vesículas excretorias hasta la membrana celular para su secreción. Wls se recupera en vesículas endocíticas hacia el Golgi por el complejo retrómero. Después de su secreción, los Wnts maduros pueden acoplarse a HSPGs (del inglés “Heparan sulfate proteoglycans”), a partículas de lipoproteínas ó formar multímeros que modulan los gradientes de Wnt y facilitan su señalización de largo alcance. La estequiometría del número de moléculas Wnt y sus interacciones con las diversas partículas nombradas fueron dibujadas arbitrariamente. Tomada y modificada de MacDonald et al., 2009.

Las proteínas Wnt y sus receptores

La recepción y transducción de las señales Wnt involucra el acoplamiento de las proteínas Wnt a miembros de dos familias distintas de receptores de superficie celular, la familia de genes Frizzled (Fdz o Fz) y la familia de la proteína relacionada a receptor LDL (LRP). El receptor Fzd tiene un dominio amino terminal rico en cisteína (CRD, del inglés “Cistein rich

domain”) que se acopla a Wnt, siete dominios transmembranales y un tallo citoplásmico corto que contiene un dominio consenso de unión a PDZ en el extremo carboxilo. El CRD forma una proteína nueva plegada con una interfase de dimerización que puede ser importante para la unión de Wnt. Fzd es el principal responsable del acoplamiento de las proteínas Wnt en la membrana plasmática y ha sido identificado en vertebrados e invertebrados; hay diez miembros conocidos en humanos y ratones (Schulte, 2010). La estructura general de los receptores Fzd se asemeja a los receptores transmembrana de siete cruces acoplados a proteínas G. (Schulte, 2010). Existen moléculas adicionales que están implicadas en la activación de la vía de señalización. Dos miembros de la familia de receptores LRP, LRP-5 y LRP-6 pueden unirse a las proteínas Wnt y formar un complejo ternario con Wnt y Fzd, actuando como co-receptor de este último. Aunque el mecanismo de señalización de LRP no es claro, se sugiere que la unión del dominio citoplásmico de LRP con Axina (proteína que forma parte de un complejo de destrucción cuya actividad antagoniza la señalización de Wnt), puede desempeñar un papel en la activación de la vía Wnt (He et al., 2004).

Además de Fzd y LRP5/6, otros receptores pueden participar en la transducción de la señalización de Wnt, como: 1) el receptor de tirosina cinasa Ror2; que contiene un dominio rico en cisteína similar al dominio de Fzd; 2) el receptor atípico de tirosina cinasa Derailed (Drl), y 3) el receptor relacionado a la proteína tirosina cinasa (Ryk), el cual puede interactuar con Fzd (Bovolenta et al., 2006; en Bovolenta, 2008).

Señalización intracelular de la vía Wnt

El acoplamiento de las proteínas Wnt secretadas a complejos receptores específicos presentes en las membranas de las células blanco pueden activar a una de las tres vías de señalización intracelulares de Wnt: 1) la vía canónica *T-cell factor* [Tcf]/ β -catenina, 2) la vía no canónica de la polaridad celular planar (PCP; del inglés “planar cell polarity”) ó 3) la vía no canónica Wnt/Calcio (Wnt/Ca²⁺). Cada una de estas vías proporciona un conjunto diferente de instrucciones para la célula receptora mediante la activación de un conjunto específico de proteínas ó genes blanco (Figura 4).

VÍA CANÓNICA DE WNT

Esta vía controla los niveles intracelulares de la proteína citoplásmica β -catenina, la cual tiene papeles cruciales tanto en la adhesión celular como en la activación de los genes diana

de Wnt (Clevers, 2006). En ausencia de la señal Wnt, β -catenina se captura eficientemente por la proteína de andamiaje Axina, que forma parte de un complejo de proteínas conocido como “complejo de destrucción” (por que destruye a β -catenina), en el que también están presentes APC (Poliposis adenomatosa de colón), la proteína caseína cinasa (CK)-1 y GSK-3 (Figura 4a).

APC es un componente esencial del complejo de destrucción que permite el reclutamiento y anclaje eficiente de β -catenina. Por su parte la proteína de andamiaje Axina, coordina la fosforilación secuencial de β -catenina en la Ser45 por el residente CK1 α y subsecuentemente en la Thr41, la Ser37 y la Ser33 por la proteína cinasa GSK3 β . La fosforilación del N-terminal de la β -catenina capturada, genera un sitio de acoplamiento para la ubiquitina ligasa E3, que se dirige a β -catenina para su rápida degradación mediada por proteosoma (Kimelman y Xu, 2006). La supresión eficaz de los niveles de β -catenina permite que en el núcleo, las proteínas Groucho se acoplen libremente a las proteínas Tcf/factor potenciador linfoide (Lef); así, estos complejos Tcf/Groucho suprimen activamente la activación transcripcional de los genes wnt diana como c-Myc, lo que silencia una gran variedad de respuestas biológicas, incluyendo la proliferación celular.

La vía canónica se activa cuando el complejo de receptores integrado por Fzd y LRP5/6 reconocen a las proteínas Wnt, lo que desencadena la fosforilación de las proteínas Dishevelled (Dvl) y promueve su interacción con las proteínas Fzd. Los complejos Dvl/receptor resultantes, se cree que estimulan la formación de agregados de LRP6 en la membrana, lo cual facilita la fosforilación de las colas intracelulares de LRP6 por CK1 γ y subsecuentemente por GSK-3 β (MacDonald et al., 2009). Como consecuencia, este complejo receptor recluta a Axina, provocando que la degradación de β -catenina se detenga, aumentando su concentración y su translocación al núcleo, donde interactúa con los miembros de la familia Tcf/Lef, convirtiéndolos en potentes activadores transcripcionales mediante el reclutamiento de proteínas co-activadoras, garantizando la activación eficiente de los genes blanco de Wnt.

VÍAS WNT NO CANÓNICAS

Se han descrito dos rutas independientes de β -catenina, también conocidas como vías Wnt no canónicas: 1) Wnt/ PCP, vía que señala a través de las pequeñas GTPasas (de aproximadamente 200 aa de longitud) Rho (del inglés “Ras homologous member A”) y Rac (del inglés “Ras-related C3 notulinum toxin substrate 1”), y que promueve cambios en el

citoesqueleto de actina; 2) Wnt/ Ca^{2+} , que modula los niveles intracelulares de Ca^{2+} regulando negativamente la vía Wnt/ β -catenina (Li et al., 2005; De, 2011).

La Vía Wnt/PCP

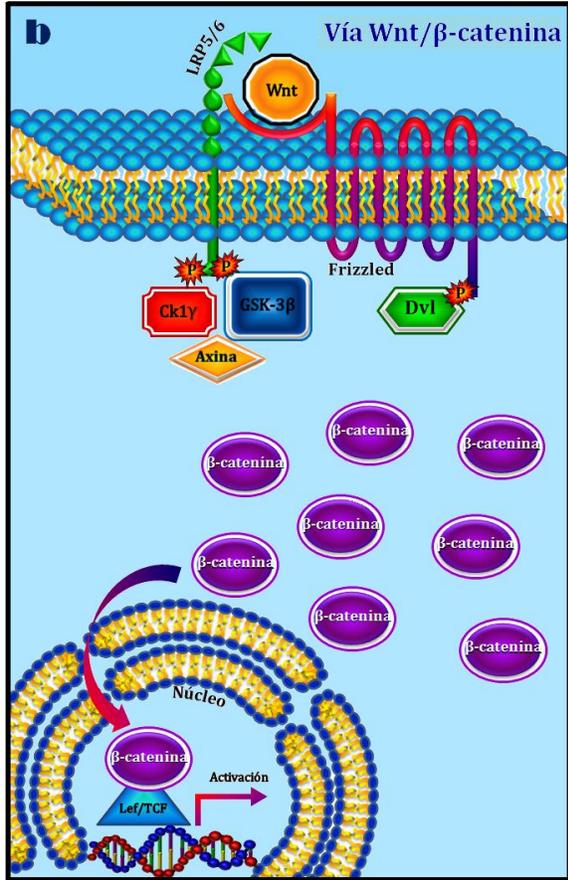
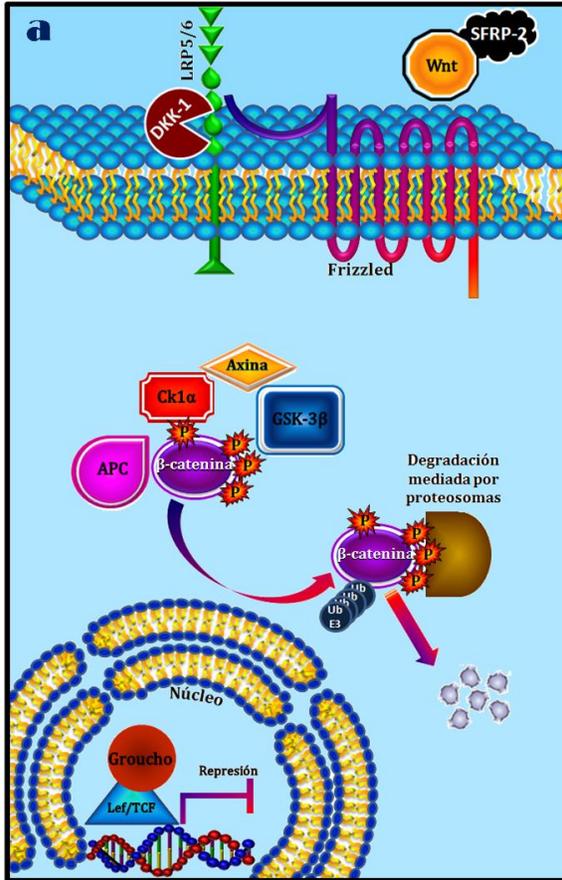
Wnt regula la polarización del citoesqueleto mediante la reorganización de la distribución de actina a través de GTPasas como Rho y Rac activadas por Dvl (Figura 4c). Se sabe que estas proteínas pueden regular el arreglo del citoesqueleto en diversos contextos (Hall, 1998), donde Rho conduce al ensamblaje de los filamentos contráctiles de actina-miosina que se conocen como fibras de estrés, y que en última instancia conducen a la formación de complejos de adhesión focal (Ridley et al., 1992), mientras Rac se asocia con la formación de una malla de filamentos de actina en la periferia de la célula que producen lamelipodios y ondulaciones (también conocidas como rizos o rufles) en la membrana celular (Ridley et al., 1992). Diversos trabajos se ha mostrado que Rho y Rac median la polaridad celular; en estos experimentos, la activación de Rho promueve la formación de protuberancias celulares, mientras la activación que Rac produce un incremento en el número de filopodios.

Un blanco específico río abajo de Rho es la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK, del inglés “Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase”), que modula el rearrreglo del citoesqueleto a través de la fosforilación directa de la cadena ligera de actina-miosina II (Marlow et al., 2002; Winter et al., 2001). Por su parte, el mecanismo mediante el cual Rac regula el rearrreglo del citoesqueleto río abajo de Wnt aún no se conoce (Fanto et al., 2000; Boutros et al., 1998; Kim y Han, 2005; Strutt et al., 1997).

La Vía Wnt/Calcio

La modulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} da lugar a la segunda vía no canónica. La señalización Wnt/ Ca^{2+} tiene funciones relevantes en la regulación negativa la vía canónica, entre otras. El vínculo entre la señalización de la vía Wnt independiente de β -catenina y el Ca^{2+} se propuso dado que Wnt-5a, y Fzd2 pueden actuar de manera sinérgica, entre la proteína G y fosfolipasa-C de manera dependiente para incrementar la concentración de Ca^{2+} celular durante el desarrollo del pez cebra (Slusarski et al., 1997). Además de Wnt-5a, varias de las proteínas centrales de transducción que regulan la vía Wnt/PCP y la PCP en la *Drosophila* también regulan la vía Wnt/ Ca^{2+} , entre ellas están los receptores Fz2, Fz3, Fz4 y Fz6 que activan específicamente efectores río abajo de la señalización intracelular de Ca^{2+} . Sin embargo, el mecanismo de acción de la transducción de la vía Wnt/ Ca^{2+} en la membrana aún no está bien caracterizado.

VÍA WNT CANÓNICA



VÍAS WNT NO CANÓNICAS

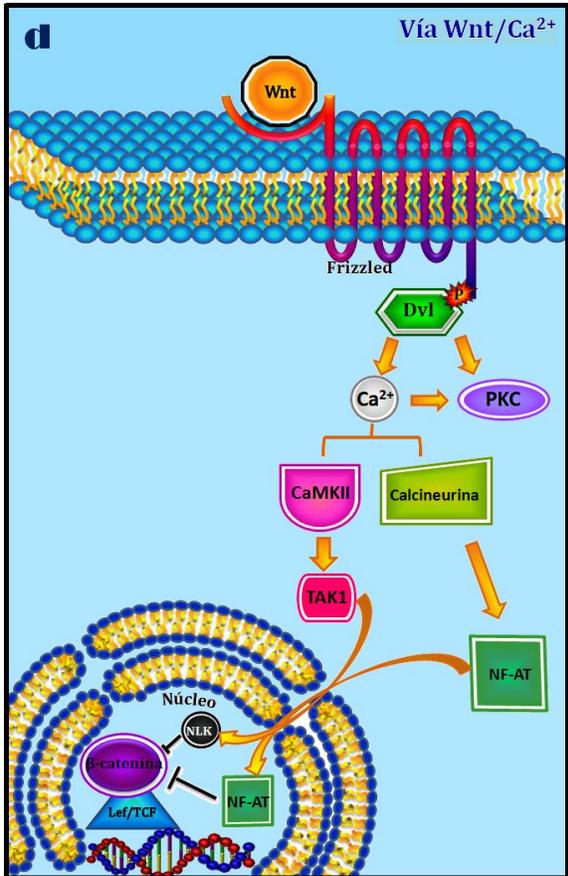
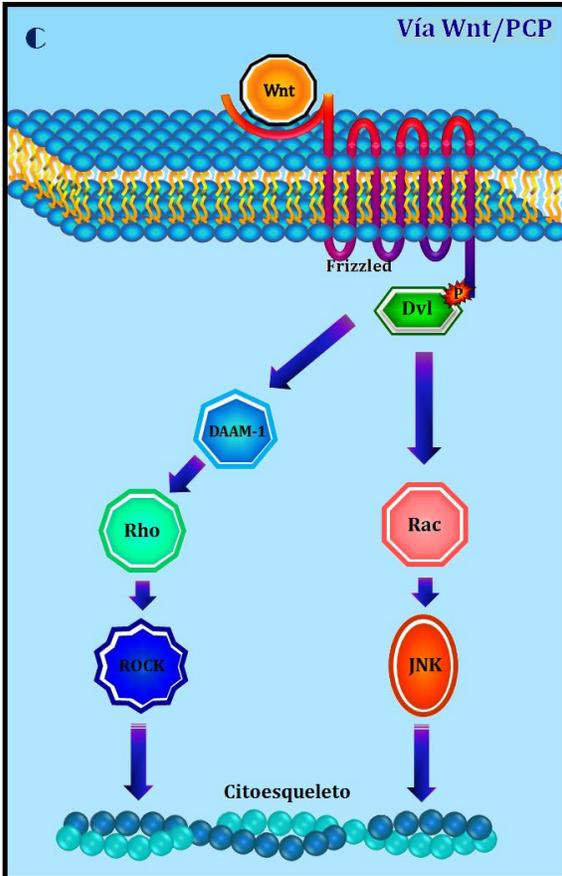


Figura 4. Las tres principales vías de señalización Wnt. **a)** *En ausencia del ligando Wnt* el complejo de destrucción multiproteico integrado por APC y Axina, facilita la ubiquitinación de β -catenina por la ubiquitina ligasa. Esta etiqueta de ubiquitina marca a β -catenina para su destrucción por el proteasoma. La señalización de Wnt también es regulada por antagonistas como: 1) sFRP-2 que previene el acoplamiento de Wnt con su receptor impidiendo la señalización tanto en la vía canónica como en la no canónica; 2) Dkk-1 que interactúa con LRP5/6 provocando su endocitosis, previniendo así la formación del complejo LRP5/6-Wnt-Fzd. Además, también induce la liberación de Axina, permitiéndole participar en la degradación de β -catenina. **b)** *Vía Wnt/ β -catenina*. El ligando Wnt se acopla a los receptores Fzd y LRP5/6 para formar un complejo receptor activo. El reclutamiento y fosforilación de Dvl por Fzd permite la fosforilación subsecuente de LRP5/6 por Cky y GSK-3 β . A su vez, LRP5/6 recluta y desestabiliza Axina contribuyendo al incremento en los niveles citosólicos de β -catenina. La interacción de Dvl con Axina antagoniza la actividad de GSK-3 β , previniendo ubiquitinación de β -catenina. Los niveles citosólicos de β -catenina aumentan y se trasloca al núcleo favorece la transcripción de los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina. **c)** En la vía de transducción *Wnt/PCP*, Fdz actúa a través de la activación de Dvl, el cual señala por medio de las GTPasas Rho, Rac o ambas. La activación de Rac señala a través de JNK, mientras que Rho lo hace por medio de ROCK. DAAM-1 está involucrado río arriba en la señalización de Rho. Esta vía induce cambios en el citoesqueleto. **d)** La activación de la *vía Wnt/ Ca^{2+}* permite el incremento del Ca^{2+} intracelular y con ello la activación de PKC y la estimulación de múltiples enzimas incluidas la calcio calmodulina kinasa (CamKII) y la proteína fosfatasa calcineurina, esta última deriva en la importación nuclear del factor de transcripción NF-AT. CamKII fosforila TAK1 que activa NLK, el cual a su vez inhibe la transcripción de genes blanco de la vía Wnt canónica.

MODULADORES NEGATIVOS DE LA ACTIVIDAD DE WNT

La actividad de moléculas Wnt secretadas se modula en el espacio extracelular por diferentes antagonistas extracelulares que previenen las interacciones ligando-receptor y pueden dividirse en dos clases: la primera clase incluye la familia de las sFRP (del inglés “secreted Frizzled-related protein”), WIF (del inglés “Wnt inhibitory factor”)-1 y Cerberus, las cuales principalmente se acoplan a las proteínas Wnt, previniendo su interacción con su receptor. La segunda clase comprende a ciertos miembros de la familia de los Dickkopf (Dkk), los cuales se acoplan al componente LRP5/LRP6 del complejo receptor Wnt. Por lo tanto, los antagonistas de la primera clase (sFRP) pueden inhibir ambas vías, canónica y no canónica, mientras que los antagonistas de la clase de Dickkopf inhiben específicamente la vía canónica (Kawano y Kypta, 2003). Sin embargo, ciertos sFRP y Dkks no antagonizan la función de Wnt, por ejemplo, Dkk-3 favorece la actividad de Wnt, lo cual sugiere papeles aun no conocidos para estas familias (Kawano and Kypta, 2003). A continuación se describirán dos de los principales antagonistas de la vía Wnt, sFRP y Dkk, que fueron los que se utilizaron para los experimentos de esta tesis.

La familia de los sFRPs

Los sFRP son una familia de proteínas solubles estructuralmente relacionadas al CRD de los receptores Fzd. Muchas de las funciones atribuidas a los sFRPs están ligadas a su rol como inhibidores de las vías Wnt canónica y no canónica, y algunas otras tienen mecanismos de acción independientes de dichas vías (Rodriguez et al., 2005). Los sFRPs no son proteínas que se acoplan exclusivamente a Wnt, también pueden antagonizar la actividad de otras proteínas (Yoshino et al., 2001), acoplarse a los receptores Fzd (Bafico et al., 1999; Rodriguez et al., 2005) y proveer información para la guía axonal (Rodriguez et al., 2005). Además, pueden interactuar con otros receptores o moléculas de la matriz extracelular (Chuman et al., 2004; Hausler et al., 2004; Lee et al., 2004) y su actividad es fundamental en la homeostasis de tejidos. Su expresión está alterada en diferentes tipos de cánceres (Rubin et al., 2006) y en patologías óseas (Jones et al., 2000; Bovolenta et al., 2008).

La familia sFRP en humanos está constituida por ocho miembros de los cuales, sólo cinco tienen una nomenclatura unificadora, sFRP1 a sFRP5; aunque sFRP3 es mejor conocido como FrzB (por el motivo Frizzled asociado con el desarrollo óseo; del inglés "Bone") La secuencia de comparación y los análisis filogenéticos muestran que sFRP1, sFRP2 y sFRP5 están cercanamente relacionados, y forman un subgrupo que se diferencia de uno formado por sFRP3 y sFRP4.

El patrón de expresión de los sFRPs es variable a través del tiempo, en algunos casos sFRPs individuales se expresan de manera parcialmente simultánea que puede ser complementaria a la expresión de algunas proteínas Wnt, sugiriendo que en algunos casos hay cierta redundancia en su actividad como inhibidores de Wnt. En otros casos, su expresión parece ser independiente de la distribución de las proteínas Wnt.

Aun no es claro si los sFRPs antagonizan la señalización de Wnt al interactuar con los ligandos Wnt a través del CRD (Lin et al. 1997) o a través del dominio C-terminal (Uren et al., 2000). Sin embargo, se sabe que los sFRPs pueden bloquear la señalización Wnt, ya sea por su interacción con las proteínas Wnt para prevenir su acoplamiento a las proteínas Fzd, o por la formación de complejos no funcionales con Fzd (Kawano and Kypta., 2003).

La familia Dickkopf

La familia Dkk está constituida por cuatro miembros (Dkk-1 a Dkk-4) y una única proteína relacionada a Dkk-3 llamada Soggy (Sgy) (Krupnik et al., 1999). Dkk-1 inhibe la estabilización de β -catenina inducida por Wnt (Fedi et al., 1999) y la transcripción

dependiente de β -catenina/Tcf. Sin embargo, de manera diferente a los sFRPs, Dkk-1 previene la activación de la vía Wnt a través de su acoplamiento a LRP5/6 y no a las proteínas Wnt (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001).

Además de unirse a LRP5/6, Dkk-1 interactúa con otra clase de receptor, una proteína de un solo paso transmembrana, Kremen1 (Krm1) y Kremen2 (Krmn2) (Mao et al., 2002). De esta manera, Krm, Dkk-1 y LRP5 forman un complejo ternario que interrumpe la señalización Wnt/LRP6 promoviendo la endocitosis y la remoción del receptor de Wnt de la membrana plasmática (Mao et al., 2002). A través de la promoción de la internalización de LRP5/6 por medio de Krm, Dkk-1 puede inhibir el reclutamiento de Axina a la membrana plasmática.

Debido a que el tema principal del presente trabajo se refiere al análisis de los cambios en el citoesqueleto neuronal provocados por la activación de las vías Wnt, los trabajos que se mencionan a continuación describen algunos de los efectos de la vía de señalización Wnt y varios de sus componentes sobre el citoesqueleto celular. Estos antecedentes contienen información sobre los efectos conocidos del tratamiento con Wnt en el citoesqueleto de células neuronales, la función de las GTPasas sobre la regulación del citoesqueleto y finalmente, algunos de los cambios que pueden ocurrir en el citoesqueleto de actina

Efectos de Wnt en el citoesqueleto

Además de su participación en diferentes procesos durante el desarrollo, se ha demostrado que varios miembros de la familia de proteínas Wnt se expresan aún después de que las células han alcanzado su destino y maduración (Salinas et al., 1994).

El papel de la vía Wnt canónica en la regulación de la expresión de genes a través de la modulación de los niveles de β -catenina ha sido bien establecido. Sin embargo, se ha visto que una vía Wnt canónica divergente puede regular directamente los MTs del citoesqueleto a través de cambios en la actividad, destino y estabilidad de reguladores del citoesqueleto, y no sólo indirectamente a través de la inducción de cambios en la expresión de genes (Salinas, 2007).

Los resultados de algunos estudios en neuronas en desarrollo, muestran que la vía Wnt regula directamente los MTs para controlar la forma celular y la orientación. Asimismo, durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, la señalización de Wnt regula la migración y polarización celular, el crecimiento de neuritas y la búsqueda del destino celular, así como cambios en la arborización de axones y dendritas (Salinas, 2007).

El efecto directo de la señalización de Wnt sobre la regulación del citoesqueleto se ha evaluado durante la remodelación axonal. En el cerebelo o en la médula espinal, las proteínas Wnt funcionan como señales retrógradas expresadas por neuronas blanco para regular la remodelación de la terminal de los axones antes de la formación sináptica (Hall et al., 2000; Lucas y Salinas, 1997; Krylova et al., 2002). Wnt induce profundos cambios en la morfología y el crecimiento de axones a través de cambios en el citoesqueleto, en particular en los MTs. Las proteínas Wnt disminuyen la extensión del axón pero incrementan la ramificación axonal y el diámetro, así como el tamaño y la complejidad de los conos de crecimiento (Salinas, 2007). De hecho, el incremento en el diámetro del axón está asociado con un incremento en el número de MTs dinámicos y estables, mientras que el incremento en el tamaño del cono de crecimiento se correlaciona con la presencia de un amplio número de MTs bucle. También se ha visto que Wnt induce una pausa en el crecimiento del cono, cambios en el citoesqueleto que son mediados por la inhibición de GSK-3 β , enzima cuya función se ha relacionado con la polaridad de células neuronales (Salinas et al., 2007).

Evidencia reciente que sustenta el papel de la vía de señalización Wnt canónica en la regulación de los MTs, muestra la expresión de Wnt-3 y Wnt-7a en neuronas del cerebelo durante la extensión de procesos y la formación de sinapsis (Lucas y Salinas, 1997; Salinas et al., 1994). Se ha reportado que Wnt-7a se expresa en células granulares del cerebelo de ratón durante el desarrollo postnatal y favorece la extensión y ramificación del axón. Por otro lado, en células granulares en cultivo, Wnt-7a induce la remodelación axonal e incrementa los niveles de sinapsina I. Estos efectos se mimetizan con cloruro de litio (LiCl), que es un compuesto ampliamente utilizado como inhibidor de GSK-3 β (Lucas y Salinas., 1997).

En otros trabajos se ha mostrado por análisis de inmunohistoquímica que en presencia de Wnt-3a, los microfilamentos de actina se reorganizan formando un alineamiento direccional de las fibras de estrés de actina y otras proteínas asociadas a actina en células de la línea celular epitelial mamaria C57MG de ratón (Shibamoto et al., 1998). Además, la proteína de unión a actina, “vilina ó villina”, localizada sólo en las regiones perinucleares de las células C57MG control, se redistribuye ubicándose en los bordes en crecimiento periféricos de las células tratadas con este agonista Wnt, colocalizando con F-actina (Shibamoto et al., 1998). Estos resultados sugieren que la forma soluble de la proteína Wnt-3a, puede actuar como una señal que reorganiza el citoesqueleto de actina.

El primer indicio de que la señalización de Wnt podía regular directamente el citoesqueleto surgió de los estudios que demostraron que Dvl está estrechamente asociada

con los MTs, ya que se observó un doble marcaje de tubulina acetilada y DVL-1, así como altos niveles de DVL-1 que colocalizaron con MTs axonales de células granulares de cerebelo en cultivo (Miller et al, 1999; Krylova et al., 2000). En neuronas en desarrollo, el Dvl endógeno se asocia preferencialmente a MTs estables (Krylova et al., 2000). La activación de la vía Wnt a través de Dvl incrementa la estabilidad de los MTs de tal manera que se vuelven más resistentes a la despolimerización por nocodazol (Ciani et al., 2004; Krylova et al., 2000). También se ha visto que la estabilidad de los MTs está mediada por la inhibición de GSK-3 β pero a través de una vía independiente de transcripción (Ciani et al., 2004). Otro resultado interesante es que Axina, considerado como regulador negativo de la vía Wnt canónica, se acopla y estabiliza a los MTs (Ciani et al., 2004), lo que sugiere que axina es un modulador más que un inhibidor de la vía Wnt, o incluso que tenga un papel dual. Juntos estos resultados muestran que una vía Wnt canónica que diverge río abajo de GSK-3 β regula los MTs, produciendo profundos cambios en el citoesqueleto celular (Salinas, 2007).

De entre los componentes de la vía de señalización Wnt, estudios recientes han mostrado que GSK-3 β actúa como un regulador importante de la polaridad neuronal, ya que usando diferentes tipos de inhibidores de GSK-3, se ha visto que GSK-3 α y β actúan como reguladores negativos en la formación del axón debido a que conducen a la formación de múltiples axones (Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005; Salcedo-Tello et al., 2011) e incluso pueden convertir procesos dendríticos en axones, demostrando que las dendritas conservan el potencial de convertirse en axones, proceso que normalmente se previene por la actividad dendrítica de GSK-3 (Barnes y Polleux, 2009). Se sabe que la localización subcelular de la forma inactiva de GSK3 β (fosforilada en la Ser9) varía dependiendo del estado de polarización neuronal, emplazándose en las neuritas no polarizadas y cambiando su ubicación al iniciar el proceso de diferenciación, para concentrarse en la punta de la neurita que formará el axón; siendo importante su inactivación local para permitir el crecimiento del axón simultánea a su activación en dendritas (Eickholt et al., 2002; Shi et al., 2004; Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). Estos mecanismos subyacen el establecimiento de la polaridad neuronal, que depende también de la estabilidad y dinamismo de los MTs, cuya estabilidad se regula por el estado de fosforilación de las MAPs (Zhou y Snider, 2005; Hur y Zhou, 2010).

La relación entre GSK3 β y el complejo proteico estabilizador de MTs APC-mPar3, presentes en el cono naciente del axón activo, es importante para el establecimiento de la polaridad neuronal. Shi y colaboradores demostraron que la regulación espacial de la

actividad de GSK3 β en neuronas hipocámpales durante el desarrollo permite la generación del axón (Shi et al., 2004).

La inhibición de GSK3 β afecta de manera directa la conducta de los MTs al cambiar el estado de fosforilación de objetivos específicos del citoesqueleto. GSK3 β fosforila varias MAPs entre las que destacan tau, MAP2, MAP1B, CRMP (del inglés “collapse response mediator protein”) y APC. En axones, la activación de la vía Wnt conduce a una disminución significativa en el estado de fosforilación de MAP1B en el sitio que es fosforilado por GSK3 β (Ciani et al., 2004; Lucas et al., 1998). De manera interesante, MAP1B fosforilada por GSK3 β mantiene los MTs en un estado dinámico (Goold et al., 1999), mientras que una menor fosforilación provocada por la inhibición de GSK3 β , resulta en un incremento en la estabilidad de los MTs (Lucas et al., 1998). Estos estudios proveen la primera muestra de que la vía Wnt canónica puede regular la estabilidad de los MTs dirigiéndose directamente a las proteínas del citoesqueleto.

De manera similar, el incremento de la actividad de varios componentes de la vía Wnt que están asociados al citoesqueleto pueden modificar a los MTs: Dvl, puede incrementar la estabilidad y la formación de bucles de MTs (Krylova et al., 2000; Torres y Nelson, 2000; Capelluto et al., 2002); CK1 fosforila a α y β -tubulina y otras proteínas asociadas a MTs (Behrend et al., 2000; Wolff et al., 2005); axina incrementa la estabilidad de los MTs (Ciani et al., 2004), y APC favorece la estabilidad y el crecimiento de la red de MTs (McCartney et al., 1999; Mogensen et al., 2002; Kita, et al., 2006). Por su parte el bloqueo de la expresión de β -catenina unida tanto a filamentos de actina como a MTs, mediante ARN de interferencia (RNAi knockdown) disminuye el re-brote de MTs después del tratamiento con nocodazol (Tao et al., 1996; Huang et al., 2007).

Dos datos sugieren que la proteína APC podría mediar algunos de los efectos de Wnt en la dinámica de los MTs. Uno de ellos es que APC es un blanco directo de GSK3 β , y su fosforilación disminuye su acoplamiento y su habilidad para estabilizar a los MTs (Zumbrunn et al., 2001). De manera interesante, se han descrito dos grupos de APC, uno asociado con los MTs y otro con el complejo de β -catenina (Salinas, 2007). El segundo dato es que Wnt aumenta la estabilidad de los MTs inhibiendo a GSK3 β . De esta manera, APC podría funcionar no como un regulador negativo de Wnt sino actuar río abajo de GSK3 β junto con MAP1B para regular la dinámica y organización de los MTs (Salinas, 2007). En conjunto todos estos resultados sugieren que el estudio del papel de la vía de señalización Wnt en la regulación de los componentes del citoesqueleto, permitirá conocer más sobre los

mecanismos moleculares que regulan la determinación de la polaridad y plasticidad neuronal.

Reorganización del citoesqueleto de actina.

La morfogénesis neuronal está determinada por cambios en el citoesqueleto y de sus interacciones con la membrana plasmática. El citoesqueleto de actina tiene un papel particularmente importante en la morfología neuronal. En los conos en crecimiento de neuronas en desarrollo, por ejemplo, los filopodios en rápida expansión y contracción, están en su mayoría compuestos por haces de fibras de F-actina, mientras que los lamelipodios se componen de una red de filamentos de actina entrecruzados (Yamada et al., 1971; Letourneau, 1983; Lewis y Bridgman, 1992; en Luo, 2002).

Brevemente, los MFs de actina pueden adoptar dos formas: redes y haces; a su vez, los haces pueden ser de dos tipos: contráctiles y no contráctiles. En muchas células animales hay una red de MFs de actina bajo la membrana plasmática. Los lamelipodios que son proyecciones laminares contienen este tipo de redes entrecruzadas o mallas de F-actina bajo la membrana plasmática; su formación está mediada por la GTPasa Rac (Chhabra y Higgs, 2007). Los filopodios, proyecciones cilíndricas muy delgadas a modo de espinas, son característicos de los conos de crecimiento axónico, y contienen haces no contráctiles de filamentos de actina (Gupton y Gertler, 2007).

Por su parte, los haces son grupos de filamentos dispuestos paralelamente y de mayor longitud que los de las redes. Y según sus proteínas asociadas, los haces pueden diferenciarse en contráctiles y no contráctiles. La miosina II es necesaria para la formación de haces contráctiles, como los de las fibras de tensión o fibras de estrés que son agrupaciones axiales de F-actina que subyacen los cuerpos celulares. La GTPasa Rho facilita su formación y favorece la contracción, bien directamente, cuando fosforila la cadena ligera de la miosina, o indirectamente cuando, por fosforilación inhibe la quinasa que activa esa cadena (Naumanen et al., 2008).

Los haces no contráctiles son un tipo de MFs paralelos de F-actina que se encuentra en las microvellosidades y en las finas prolongaciones digitiformes que se forman en la periferia de las células y los conos axónicos en crecimiento denominadas filopodios (Faix et al., 2009). Su formación está favorecida por la proteína Cdc42 (del inglés "cell division cycle 42"). En los haces no contráctiles todos los filamentos se disponen con la misma polaridad y

no se asocian a la miosina II, sino a la miosina I y a otras proteínas como la villina (Faix et al., 2009).

Papel de las Rho GTPasas en la morfogénesis (neuronal)

Los miembros de la familia de GTPasas Rho, actúan como interruptores moleculares intracelulares que transducen señales de estímulos extracelulares al citoesqueleto de actina y al núcleo. Evidencia reciente sugiere que las Rho GTPasas están implicadas en la regulación de la morfogénesis neuronal incluyendo la migración, la polaridad, el crecimiento y la orientación axonal, el desarrollo de dendritas y la plasticidad, así como en la formación de sinapsis (Luo, 2000). Las vías que señalizan desde los receptores de membrana hasta las Rho GTPasas y de las Rho GTPasas al citoesqueleto de actina están empezando a descubrirse. Las mutaciones en estas vías de señalización han sido reportadas en enfermedades neurológicas en humanos, lo que resalta su importancia en el desarrollo y la función del sistema nervioso (Luo, 2000; Luo, 2002).

Las GTPasas de la subfamilia Rho son reguladores críticos del citoesqueleto de actina en células eucariotas. Las mejor estudiadas son RhoA, Rac1 y Cdc42. Ellas pueden existir en dos estados: un estado inactivo acoplado a GDP y un estado activo acoplado a GTP. Cuando se acoplan a GTP, las Rho GTPasas activas pueden unirse a varios efectores y provocar diferentes actividades biológicas (Luo, 2000; Luo, 2002).

Las GTPasas Rho tienen un papel importante en el desarrollo neuronal a través de la regulación de la citocinesis (Lee et al., 2000; Di Cunto et al., 2000). Pero, también participan en eventos post-mitóticos. Las primeras investigaciones sobre el papel de estas GTPasas en neuronas, mostraron su papel en la regulación del crecimiento y la retracción de axones o neuritas (Luo et al., 1994; Jalink et al., 1994). Se piensa que Rho media la retracción de neuritas, ya que su activación en líneas celulares neuronales provoca dicha retracción, mientras que la expresión del dominante negativo de Rho la previene (Jalink et al., 1994). Por su parte, Rac y Cdc42 parecen ser reguladores positivos (Luo et al., 1994, Kozma et al., 1997; Lamoreux et al., 1997; van Leeuwen et al., 1997; Alvertinazzi et al., 1998; Kuhn et al., 1998; Kalman et al., 1999; Ruchoeft et al.; 1999; Brown et al., 2000), mientras que Rho parece ser un regulador negativo (Jalink et al., 1994; Kozma et al., 1997; van Leeuwen et al., 1997; Kalman et al., 1999, Jin et al., 1997; Yamashita et al., 1999) de procesos en crecimiento, aunque hay excepciones (Jin y Strittmatter, 1997; Vastrik et al., 1999).

Rho parece ser importante en la regulación de la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, mientras que Rac y Cdc42 regulan la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente (Ridley y Hall, 1992; Ridley et al., 1992; Nobes y Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Estas GTPasas también se han visto involucradas en la guía de axones en crecimiento. Los conos de crecimiento, estructuras que dan lugar a procesos neuronales y dirigen su crecimiento, tienen filopodios y lamelipodios los cuales sensan las pistas ambientales. Las señales de orientación actúan a través de la sensibilización o desestabilización selectiva de los filopodios o lamelipodios de actina. Existe evidencia que indica que las Rho GTPasas participan en la mediación de estas acciones (Ciani y Salinas, 2005).

La pérdida de la función de las Rho GTPasas o efectores río abajo se ha visto que resultan en defectos en la guía de axones (Steven et al., 1998; Hing et al., 1999; Awasaki et al., 2000; Bateman et al., 2000; Liebl et al., 2000; Newsome et al., 2000), lo cual sustenta el papel de las Rho GTPasas en la guía de axones. El efecto de la perturbación de GTPasas puede estar influenciado por interacciones entre el cono de crecimiento y el substrato (Kuhn et al., 1998), y por el grado de perturbación de las GTPasas (Luo et al., 1994; Kaufmann et al., 1998).

Por otra parte, a través de la expresión de dominantes negativos y de mutantes constitutivamente activos se han examinado las funciones de Rho, Rac y Cdc42 en dendritas en desarrollo en células de Purkinje de ratones transgénicos (Luo et al., 1996). Estos estudios muestran que Rac y Cdc42 promueven el crecimiento y la dinámica de dendritas, mientras que Rho inhibe el crecimiento de estas. Asimismo, varios estudios de imagenología han mostrado que las Rho GTPasas pueden regular la tasa de extensión y retracción dendrítica, con Rho inhibiendo y Rac promoviendo la remodelación de dendritas (Li et al., 2000; Wong et al., 2000). Aunado a lo anterior, se ha visto que la regulación de la actividad de Rac puede ser crucial para el desarrollo morfológico y la plasticidad de las espinas dendríticas, proyecciones especiales que son los sitios primarios de las sinapsis excitadoras y pueden ser la unidad básica de la integración sináptica (Harris, 1999).

Las Rho GTPasas también se han involucrado en la regulación de la migración celular en varios tipos celulares y en el establecimiento de la polaridad neuronal (Craig y Banker, 1994; Bradke y Dotti, 2000). En cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo se ha visto que poco antes de la formación del axón, el citoesqueleto de actina en el cono de crecimiento de los futuros axones comienza a ser selectivamente dinámico e inestable en

comparación con los conos de crecimiento de las futuras dendritas. El tratamiento de neuronas hipocampales en cultivo con la *toxina pertusis* tipo B, un inhibidor de la GTPasa Rho, puede imitar la desestabilización de actina en los conos de crecimiento para generar varios procesos similares al axón (Bradke y Dotti, 1999). Respecto a Rac, algunas pruebas indican que podría estar involucrada en el establecimiento de la polaridad, debido a que la perturbación de Rac afecta preferencialmente el crecimiento de axones pero no de dendritas *in vivo* (Luo et al., 1994; Luo et al., 1996).

De los de efectores de Rho, el mejor estudiado ha sido la cinasa-Rho/ROCK, la cual es una cinasa de serina/treonina (Leung et al., 1996; Amano et al., 1997; Ishizaki et al., 1997). ROCK interviene en el efecto que tiene RhoA en la retracción de neuritas en células de neuroblastoma humano en cultivo (Hirose et al., 1998), en la prevención de la iniciación axonal en cultivos de células granulares de cerebelo (Bito et al., 2000) y en la retracción de dendritas en neuronas piramidales de hipocampo en cultivos de rebanadas de cerebro (Nakayama et al., 2000).

En neuronas de hipocampo se ha visto que el borde creciente del cono axonal en crecimiento experimenta de manera constante, y aparentemente de forma estocástica, la extrusión de filopodios y lamelipodios (Forscher y Smith, 1988). Por lo general, estas proyecciones se retraen rápidamente, pero a veces se conservan, sin embargo, simultáneamente el cono de crecimiento se mueve a lo largo de la estructura extendida y el ciclo comienza de nuevo desde esa nueva posición. Este mismo fenómeno se ha observado en los axones en crecimiento en una amplia variedad de condiciones y en cultivos de células en migración (Giniger, 2002).

Durante el estado de equilibrio, es decir, sin actividades que requieran modificaciones de la morfología celular, la red cortical de actina se retrae constantemente hacia la región central del cono de crecimiento. Esta retracción de la red de actina parece depender de la actividad de miosina, ya que la inhibición de la miosina endógena farmacológicamente ó por microinyección (de *N-ethylmaleimida*), bloquea el movimiento retrógrado de la red cortical de actina (Lin et al., 1996).

Cada una de las GTPasas de la familia Rho ha sido involucrada en una variedad de vías de señalización relacionadas con la morfología celular, la regulación de genes nucleares, la división y la supervivencia celular, entre otros procesos. Sin embargo, un tema persistente en el estudio de estas proteínas ha sido su papel directo en el control de la organización y la dinámica de la actina. Aunado a ello, es importante considerar y estudiar

otras de las funciones de las GTPasas, como la regulación de cascadas de señalización (p.e. Wnt) que seguramente tiene una influencia sustancial sobre la morfología celular y el desarrollo de axones.

Como se ha mencionado, la regulación de la reorganización del citoesqueleto se da en respuesta a señales extracelulares (como en la migración neuronal, la guía de axones o la elaboración de dendritas) o posibles señales intrínsecas (como en el establecimiento de la polaridad neuronal). Por ello, estudiar y conocer las vías de señalización que regulan la actividad de las Rho GTPasas y la vía por la cual regulan el citoesqueleto de actina podría ofrecer información sobre los mecanismos que comparten, los distintos procesos y las condiciones particulares que los distinguen.

Resumiendo los antecedentes en sus puntos más importantes para la presente tesis, se sabe que: 1) La vía de señalización Wnt y sus diferentes componentes tienen una función importante en la regulación indirecta y directa del citoesqueleto, esta última a través de mecanismos independientes de transcripción. 2) Los cambios morfológicos se dan por medio variaciones en la organización, distribución y dinámica de los filamentos de actina y los MTs. 3) Las Rho GTPasas son reguladores importantes del citoesqueleto de actina y están involucrados en muchos procesos del desarrollo neuronal que requieren cambios morfológicos.

Basándonos en la evidencia acumulada de que estas vías de señalización Wnt son cruciales en la modulación de la morfogénesis neuronal, el presente proyecto se enfocó en estudiar el efecto de la activación de esta vía: i) en la regulación del arreglo del citoesqueleto de células de neuroblastoma humano indiferenciadas, ii) en los cambios morfológicos de células de neuroblastoma humano durante su diferenciación, y iii) sobre la morfogénesis de células de neuroblastoma humano diferenciadas. Para la realización de los experimentos, se emplearon cultivos de células de neuroblastoma humano (MSN) diferenciadas e indiferenciadas tratadas con un agonista y antagonistas de la vía Wnt.

CULTIVOS CELULARES

Un modelo empleado para el estudio *in vitro* de la diferenciación neuronal es el cultivo de la línea celular del neuroblastoma MSN. Dichos cultivos son el modelo experimental empleado en la presente tesis. Brevemente, esta línea se obtuvo, junto con otras cinco, a partir de neuroblastomas humanos. Un neuroblastoma es un tumor común en la infancia que se origina a partir de neuroblastos con origen en la cresta neural. En particular, la línea celular

SMS-MSN empleada para los experimentos de esta tesis, se obtuvo de células tumorales de la médula ósea de un paciente niño blanco de 5 años de edad, que no recibió tratamiento contra el cáncer antes de la adquisición de las células. A través de distintos experimentos, se determinó que la línea SMS-MSN está compuesta por células catecolaminérgicas. En general, este tipo de líneas celulares son útiles para el estudio de la cinética de tumores, la respuesta a agentes citotóxicos, antígenos asociados a tumores y la diferenciación de las células neuronales *in vitro* (MSN; Reynolds et al., 1986). Para fines de este proyecto, se emplearon cultivos de células de neuroblastoma humano MSN no diferenciadas y diferenciadas a neuronas.

IV. Justificación

El establecimiento de la polaridad neuronal es un evento crítico durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se han estudiado varias vías de señalización capaces de controlar este fenómeno que tienen en común la modificación de proteínas que conforman el citoesqueleto neuronal.

Dentro de estas vías se ha propuesto un papel central de la ruta Wnt que se activa a través de diferentes ligandos y cuya función se ha involucrado en los fenómenos de establecimiento de dendritas y axones de neuronas durante su maduración y fenómenos de plasticidad en neuronas adultas. Sin embargo, no se ha estudiado con detalle el efecto de la activación de ligandos Wnt en diferentes etapas de la diferenciación neuronal en neuronas de origen humano.

Por ese motivo analizaremos los efectos de un agonista general Wnt sobre los cambios en diferentes proteínas del citoesqueleto y su repercusión en la morfología de células de neuroblastoma humano. En particular nos enfocaremos en los efectos sobre microtúbulos y microfilamentos y analizaremos la ruta que preferentemente induce el rearrreglo del citoesqueleto utilizando antagonistas de la ruta canónica y no-canónica.

Para analizar los cambios morfológicos en presencia de un ligando Wnt que activa ambas vías, se analizarán las células de neuroblastoma en su estado no diferenciados y en diferentes tiempos durante el proceso de diferenciación con ácido retinóico y NGF. A través de esta estrategia pretendemos ampliar el conocimiento acerca de si la activación general de la vía Wnt induce polaridad en células no diferenciadas y, por otra parte, si esta activación

produce cambios en la elongación de las neuritas de neuroblastoma diferenciado; cambios que podrían estar asociados a eventos de plasticidad en neuronas maduras.

V. Hipótesis

Se propone que la activación farmacológica de la vía Wnt canónica y no canónica con el agonista Wnt (2-Amino-4-(3,4-(methylenedioxy) benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine) inducirá cambios diferenciales en la organización del citoesqueleto en cultivos de células de neuroblastoma humano-MSN indiferenciadas o diferenciadas.

VI. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar por estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal los cambios en el rearrreglo de MTs y MFs y sus consecuencias en la morfología de células de neuroblastoma humano-MSN, posteriores a la activación de la vía Wnt, previamente y durante el proceso de diferenciación neuronal.

- 1) en células no-diferenciadas analizar si se induce desarrollo de neuritas.
- 2) En neuronas diferenciadas, si se inducen cambios en el número y morfología de axones y dendritas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar cultivos de células de neuroblastoma humano-MSN, indiferenciadas y diferenciadas. Así como caracterizar morfológicamente el proceso de diferenciación neuronal.
- Evaluar los cambios morfológicos en las células de neuroblastoma humano-MSN diferenciadas y no diferenciadas tratadas con diferentes concentraciones del *agonista Wnt* (aWnt), a través de técnicas de inmunofluorescencia empleadas para la detección de las proteínas del citoesqueleto (α -tubulina y F-actina), y con el uso de microscopios de epifluorescencia y confocal.

- Determinar la posible participación de las vías Wnt canónica y no-canónicas en los cambios morfológicos de las células de neuroblastoma humano-MSN, con el empleo de moduladores negativos de estas rutas, como: **Dkk-1** (antagonista de la vía Wnt canónica), **sFRP2** (antagonista de las vías Wnt canónica y no canónica), y **Y-27632** (Inhibidor del efector ROCK de la GTPasa Rho).

VII. Metodología.

Todos los experimentos se realizaron utilizando células de neuroblastoma humano de la línea celular SMS-MSN, no comercial donada al laboratorio. Las células de esta línea de neuroblastoma humano MSN se mantuvieron congeladas en viales con glicerol colocados en nitrógeno para su conservación. Los cultivos que serían empleados en los experimentos se descongelaron dos semanas antes de su uso y después de su descongelamiento, las células se sembraron en cajas de cultivo de 12 pozos con cubreobjetos y se mantuvieron en una atmósfera de 5%CO₂/95% O₂, a 37 °C. Para su conservación y crecimiento se empleó el medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; GIBCO®) suplementado con aa no esenciales y 10% de suero fetal bovino, el cual se reemplazó dos veces por semana ó más frecuentemente si la tasa de crecimiento celular era alta u ocurría la acidificación del medio. Por otra parte, para los grupos de **células de neuroblastoma diferenciadas**, con el fin de inducir la diferenciación de esta línea celular humana, un día después de su siembra en cajas de cultivo ó sobre cubreobjetos, se reemplazó el medio de crecimiento por medio RPMI 1640 con ácido retinoico (10µM; RA del inglés “retinoic acid”) y factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés “nerve growth factor”; 50 ng/ml). Una vez diferenciadas, se mantuvieron bajo las condiciones descritas durante cinco días. Para los grupos experimentales de células diferenciadas, después de este periodo de diferenciación, las células se sometieron a diferentes tratamientos por 24h más.

Para determinar los efectos del agonista general Wnt (*2-Amino-4-(3,4-methylenedioxy) benzylamino)-6-(3-methoxyphenyl) pyrimidine*; 10µM, CALBIOCHEM); de los antagonistas de Wnt: sFRP2 (*Secreted frizzled-related protein 2*; 100 y 200ng/ml; RandD System Inc, Minneapolis, MN) y Dkk-1 (*Dickkopf-1*; 100 y 200ng/ml; RandD System Inc, Minneapolis, MN), así como del inhibidor de ROCK (Y-27632; 10 y 20µM; StemCell Technologies) sobre la morfología de las células MSN, ambos grupos (células diferenciadas y no diferenciadas) se sometieron de manera independiente a distintos tratamientos, por

diferentes periodos de tiempo. Todos los grupos con los que se trabajó en esta tesis se describen a continuación.

Brevemente, para las **células diferenciadas** los grupos fueron los siguientes: **1. grupo control**: las células se mantuvieron durante cinco días con medio de cultivo adicionado con NGF y AR, bajo las condiciones previamente descritas; **2. grupo con aWnt 1µM**: a partir del quinto día de diferenciación las células se trataron por 24h con el aWnt a una concentración de 1µM; **3. grupo con aWnt 5µM**: a partir del quinto día de diferenciación las células se trataron por 24h con el aWnt a una concentración de 5µM; **4. grupo con aWnt 10µM**: a partir del quinto día de diferenciación las células se trataron por 24h con el aWnt a una concentración de 10µM; **5. grupos con vehículo**: como control de los grupos tratados con el aWnt, las células diferenciadas se incubaron con el volumen del vehículo (DMSO) necesario para obtener las concentraciones a las que se uso el aWnt (1, 5 y 10µM) y se mantuvieron con este tratamiento durante 24h; **6. grupos de la curva temporal**: un día después de la siembra las células se trataron con el aWnt (1µM) de 1-5 días *in vitro* (DIV). El aWnt se añadió al medio de cultivo adicionado con NGF y AR. Como control de estos grupos se realizaron los ensayos por inmunofluorescencia de células incubadas con medio de cultivo adicionado con NGF y AR, a las 24h y 2, 3, 4 o 5 días de diferenciación.

Para las **células no diferenciadas** los grupos fueron: **1. grupo control**: las células se mantuvieron durante seis días con medio de cultivo, bajo las condiciones previamente descritas; **2. grupo con aWNT 1µM**: un día después de la siembra las células se trataron con el aWNT a una concentración de 1µM por seis días; **3. grupo con aWNT 5µM**: un día después de la siembra las células se trataron con el aWNT a una concentración de 5µM por seis días; **4. grupo con aWNT 10µM**: un día después de la siembra las células se trataron con el aWNT a una concentración de 10µM por seis días; **5. grupos con vehículo**: como control de los grupos tratados con el aWNT, las células no diferenciadas se incubaron con el volumen del vehículo (DMSO) necesario para las concentraciones a las que se uso el aWNT (1, 5 y 10µM) y se mantuvieron con este tratamiento durante seis días; **6. grupos de curva temporal**: un día después de la siembra las células se trataron con el aWnt (1µM) de 1-5 DIV. Como control de estos grupos se realizaron los ensayos por inmunofluorescencia de células incubadas con medio de cultivo condicionado, a las 24h y 2, 3, 4 o 5 días de incubación. **7. grupo con sFRP2** (100 y 200ng/ml): un día después de la siembra las células se coincubaron con el antagonista sFRP2 y el aWNT (1µM). sFRP2 se aplicó treinta minutos antes del agonista. El tratamiento se mantuvo durante 6 días; **8. grupo con Dkk-1** (100 y

200ng/ml): 24h después de la siembra las células se coincubaron con el antagonista Dkk-1 y el aWnt (1 μ M). Dkk-1 se aplicó treinta minutos antes del agonista. El tratamiento se mantuvo durante 6 días; **9. grupo con Y-27632**: un día después de la siembra se les aplicó a los cultivos de células el inhibidor de ROCK (Y-27632; 10 y 20 μ M), y treinta minutos después se agregó el aWnt (1 μ M); se mantuvieron con este tratamiento durante seis días **10. grupos aWnt**: como comparación de los grupos con cotratamiento de antagonistas (sFRP2 y Dkk-1) o el inhibidor (Y-27632) y el aWnt, las células de neuroblastoma se trataron únicamente con el aWnt (1 μ M en DMSO); el cual se aplicó un día después de la siembra y se mantuvo durante seis días.

Para todos los grupos los experimentos se realizaron cuatro veces (n=4) y por duplicado, Es decir, cada n=1 consistió en la observación de dos pozos con el mismo tratamiento en cada cultivo (o siembra) realizado, por lo tanto para obtener una n=4, se realizaron cuatro cultivos en diferentes fechas, y en cada uno se observaron dos pozos con el mismo tratamiento. Para los ensayos por inmunofluorescencia, en todos los experimentos se empleo un pozo adicional como control negativo, el cual solamente fue incubado con el anticuerpo secundario fluorescente en ausencia del anticuerpo primario, con la finalidad de corroborar que los anticuerpos no marquen de manera inespecífica.

En la siguiente tabla se muestran los grupos de trabajo que se contemplaron para esta tesis, sus tratamientos farmacológicos y el periodo de incubación para cada uno de ellos.

Tabla I. Diseño experimental

	SIEMBRA	DIFERENCIACIÓN					INMUNOFLUORESCENCIA			
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
MSN DIFERENCIADAS	100 000 células por pozo en caja de cultivo de 12 pozos Costar® con cubreobjetos Medio de cultivo RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales y SFB 10%.	RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales y 10% de SFB + AR (10µM) y NGF (50ng/ml)					Grupo control : RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales y 10% de SFB + AR (10µM) y NGF (50ng/ml)	* Fijación : PFA 4%-PB, 0.1M (20 min) 4 lavados (5 min c/u) con PB 0.1M/Tritón X-100 0.3% frío. Permeabilización : PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% durante 10 minutos a T.A. * Bloqueo : PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%-BSA 5% (24h a 4° C).	Incubación con Ab1° contra α-tubulina (1:500µl; anticuerpo monoclonal, ratón anti-α-tubulina, Sigma®) por una noche a 4° C	2 lavados (3 minutos c/u) con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%. Incubación con Ab2° acoplado a fluoróforo Alexa fluor® 555 (1:700µl; burro anti-ratón, Invitrogen®) 2h a T.A. 2 lavados (5 min c/u) PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% Incubación Faloidina (3:200µl; Alexa fluor 488® phalloidin; Invitrogen®) 20 min DAPI (diamino-2-phenylindole; 1mg/ml) 2 min o TOTO®-3 iodide (1:1000µl; Invitrogen®) 10 min 3 lavados (3 minutos c/u) PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%. Montaje
		Tx aWNT 1µM. 24h					Grupos con DMSO (volumen necesario para 1, 5 y 10µM del aWNT). 24h			
		Tx aWNT 5µM. 24h								
		Tx aWNT 10µM. 24h								
		Curva temporal: a) grupos control								
		b) grupos Tx aWNT 1µM + RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales, SFB 10%, AR (10µM) y NGF (50ng/ml)								
		24h								
		2DIV								
		3DIV								
		4DIV								
5DIV										
MSN NO DIFERENCIADAS	100 000 células por pozo en caja de cultivo de 12 pozos Costar® con cubreobjetos. Medio de cultivo RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales y SFB 10%	INCUBACIÓN								
		D0	D1	D2	D3	D4	D5			
		Control : RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales y SFB 10%								
		Tx aWNT 1µM 6DIV								
		Tx aWNT 5µM 6DIV								
		Tx aWNT 10µM 6DIV								
		Grupos con DMSO (volumen necesario para 1, 5 y 10µM del aWNT).								
		Antagonista Wnt sFRP2 (100 y 200ng/ml) 30min antes+ aWNT 1µM								
		Antagonista Wnt Dkk-1 (100 y 200ng/ml) 30min antes + aWNT 1µM								
		Inhibidor de ROCK, Y-27632 (10 y 20µM) 30min antes + aWNT 1µM								
Curva temporal: a) grupos control										
b) grupos Tx aWNT 1µM + RPMI 1640 GIBCO® con aa no esenciales, SFB 10%										
24h										
2DIV										
3DIV										
4DIV										
5DIV										

D: día; aa: aminoácidos; SFB: suero fetal bovino; AR: ácido retinóico; NGF: del inglés "Nerve growth factor"; aWNT: agonista Wnt; Tx: tratamiento; Ab1° y 2°: anticuerpo primario y secundario; PFA: paraformaldehído; PB: buffer de fosfatos; T.A.: temperatura ambiente; BSA: albúmina de suero bovino.

Después del periodo de crecimiento (sexto día después de la siembra) de los grupos control ó de recibir los tratamientos farmacológicos en el caso de los grupos experimentales en ambos tipos de células (diferenciadas y no diferenciadas) se determinaron los cambios morfológicos inducidos usando técnicas de inmunofluorescencia para el marcado de las proteínas actina y tubulina del citoesqueleto y con la tinción del núcleo celular. El protocolo que se estandarizó para esta técnica se describe de manera resumida a continuación:

Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunocitoquímica, al finalizar el tratamiento las células de cada grupo se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) disuelto en buffer de fosfatos (PB, 0.1M) por 20 minutos. Posteriormente se realizaron cuatro lavados (de 5 min c/u) con PB 0.1M/Tritón X-100 0.3% a 4°C. A continuación, las células se permeabilizaron con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, para después ser tratadas con la solución de bloqueo (PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% y albúmina de suero bovino (BSA) al 5%) durante 24h a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con el anticuerpo primario (Ab1°) contra α -tubulina (1:500 μ l; anticuerpo monoclonal, ratón anti- α -tubulina, Sigma®) por una noche a 4° C. Transcurrida la incubación con el Ab1°, se hicieron dos lavados de 3 minutos c/u con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%, e inmediatamente después las células se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo Alexa fluor® 555 (1:700 μ l; burro anti-ratón, Invitrogen®) durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo, las células se lavaron dos veces (cada lavado de 5 min) con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%, y a continuación se incubaron con Faloidina (3:200 μ l; Alexa fluor 488® phalloidin; Invitrogen®) durante 20 minutos, para identificar la proteína F-actina. Para visualizar los núcleos celulares se incubó con el marcador nuclear DAPI (diamino-2-phenylindole; 1mg/ml) por 2 minutos ó con TOTO-3 (1:1000 μ l; TOTO®-3 iodide (642/660)-1mM solution in DMSO Invitrogen®) por 10 min, transcurrido este periodo se hicieron tres lavados (3 minutos c/u) con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%. Finalmente, los cubreobjetos con células se montaron sobre portaobjetos silanizados utilizando el medio de montaje especial para inmunofluorescencia Dako (Dako fluorescent mounting médium. North America, Inc. ®). Al terminar este procedimiento los especímenes se observaron en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss HBO 50/AC Axioskop 40) para corroborar la presencia y distribución de las proteínas marcadas con anticuerpos fluorescentes. La captura de imágenes de alta resolución apiladas en el eje z se realizó en un microscopio confocal (Microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal ó FV1000

Olympus) para determinar morfológicamente si existían *cambios en la polaridad*, es decir, en la localización de la marca en las diferentes proteínas en zonas con procesos (dendritas y axones) en las células diferenciadas y del citoesqueleto en general en las células no diferenciadas como resultado de los diferentes tratamientos.

Microscopia de campo claro

Con la finalidad de mostrar el aspecto de las células de neuroblastoma humano indiferenciadas, se tomaron fotografías en campo claro de estas células un día después de su siembra en cajas Petri (n=5, es decir, cinco cajas Petri por grupo). Así mismo, para observar el proceso de diferenciación de los cultivos de células de neuroblastoma humano MSN se obtuvieron fotografías en campo claro de cultivos al primer (n=5), segundo (n=5), tercero (n=5), cuarto (n=5) y quinto día (n=5) después de su incubación con NGF y AR. La captura de imágenes se realizó con el microscopio invertido OLYMPUS IX71, con el objetivo de 20X.

Curva dosis respuesta en células diferenciadas.

Para determinar la mejor concentración de trabajo para el aWnt, realizamos una curva dosis respuesta usando diferentes concentraciones del agonista: 1 μ M (n=4), 5 μ M (n=4) y 10 μ M (n=4), a partir de una solución stock de 5mg de aWnt en 2ml de DMSO. Para asegurar que el efecto causado por el tratamiento fuera inducido sólo por el aWnt y no por su vehículo (DMSO) realizamos una curva utilizando únicamente el volumen de DMSO necesario para cada concentración del aWnt (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M).

En el caso de las células diferenciadas, el tratamiento (con el aWnt ó el vehículo) se aplicó por 24h, después del proceso de diferenciación (quinto día). Transcurridas las 24h, se hicieron ensayos por inmunofluorescencia y posteriormente se observaron las muestras en el microscopio de epifluorescencia para después capturar las imágenes en el microscopio confocal.

Análisis de resultados:

Los resultados que se presentan a continuación describen la morfología de las células diferenciadas y no diferenciadas de cultivos de neuroblastoma humano en condiciones control, y después de los diferentes tratamientos.

Para los grupos de células no diferenciadas (control, tratados con el aWnt (1, 5 y 10 μ M) y con DMSO), cuantificamos: a) el porcentaje de células con centros organizadores de MTs (COMTs), b) el número de COMTs por célula y c) el porcentaje de células con ondulaciones membranales o rufles; que son algunos de los cambios más evidentes inducidos por el tratamiento con el aWnt. La cuantificación se realizó en un total de ciento ochenta células en cada grupo (no diferenciadas control, tratadas con el aWnt o DMSO). La observación de las células se realizó en un microscopio de epifluorescencia utilizando un muestreo aleatorio. Cada grupo consistió en la observación de tres laminillas (n=3), cada una con dos cubreobjetos (en cada cubreobjeto se observaron treinta células). Una vez cuantificados los parámetros para cada grupo mencionado, se determinó si existían diferencias significativas con el programa GraphPad Prism 5. Los datos fueron ingresados y se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA), seguida por el post hoc de Bonferroni o Dunnet, dependiendo de los grupos y parámetros a comparar. El valor máximo tomado como significativo para P fue de 0.05.

VIII. Resultados

Los primeros experimentos de esta tesis consistieron en la preparación de cultivos de células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas y diferenciadas para la identificación de sus características morfológicas representativas: morfológicamente en campo claro y la distribución de las proteínas de actina y tubulina en su citoesqueleto.

Caracterización morfológica de las células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas y diferenciadas in vitro.

Después de 24h de haberse sembrado las células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas, éstas muestran una morfología característica en forma de lágrima o huso. Crecen en monocapas formando agrupaciones, las cuales son más grandes y numerosas conforme aumenta el tiempo de permanencia *in vitro*. Una mínima cantidad de células no diferenciadas de la población total, extienden de forma normal procesos largos y delgados celulares parecidos a neuritas (n=4; Figura 5 fotografía del extremo superior izquierdo).

En el caso de las células diferenciadas, el patrón inicial de crecimiento es similar al de las células no diferenciadas, también forman agrupaciones. No obstante, conforme transcurre el proceso de diferenciación inducido con NGF/AR sus características morfológicas son visiblemente distintas. El primer día después de iniciado el tratamiento con

NGF/AR los cambios en su forma son mínimos porque a pesar de que las células empiezan a formar procesos, morfológicamente no son muy distintas a las células no diferenciadas (Figura 5. 1º día). Sin embargo, a partir del segundo día de diferenciación estos cambios morfológicos son más notorios, ya que sus extensiones comienzan a alargarse progresivamente (Figura 5. 2º día). En el tercer día, los procesos en desarrollo se elongan, siendo más claro en las células alejadas de las agrupaciones, con las cuales establecen contacto físico a través de estos procesos en formación (Figura 5. 3º día). Al cuarto día el proceso de diferenciación es más notorio y los cambios morfológicos son visibles (Figura 5. 4º día). Finalmente, en el quinto día las células ya diferenciadas muestran un fenotipo parecido al de las células neuronales maduras, exhibiendo neuritas largas y delgadas, con ramificaciones (5º días en Figura 5). Al final del proceso de diferenciación las células de neuroblastoma se distinguen claramente de las células indiferenciadas que conservan la forma de huso.

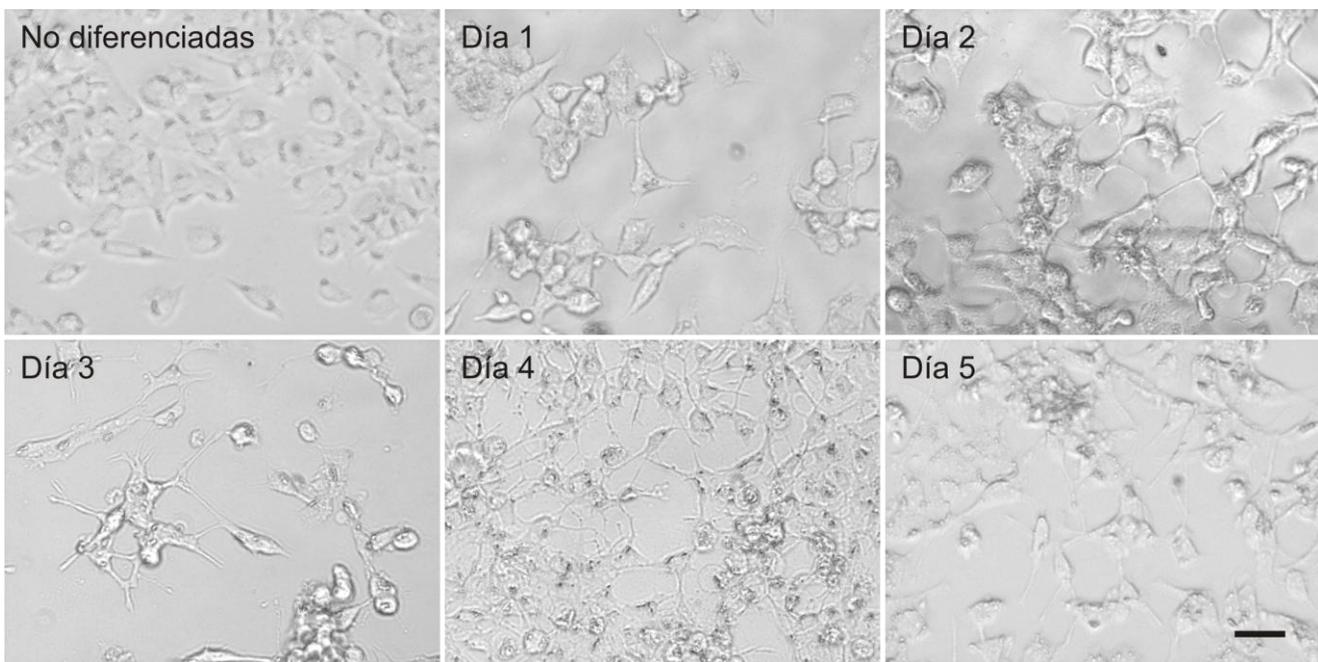


Figura 5 Proceso de diferenciación neuronal en células de neuroblastoma humano-MSN tratadas con NGF y AR. El tratamiento con NGF/AR induce el desarrollo de procesos citoplasmáticos en las células. A diferencia, las células no tratadas con AR ni NGF (células no diferenciadas), las cuales, en su mayoría presentan una morfología típica en forma de huso, con algunas variantes. Fotografías capturadas con un objetivo de 20X. La barra de escala equivale a 50µm.

Distribución de las proteínas del citoesqueleto en células diferenciadas y no diferenciadas de neuroblastoma-MSN

El marcaje de proteína F-actina (verde) con anticuerpos acoplados a fluorocromos (Alexa fluor 488® phalloidin; Invitrogen®) permitió determinar que esta proteína está presente en

ambos grupos de células y se distribuye concentrándose principalmente en la periferia delimitando los bordes celulares y además, delineando los procesos celulares en el caso de las células diferenciadas (Figura 6. Micrografías superior e inferior del lado izquierdo). Por su parte, la proteína α -tubulina (rojo) que también se observa en toda la célula, tiene una marca más intensa en el área del citoplasma que rodea el soma (Figura 6. Micrografías superior e inferior parte central). El empalme de las micrografías de F-actina y α -tubulina permite discriminar con mayor facilidad la distribución particular de cada una de ellas (Figura 6. Micrografías superior e inferior del lado derecho).

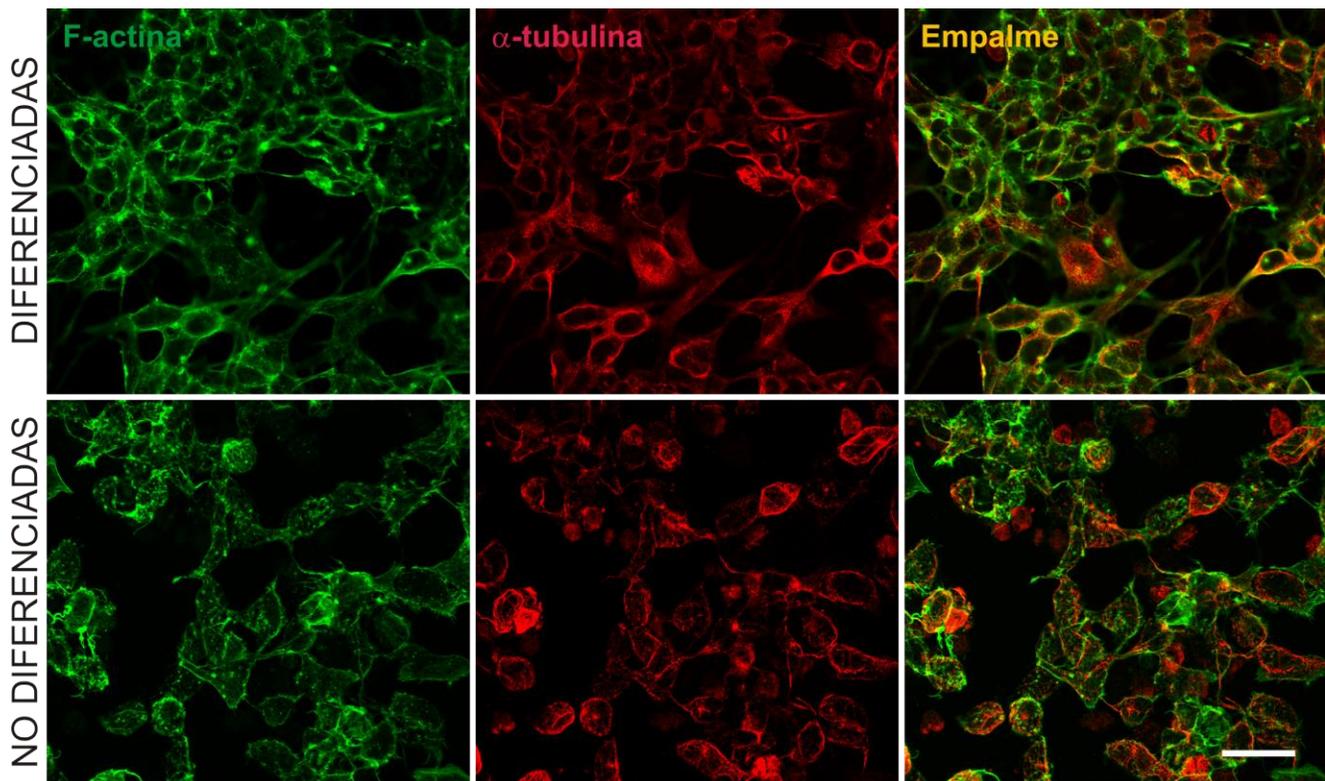


Figura 6. Proteínas del citoesqueleto de células de neuroblastoma humano-MSN. Micrografías de fluorescencia en donde se observa la distribución de las proteínas del citoesqueleto F-actina (verde) y α -tubulina (rojo) para los grupos de células diferenciadas (parte superior) y no diferenciadas (parte inferior), ambos grupos al quinto día de cultivo. La proteína F-actina se encuentra distribuida en toda la célula, concentrándose principalmente en los bordes, mientras que la α -tubulina, también distribuida en toda la célula se concentra especialmente en la periferia del soma. En el empalme (micrografías del lado derecho) se distingue con mayor claridad la distribución de cada una de estas proteínas del citoesqueleto. Imágenes de microscopía confocal. Objetivo 40x. Barra de escala equivalente a 20 μ m.

Micrografías de mayor aumento (100X) de células aisladas permiten observar con más claridad la distribución de las proteínas del citoesqueleto de células diferenciadas y no diferenciadas, así como su morfología. Las células no diferenciadas (Figura 7. Fila superior)

son pequeñas y alargadas, presentan escasos filamentos largos y delgados, además de algunas fibras de actina en su soma (verde). La proteína α -tubulina (rojo) se distribuye uniformemente en el soma celular, también se puede apreciar en fibras. En el caso de las células diferenciadas la disposición de estas proteínas es similar, sin embargo, su morfología celular es notoriamente distinta, ya que en éstas, los procesos son más largos y presentan en su mayoría extensiones citoplasmáticas parecidas morfológicamente a axones y conos de crecimiento neuronales (flechas). Además, usualmente su tamaño es mayor en comparación con las no diferenciadas (Figura 7. Fila inferior). El empalme de ambas proteínas inmunomarcadas muestran su distribución y concentración diferenciada (Figura 7. columna derecha).

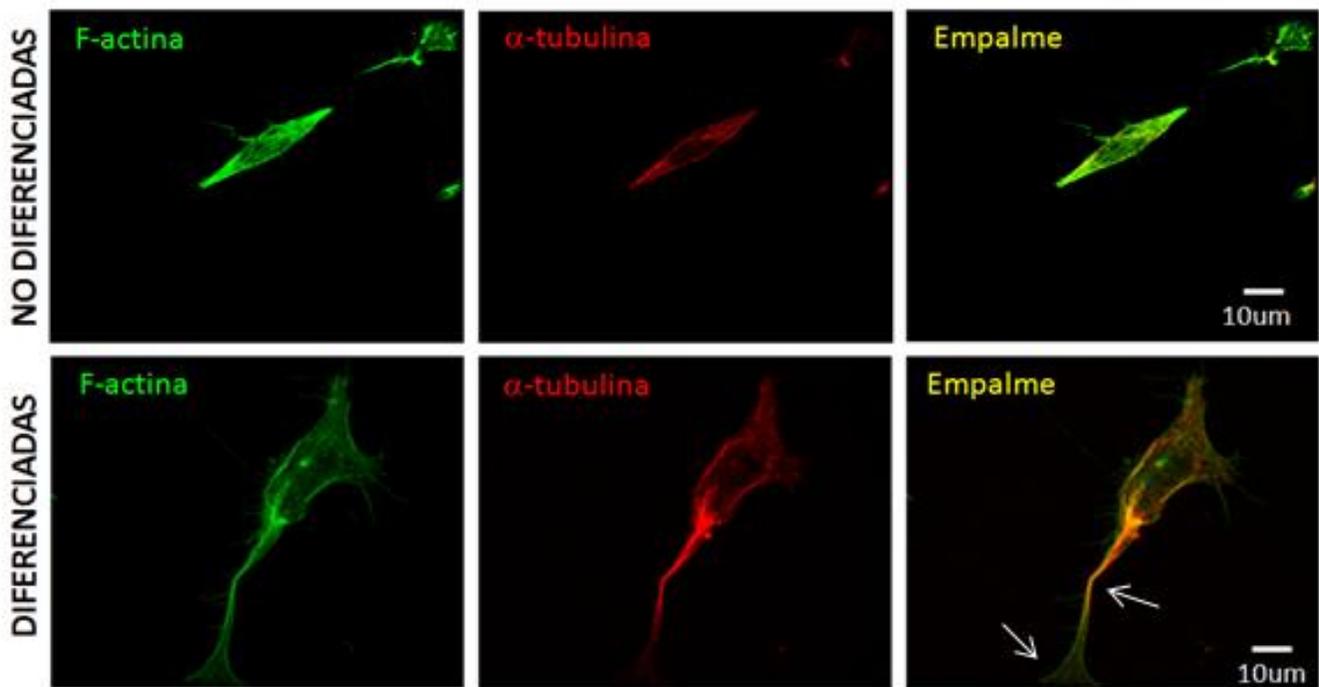


Figura 7. Proteínas del citoesqueleto de células de neuroblastoma humano-MSN. En la parte superior se muestran micrografías representativas de una célula indiferenciada marcada contra F-actina (verde) y α -tubulina (rojo), nótese su morfología en forma de huso. En la parte inferior, se muestra la distribución de estas mismas proteínas del citoesqueleto en células diferenciadas, note la morfología similar a una neurona, así como la presencia de procesos tipo neuronales. Imágenes de microscopía confocal de células en cultivo, al quinto día de crecimiento de las células no diferenciadas y al quinto día de diferenciación de las células diferenciadas. Objetivo 100x.

Efectos de la activación de la vía Wnt en la morfología de células de neuroblastoma humano-MSN.

Para determinar los efectos de la activación de la vía Wnt sobre la morfología de las células de neuroblastoma, primero se determinó la concentración óptima del aWnt mediante la realización de una curva concentración respuesta (1, 5 y 10 μM) para cada grupo de células (diferenciadas y no diferenciadas).

Curva dosis respuesta en células diferenciadas.

El tratamiento con el aWnt (1 μM) provocó la formación de un mayor número de extensiones citoplasmáticas, así como la pérdida de la morfología típica neuronal. Sin embargo, la forma adquirida por las células fue variable, predominando una forma esférica con procesos alrededor (Figura 8. Segunda columna). Una mayor concentración del aWnt (5 μM), provocó cambios morfológicos y en el número de neuritas, las cuales presentaron una longitud más corta (Figura 8. Cuarta columna). De igual manera, el doble de la concentración (10 μM) mostró tener efectos en la reorganización del citoesqueleto y con ello en la morfología celular similares a la concentración anterior aunque la retracción de las neuritas fue más evidente y las neuronas aparecieron morfológicamente “indiferenciadas” en forma de huso de manera más frecuente (Figura 8. Últimas dos columnas).

La aplicación del volumen de DMSO necesario para preparar las concentraciones empleadas del aWnt (1 μM , 5 μM y 10 μM) no modificó la morfología celular ni la distribución de las proteínas F-actina (verde) y α -tubulina (rojo) en comparación con las células diferenciadas control. Asimismo, tampoco influyó en los efectos que ejerce el aWnt sobre las proteínas del citoesqueleto F-actina y α -tubulina.

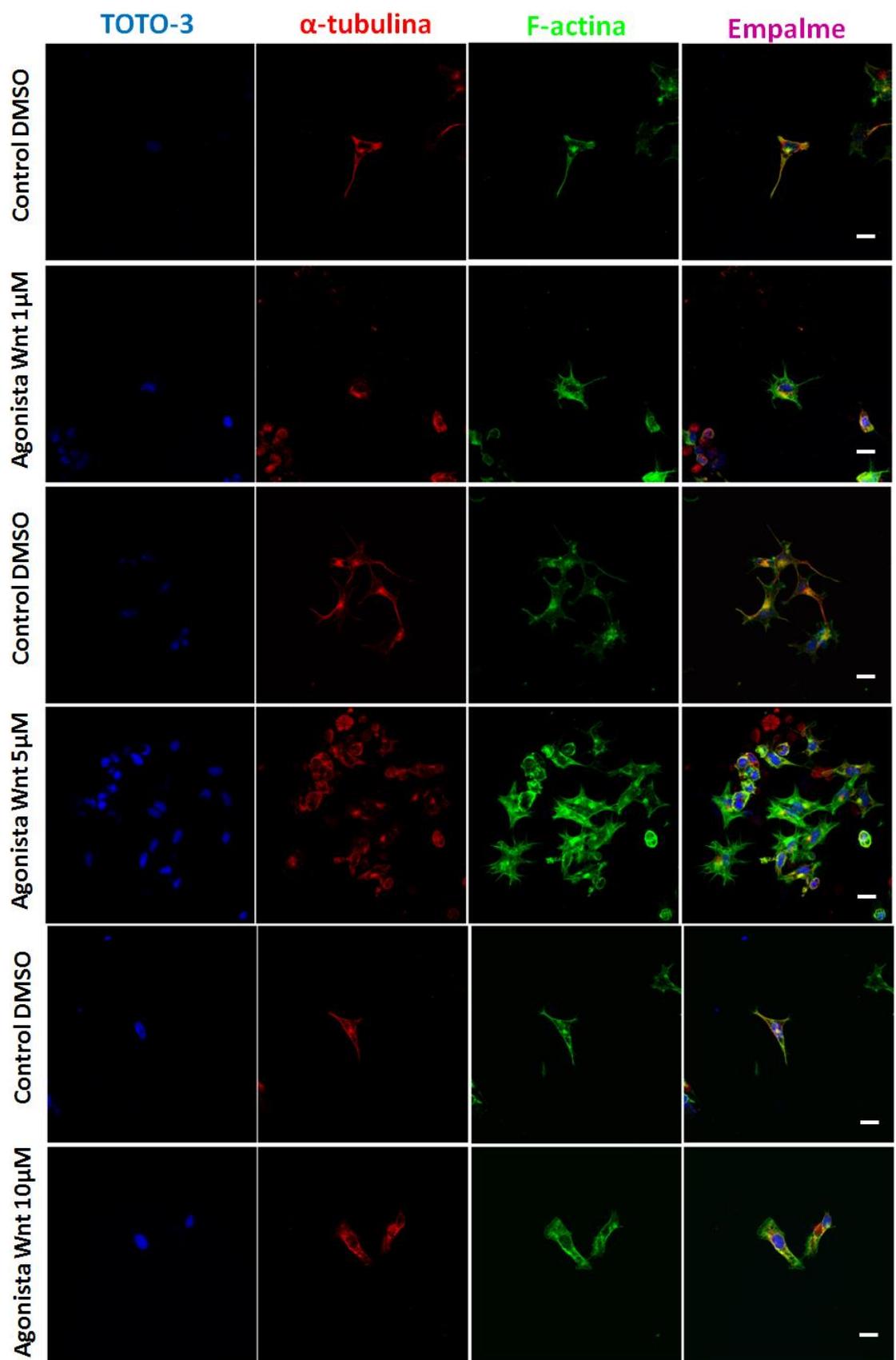


Figura 8. Efectos del agonista Wnt en células de neuroblastoma humano-MSN diferenciadas. En esta serie de micrografías los cultivos celulares diferenciados y tratados por 24h con el aWnt en todas sus concentraciones, presentan cambios morfológicos evidentes, caracterizados por: la retracción de algunas neuritas y la adquisición de formas diferentes. Así como el desarrollo de un mayor número de neuritas. Sin embargo, no presentan filamentos de tipo axónico definidos. En contraste, las células diferenciadas tratadas únicamente con el vehículo DMSO (en todos los volúmenes usados) conservan su fenotipo diferenciado, con presencia de procesos semejantes a axones y sin alteración en la distribución de F-actina (verde) y α -tubulina (rojo). Azul: núcleo celular. Imágenes de microscopía confocal. Objetivo 20X. Escala es equivalente a 20 μ m.

Curva dosis respuesta en células no diferenciadas

En las células de neuroblastoma humano no diferenciadas el tratamiento se aplicó durante seis días (equivalente a los cinco días de diferenciación de los grupos de células diferenciadas más las 24h de tratamiento, pero sin el protocolo de diferenciación). Los resultados obtenidos se muestran en la figura (Figura 9).

La aplicación del aWnt en concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M produjo modificaciones sobresalientes en la morfología de los cultivos celulares de neuroblastoma no diferenciados. La concentración menor (1 μ M) indujo (Figura 9, fila 2) un incremento considerable en el tamaño del núcleo (marcado con TOTO-3 o DAPI, en azul) y del tamaño de estas células, las cuales en su mayoría presentan una morfología esférica. Los filamentos de actina se reorganizan para dar lugar a la formación de un mayor número de filopodios y lamelipodios (indicados por las flechas) de diferentes longitudes, orientaciones y arreglos. Asimismo, los MTs de α -tubulina se reorganizan formando estructuras parecidas a los centros organizadores de microtúbulos (COMTs o MTOC; del inglés “microtubule-organizing center”), los cuales varían en cantidad y ubicación dentro de estas células. El tratamiento con las concentraciones de 5 μ M y 10 μ M del aWnt provocó modificaciones morfológicas semejantes a las observadas en las células tratadas con 1 μ M (Figura 9, filas 4 y 6). Estos resultados sugieren que la activación de la vía Wnt mediante el agonista empleado, produce cambios prominentes en la reorganización de los MF de actina y en los MTs así como crecimiento del núcleo. Por su parte la aplicación del volumen de DMSO, necesario para alcanzar las concentraciones de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M del aWnt, no provocó alteraciones ni cambios en la forma y tamaño de las células, ya que estas conservan su forma típica de huso o lágrima, preservando las características descritas para los grupos controles (Figura 9, filas 1, 3 y 5).

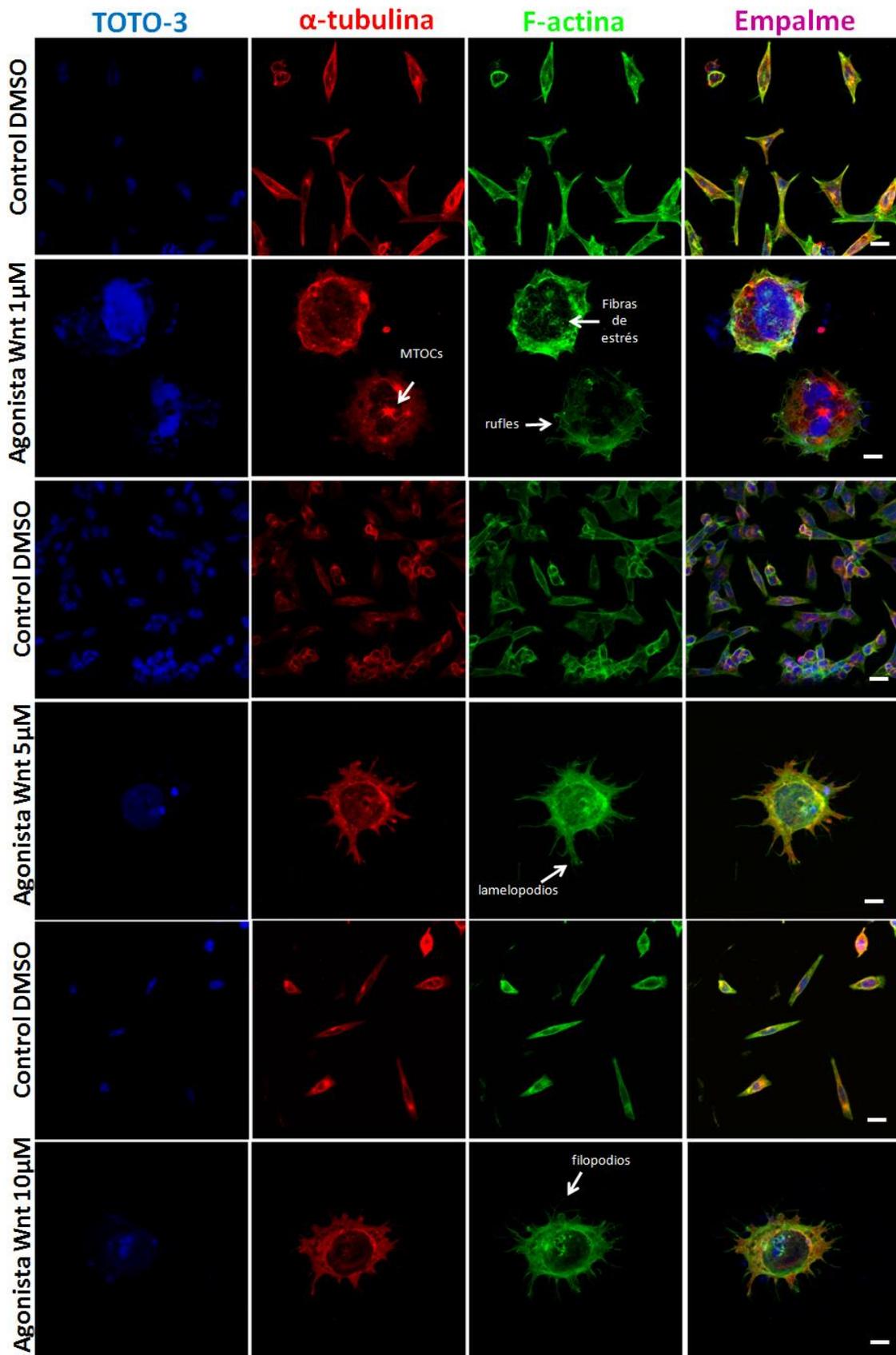
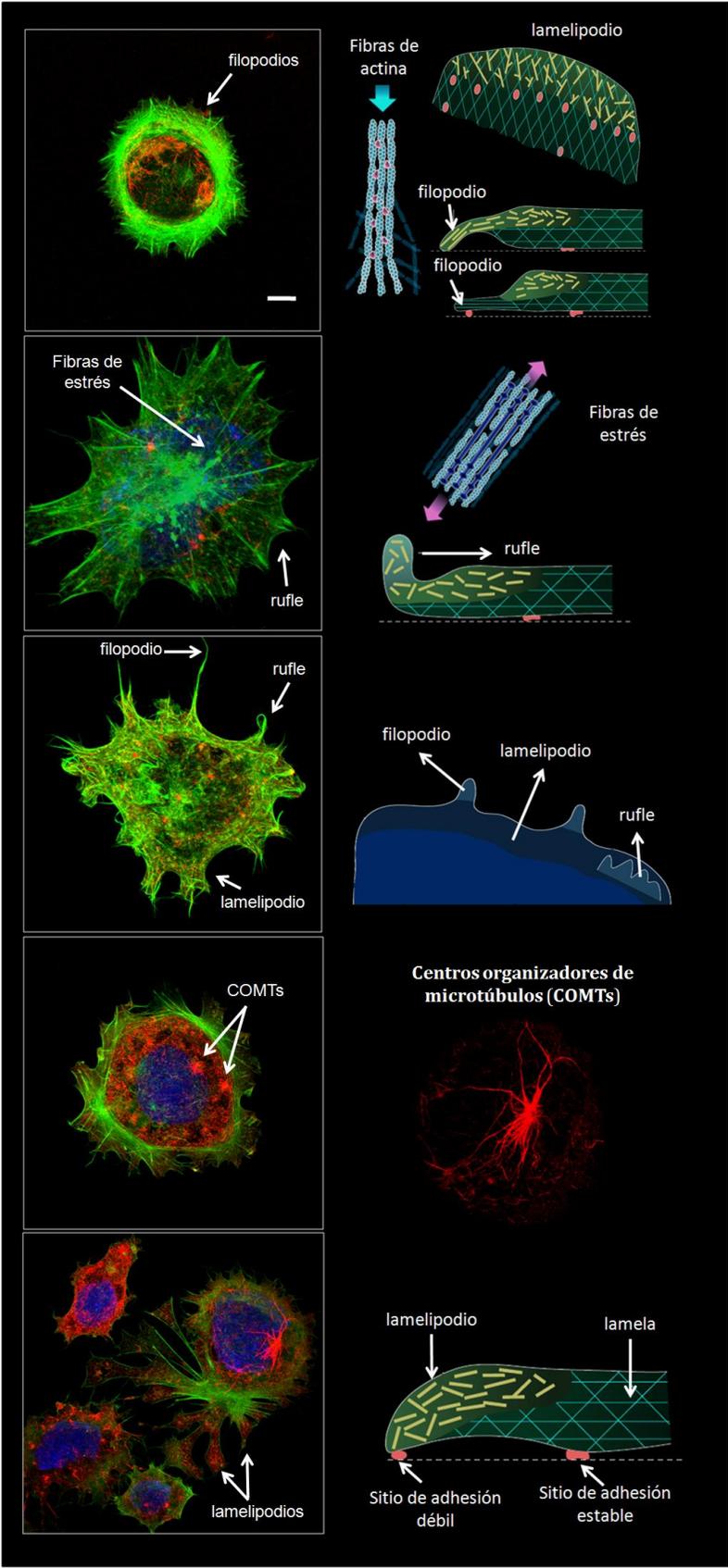


Figura 9. Efectos del agonista Wnt en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas. El tratamiento con el aWnt (1, 5 ó 10 μ M) durante seis días provocó cambios en el arreglo del citoesqueleto de F-actina (verde) y α -tubulina (rojo), modificando con ello la morfología de las células de neuroblastoma no diferenciadas (filas 2, 4 y 6). Los cambios más prominentes son: i) incremento del tamaño y núcleo celular (azul), ii) cambios en el número, dirección y acomodo de filopodios, lamelipodios y fibras de estrés, iii) desarrollo de ondulaciones membranales o rufles y centros organizadores de microtúbulos (COMTs). Las células tratadas con los diferentes volúmenes de DMSO por seis días no mostraron alteraciones en el citoesqueleto, y conservaron su tamaño y forma típicos (filas 1, 3 y 5). n=4 por duplicado. Imágenes de microscopía confocal. Objetivo 20X. Escala equivalente a 20 μ m.

Micrografías de mayor aumento permiten ver que dentro de los cambios provocados por el aWnt en cultivos de células de neuroblastoma humano no diferenciadas, los más significativos son: la formación de filopodios con diferentes longitudes y orientación (Figura 10a), fibras de estrés (Figura 10b), rufles u ondulaciones membranales (Figura 10c), COMTs (Figura 10d), y lamelopodios con dimensiones y ubicación variadas (Figura 10e).

Figura 10. Principales cambios del citoesqueleto en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas inducidos por el agonista de Wnt. Del lado izquierdo se muestran micrografías de fluorescencia representativas de los cambios más significativos del citoesqueleto y morfología neuronal. El rearrreglo del citoesqueleto de F-actina (verde) y α -tubulina (rojo) da lugar al aumento en el número, longitud y direccionalidad de filopodios y fibras de estrés. Además, promueve la formación de ondulaciones membranales y COMTs, así como el desarrollo de lamelipodios de diferentes dimensiones y orientación. Del lado derecho se muestran los diagramas de cada una de estas estructuras (tomados y modificados de Chhabra y Higgs, 2007). Aunado a las alteraciones mencionadas, el tratamiento durante seis días con el agonista Wnt también provocó el incremento del tamaño del núcleo en las células (azul). Sin embargo, la morfología celular adquirida fue variable. Imágenes de microscopía confocal. Objetivo 40X. Escala equivalente a 20 μ m.



Con el fin de cuantificar los cambios observados y analizar su frecuencia y grado de alteración, se cuantificó el número de COMTs por célula, así como el porcentaje de células con presencia de COMTs ó rufles (figura 11). El análisis demostró que en las células de neuroblastoma no diferenciadas control, los COMTs se presentan en menos del 13% de la población, indicando que de cada diez células, solamente una presenta COMTs. En contraste, el tratamiento con el aWnt provocó un incremento en el porcentaje de la población con COMTs, que fue inversamente proporcional a la concentración. El tratamiento con 1µM del aWnt incrementó el porcentaje hasta el 78%; ($P < 0.001$) y la concentración de 5 µM hasta el 60% ($P < 0.01$, $n=3$) de la población total, indicativo del incremento en la población de célula con MTOCs, es decir, de cada diez células, ocho (para 1µM) y seis (para 5µM) contienen COMTs. Sin embargo, el grupo de células al que se le aplicó la concentración mayor de aWnt (10µM), no mostró diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 11, gráfica A). La aplicación únicamente de DMSO (en todos los volúmenes usados) no produjo un incremento significativo en la población de células con COMTs en comparación con el grupo control (Figura 11a, la significancia se obtuvo mediante una prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet, tomando como control el grupo sin DMSO y sin aWnt).

La cuantificación del número de COMTs por célula en un total de 180 células, mostró que en cultivos sin tratamiento de aWnt o DMSO se presenta 1 COMTs por célula. Sin embargo, los grupos tratados con las concentraciones de 1 y 5µM del aWnt presentan un mayor número de COMTs por célula. Para el grupo tratado con 1µM del agonista, el número promedio de COMTs por célula fue superior a dos, pudiéndose encontrar en ocasiones hasta cuatro. En el caso de las células tratadas con el agonista 5µM el número promedio de COMTs fue alrededor de uno punto cinco Sin embargo, solamente el tratamiento de 1µM de aWnt fue significativamente diferente con respecto al control (Figura 11B). En la gráfica sólo se muestra el conteo de los COMTs para el mayor volumen de DMSO empleado. En contraste, el tratamiento con 10µM de aWnt no provocó un incremento en el número de COMTs por célula y de igual manera la aplicación de DMSO, tampoco provocó cambios significativos (la significancia de los datos fue obtenida mediante una ANOVA con post-hoc de Dunnet).

En conjunto, el incremento del porcentaje de células con COMTs y del número de estos en las mismas, sugieren que el tratamiento más efectivo para la promoción del desarrollo de COMTs en las células de neuroblastoma no diferenciadas fue la concentración de 1 µM del aWnt.

La estimación del porcentaje de células indiferenciadas con rufles mostró que en condiciones normales, estas células no presentan ondulaciones membranales. Sin embargo, el tratamiento con el aWnt incrementa de manera significativa la formación de ondulaciones en la membrana de las células, pero en forma inversa a la concentración del aWnt. Los porcentajes de células con rufles se aproximaron al 35, 20 y 15% para las concentraciones de 1, 5 y 10 μ M respectivamente. Por el contrario, las células control y las tratadas únicamente con DMSO no exhibieron rufles.

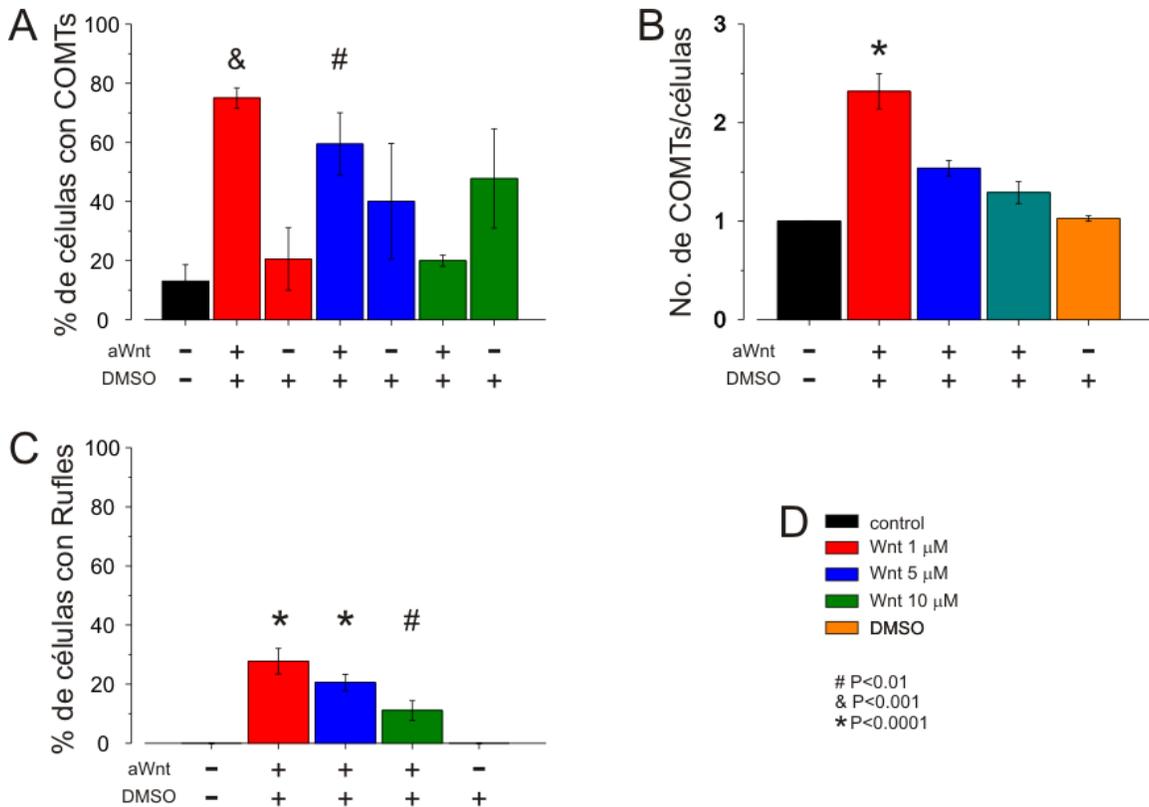


Figura 11. Cuantificación de los cambios representativos inducidos por el aWnt en células no diferenciadas; número de COMTs por célula y porcentaje de células con rufles. **A.** La gráfica representa el porcentaje de células con COMTs de acuerdo a la concentración del aWnt. Solamente las concentraciones de 1 y 5 μ M aumentaron el porcentaje de células con COMTs. **B.** Cuantificación del número de COMTs por célula. De todas las concentraciones empleadas del aWnt, únicamente el tratamiento con 1 μ M incremento significativamente el número de COMTs por célula. **C.** Gráfica de porcentajes de las células con Rufles. El tratamiento con las concentraciones de 1, 5 y 10 μ M causó el incremento en el porcentaje de las células con rufles. En todos los casos, el DMSO no provocó cambios significativos en relación con los grupos controles. **D.** simbología para todas las gráficas. Las gráficas representan la media \pm el error estándar. En todas las gráficas, + significa presencia y - ausencia. n=180 células por grupo. Las diferencias significativas fueron obtenidas mediante una prueba ANOVA con post-hoc de Dunnet tomando como control el grupo sin aWnt y DMSO.

Con la finalidad de determinar en qué momento comienzan los cambios en el citoesqueleto provocados el aWnt ($1\mu\text{M}$) en las células diferenciadas y no diferenciadas, realizamos un seguimiento temporal para evaluar los cambios durante el transcurso de los días de tratamiento. Iniciando desde las 24h después del tratamiento, hasta el quinto día.

Los resultados muestran que los cambios en la morfología de las células no diferenciadas comienzan desde las 24h de tratamiento, iniciando con el desarrollo de filopodios y lamelipodios con diferentes longitudes y extensiones, así como con cambios en la distribución de las proteínas que forman ondulaciones en la membrana celular o fibras de actina a lo largo de su soma. Con el paso del tiempo estas extensiones se elongan o ensanchan en el caso de los lamelipodios, de tal manera, que para el sexto día se observa una completa reorganización del citoesqueleto (Figura 12), principalmente de actina y tubulina, lo que da lugar a las estructuras previamente descritas (Figura 10).

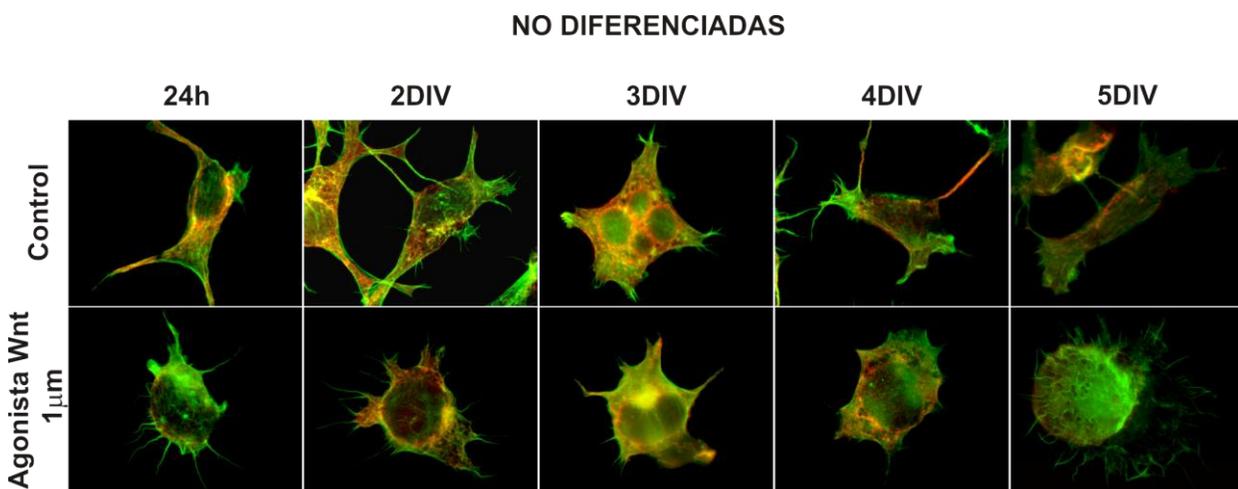


Figura 12. Curso temporal de los cambios morfológicos inducidos por el aWnt en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas. En la fila superior se muestran las micrografías de fluorescencia de los cambios morfológicos cronológicos del grupo control (no diferenciadas sin aWnt). En la fila inferior se muestran los cambios del citoesqueleto de F-actina (verde) y α -tubulina (rojo) de células no diferenciadas tratadas con el agonista Wnt $1\mu\text{M}$ ordenadas cronológicamente de izquierda a derecha; $n=3$ por duplicado. Únicamente se muestra el empalme de ambos canales.

Cambios en el citoesqueleto de las células

Debido a que en los primeros experimentos con las células diferenciadas solo se aplicó el aWnt por 24h después de la diferenciación, para el siguiente experimento, con el fin de poder determinar un curso temporal de los cambios en estas células, un día después de la siembra los cultivos se incubaron con medio de crecimiento adicionado con NGF/AR (para

inducir su diferenciación) y simultáneamente con el agonista Wnt 1 μ M. La observación de los cambios en las células tratadas a partir de las 24h y hasta el quinto día *in vitro* (DIV), permitió notar un rearrreglo en el citoesqueleto de F-actina desde las primeras 24h. De manera similar a lo que ocurre en las células no diferenciadas tratadas con aWnt (1 μ M) durante 6DIV (días *in vitro*), las células diferenciadas y tratadas con el agonista simultáneamente, presentan cambios en su morfología como el desarrollo de filopodios de diferentes longitudes, lamelipodios de diferentes grosores y fibras de estrés. En comparación con las células diferenciadas control que adquieren un fenotipo neuronal, en las células tratadas se reorganiza el citoesqueleto de F-actina, lo que da lugar al desarrollo de morfologías indiferenciadas para este grupo de células (Figura 13).

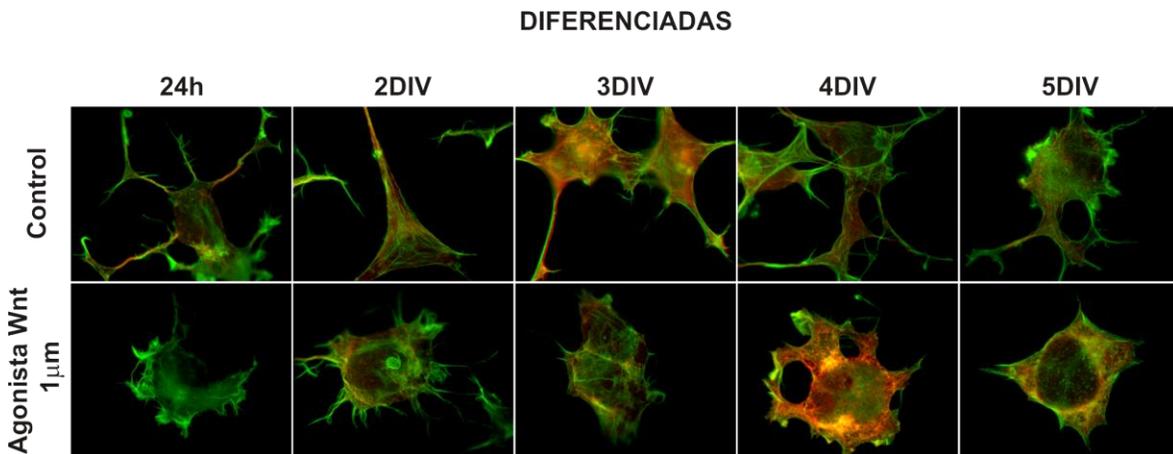


Figura 13. Curso temporal de los cambios morfológicos de células de neuroblastoma humano-MSN diferenciadas y co-tratadas con el aWnt. En la fila superior, se muestran las micrografías representativas del proceso de diferenciación. En la fila inferior se muestran los cambios cronológicos del citoesqueleto de F-actina (verde) en células de neuroblastoma humano co-tratadas con NGF/AR y el aWnt 1 μ M. Este co-tratamiento previno el proceso de diferenciación neuronal dando lugar a la adquisición de múltiples morfologías en las células de neuroblastoma humano-MSN; n=3 por duplicado.

Efectos del tratamiento con moduladores negativos de la vía Wnt en la morfología de células de neuroblastoma humano-MSN.

Para identificar cuál de las vías Wnt (canónica ó no-canónicas) estaba involucrada en la inducción de los cambios morfológicos observados en las células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas, se emplearon los siguientes moduladores negativos de estas rutas: Dkk-1 (antagonista de la vía Wnt canónica), sFRP2 (antagonista de las vías Wnt canónica y no canónica), y Y-27632 (Inhibidor del efector ROCK). Para tal fin, un día después de la siembra los cultivos recibieron el tratamiento con el aWnt co-aplicado con alguno de los moduladores negativos durante 4DIV.

Las células con aWnt 1 μ M presentaron rearrreglos en los citoesqueletos de actina y tubulina similares a los observados en los grupos control anteriores. Para sFRP2 se probaron dos concentraciones (100 y 200 ng/ml) co-aplicadas con el aWnt 1 μ M. Se observó que las morfologías de las células de ambos grupos presentaron los mismos cambios que los cultivos de células tratadas con aWnt únicamente (Figura 14).

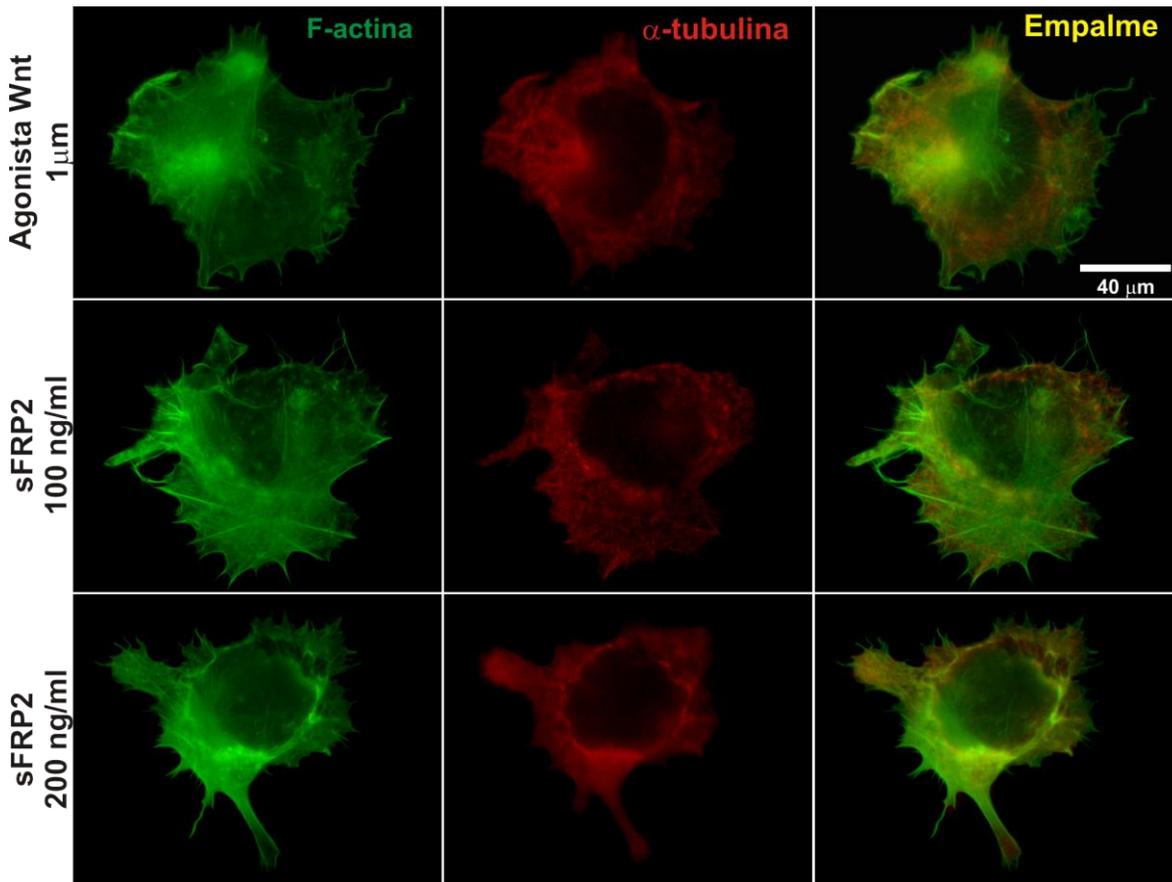


Figura 14. Efecto del sFRP2 (100 y 200ng/ml) sobre el tratamiento con el aWnt 1 μ M en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas (4DIV). Primer fila, micrografías representativas del grupo de células tratado con el aWnt 1 μ M (grupo control). En la fila intermedia se observan micrografías representativas de las células tratadas con Wnt 1 μ M y sFRP2 100ng/ml. La fila inferior se muestran las micrografías representativas del co-tratamiento de Wnt1 μ M y sFRP2 200ng/ml. Note que en general, los cambios en la organización del citoesqueleto y la morfología celular no fueron prevenidos por sFRP2, siendo semejantes al grupo tratado únicamente con el aWnt. F-actina (Verde), α -tubulina (rojo); n=3 por duplicado. Imágenes de microscopía de epifluorescencia. Objetivo 40X. Escala equivalente a 40 μ m.

Por otra parte, el co-tratamiento con Dkk-1 (100 y 200 ng/ml) tampoco previno el efecto del aWnt, indicado por la similitud de los cambios en la organización del citoesqueleto de actina y tubulina entre estos grupos tratados con Dkk-1 y el tratado con aWnt (Figura 15).

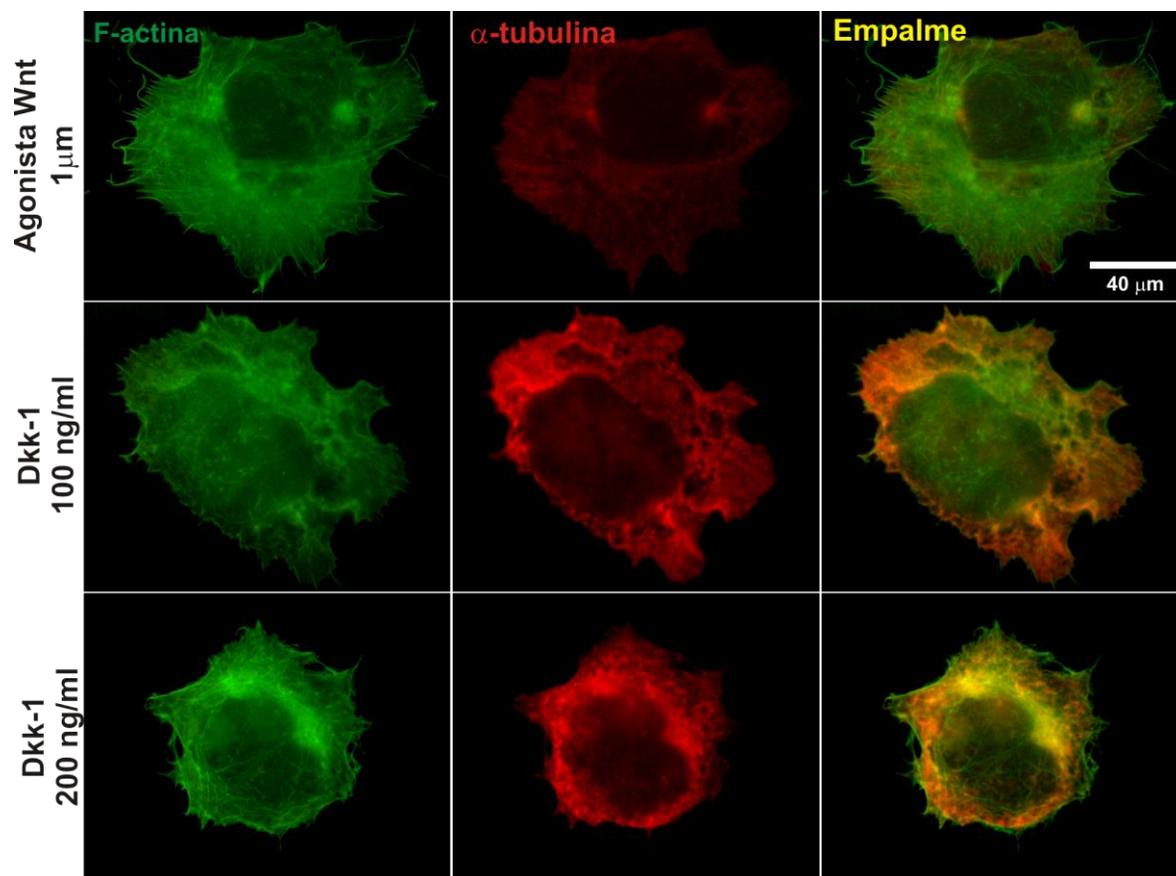


Figura 15. Efecto de Dkk-1 (100 y 200ng/ml) sobre el tratamiento con el aWnt (1 μ M) en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas (4DIV). En la fila superior, micrografías de células tratadas únicamente con el aWnt (control). Segunda fila, micrografías de cultivos co-tratados con el aWnt y Dkk-1 (100ng/ml). Tercer fila, micrografías de células co-tratadas con aWnt y Dkk-1 (200ng/ml). Los efectos provocados por el aWnt no son prevenidos por Dkk-1, ya que las características desarrolladas en los tres grupos son muy semejantes entre sí. F-actina (Verde), α -tubulina (rojo); n=3 por duplicado. Imágenes de microscopía de epifluorescencia. Objetivo 40X. Escala equivalente a 40 μ m.

En los experimentos con el Inhibidor de ROCK (Y-27632), se observó que en las células no diferenciadas una concentración de 10 μ M previno la formación de fibras de estrés y favoreció el elongamiento de los filamentos de F-actina, sin afectar el desarrollo de rufles y lamelipodios. Por su parte el tratamiento con 20 μ M, provocó resultados semejantes a los anteriores e indujo la aparición de filamentos de F-actina de gran longitud. En general, el grupo con aWnt presentó las características previamente mencionadas (rufles, filopodios, lamelipodios, fibras de estrés; Figura 17).

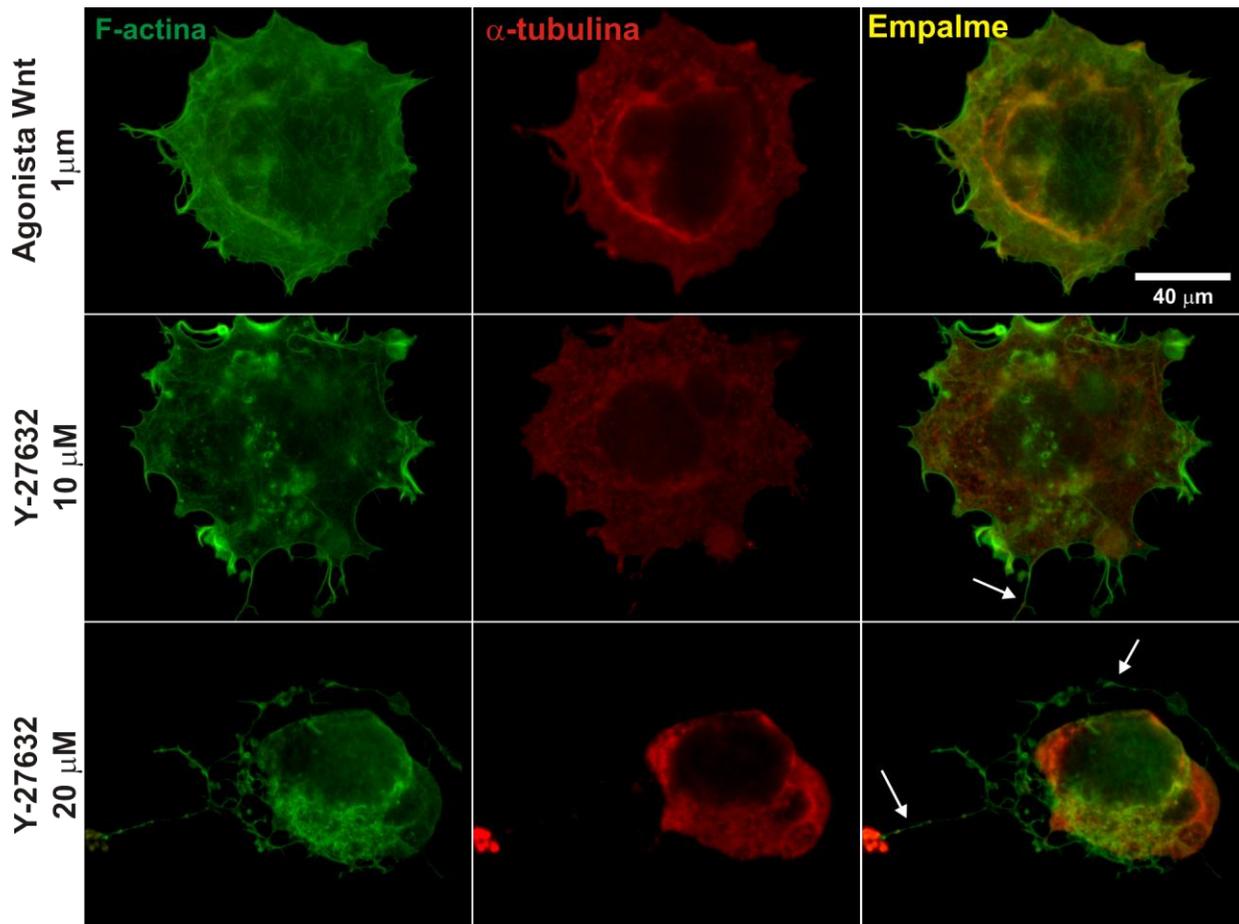


Figura 17. Efecto del Y-27632 (10 y 20 μ M) sobre el tratamiento con el aWnt 1 μ M en células de neuroblastoma humano-MSN no diferenciadas (4DIV). Primer fila, grupo control de células tratadas únicamente con el aWnt. Segunda fila, micrografías representativas de células tratadas con el inhibidor con Y-27632 (10 μ M), en general se observó la ausencia de de fibras de estrés y la elongación de filamentos de actina semejantes a filopodios (flechas). Tercer fila, micrografías de células tratadas con el doble de la concentración (20 μ M) de Y-27632, note el gran filamento de F-actina en la esquina inferior izquierda; n=3 por duplicado. Imágenes de microscopía de epifluorescencia. Objetivo 40X. Escala equivalente a 40 μ m.

Los experimentos con los moduladores negativos los realizamos únicamente en cultivos de células de neuroblastoma no diferenciadas, debido a que en estas el tratamiento con el aWnt fue más prolongado y los cambios inducidos por la activación de la vía Wnt fueron más evidentes.

IX. Discusión

Efecto del aWnt en células de neuroblastoma humano-MSN diferenciadas y no diferenciadas.

El rearrreglo del citoesqueleto de actina y tubulina en los cultivos de células de neuroblastoma humano diferenciadas y tratadas por 24 h con distintas concentraciones del

aWnt, sugiere que la activación de esta vía induce un estado de indiferenciación celular en el cual el citoesqueleto es más dinámico, lo que puede asociarse con la retracción de las neuritas formadas durante el proceso de diferenciación. Asimismo, este estado dinámico del citoesqueleto contribuye a la formación de un mayor número de neuritas, las cuales, al parecer son de menor longitud.

Por otra parte, el tratamiento con el aWnt por un periodo de 6DIV en células de neuroblastoma humano no diferenciadas provocó cambios más notorios en el arreglo de los citoesqueletos de actina y tubulina, lo cual sugiere que la exposición de los cultivos celulares a un periodo de mayor duración del tratamiento favorece de manera prolongada y continua un estado dinámico del citoesqueleto, que permite a las células experimentar un mayor número de transformaciones morfológicas con mayor facilidad, en este caso, demostrada por la formación de filopodios, lamelipodios, fibras de estrés, ondulaciones membranales, MTOCs, así como la adquisición de una amplia gama de formas celulares. En conjunto, estos resultados indican que la activación de la vía Wnt podría tener efectos directos en la modulación de la dinámica del citoesqueleto y con ello en la morfología de las células, tanto diferenciadas como no diferenciadas. Además, la magnitud del efecto del aWnt, depende del tiempo de exposición de los cultivos a dicho agonista.

El curso temporal de la coaplicación de NGF-AR con el aWnt, demostró que la presencia del aWnt desde el segundo día de cultivo con NGF y AR previene la diferenciación de las células, evitando el establecimiento de una morfología más definida y en contraparte, favorece un estado más dinámico en el cual las células adoptan morfologías más diversas.

Una serie de datos obtenidos en esta tesis que sustentan que un tratamiento más extenso provoca cambios más drásticos, son los cambios morfológicos observados en el curso temporal de la aplicación del aWnt, ya que demuestra que los cambios inician desde el 2° día de tratamiento, sin embargo es hasta el 4° día cuando alcanzan su máximo desarrollo. No obstante, debido a los resultados obtenidos en las células diferenciadas (Figura 8) es necesario realizar los experimentos que sustenten la observación previamente mencionada, en los cuales el tratamiento de las células diferenciadas tenga un periodo más prolongado, es decir, que después del proceso de diferenciación se aplique el aWnt por 5 días. De esta manera podríamos observar si una mayor exposición al aWnt, es capaz de inducir cambios más notorios en la morfología de neuronas diferenciadas.

Efecto destacado del aWnt en el citoesqueleto de tubulina

El efecto más sobresaliente del tratamiento con el aWnt sobre los MTs de las células MSN no diferenciadas fue la formación de COMTs, que como se mencionó, son centros organizadores especializados que controlan la localización, orientación, polimerización y despolimerización de los MTs en el citoplasma.

En relación con nuestros resultados, creemos que el aWnt podría estar actuando como un agente despolimerizador que permite la reorganización del citoesqueleto dándole una nueva estructura de acuerdo al arreglo de los MTs, los cuales a su vez, están ordenados a partir de estos COMTs especializados. Un argumento que sustenta este punto, son los resultados que demuestran que el tratamiento con un agente despolimerizador (p.e. colcemida) provoca la regeneración de los MTs (Shutova et al., 2008).

En relación con otros componentes de la vía Wnt, diversas investigaciones han encontrado que tanto Axina (proteína de andamiaje de la vía Wnt), como las proteínas acopladas a ella pueden tener efectos sobre la organización de los MTs, estas últimas de manera independiente a Axina (Akhmanova y Steinmetz, 2008). Además se ha encontrado que la Axina endógena colocaliza con γ -tubulina en el centrosoma y más aun que está involucrada en la nucleación eficiente de los MTs (Fumoto et al., 2009), lo cual sugiere que la sobreactivación de la vía de señalización Wnt en células de neuroblastoma a través del tratamiento con el aWnt podría inducir la actividad de diversos componentes de esta vía, cuyo efecto se ve reflejado en cambios en el citoesqueleto de tubulina, indicado principalmente por la formación de múltiples COMTs vistos por inmunofluorescencia.

Por otra parte, otros trabajos han demostrado la existencia de diversas alteraciones en los centrosomas principalmente en células cancerosas. Estas alteraciones pueden ser de dos tipos: unas son las aberraciones estructurales que aparecen debido a la expresión descontrolada de componentes del centrosoma o por modificaciones post-traduccionales inadecuadas de dichos componentes, y pueden provocar variaciones en el tamaño de los centrosomas, siendo más grandes de lo normal. Este tipo de aberraciones se han observado en tumores (afectando la forma, polaridad y motilidad de las células tumorales implicadas) y pueden inducirse en células en cultivo mediante la sobre-expresión de determinadas proteínas centrosómicas. Un segundo tipo son las aberraciones numéricas, en las cuales la presencia de un número inadecuado de centrosomas a menudo coexiste con la existencia de inestabilidad genómica y la pérdida de la diferenciación tisular. La presencia de un mayor número de centrosomas es común en la mayor parte de los tumores humanos. Asimismo, la

generación de centrosomas supernumerarios puede deberse a la carencia de la proteína supresora de tumores p53 o a la desregulación de otras proteínas implicadas en el proceso de carcinogénesis en humanos. Los mecanismos que pueden estar implicados en la generación de un mayor número de centrosomas son: la re-duplicación específica del centrosoma, fallo en la división celular por la desregulación del ciclo celular, la fusión celular o la generación de centrosomas de novo. Ambos tipos de aberraciones, estructurales y numéricas, no son excluyentes entre sí y pueden encontrarse simultáneamente. En relación con la vía Wnt, se sabe que varios ligandos Wnt, receptores y coreceptores se encuentran altamente expresados en líneas celulares de osteosarcomas (tumores malignos del hueso más comunes), mientras que los inhibidores de Wnt están regulados a la baja (McQueen et al., 2011). Aunado a ello, una deficiencia en la regulación de la vía, como mutaciones en algunos de sus componentes o la prevención de la degradación de β -catenina pueden inducir la excesiva proliferación, predisponiendo a las células a la formación de tumores (Taketo, 2004). Con base en esto y en relación con los resultados obtenidos en nuestros experimentos, el aumento en la presencia de COMTs en las células de neuroblastoma humano no diferenciadas tratadas con el aWnt, sugiere que la activación prolongada de la vía podría estar induciendo un tipo de aberración numérica, lo cual es viable dada la relación que existe entre esta vía de señalización y el cáncer (Taketo, 2004). Además de que las células con las que trabajamos derivan de un neuroblastoma, lo cual podría facilitar el desarrollo de este tipo de alteraciones.

Cambios prominentes en el citoesqueleto de actina

Los cambios más sobresalientes producto del tratamiento con el aWnt en células diferenciadas e indiferenciadas, se observaron en el citoesqueleto de actina. Este evento podría estar relacionado con el hecho de que la actina es una de las proteínas más abundantes en los bordes crecientes de la célula, que además tiene la capacidad de formar polímeros cortos concentrados en el citoplasma cortical (o ectoplasma; que se encuentra debajo del plasmalema) y constituye una densa red que participa de manera importante en la dinámica de la periferia celular durante diferentes procesos celulares como la motilidad, la formación y estabilidad de estructuras pre y postsinápticas, así como en la morfogénesis celular (incluyendo la iniciación, crecimiento, guía y ramificación del axón y las dendritas; y la formación, estabilidad y motilidad de las espinas dendríticas) y la retracción de axones y dendritas, entre otras (Luo, 2002; Pollard y Cooper, 2009).

Aunado a lo anterior, los MFs de actina constantemente experimentan ciclos de polimerización y despolimerización, producto de su elevado estado dinámico. Esta propiedad facilita la retracción o extensión de prolongaciones citoplasmáticas. Es precisamente, a partir de este elevado dinamismo que los filamentos de actina pueden formar en la célula diferentes tipos de proyecciones, como los lamelipodios y filopodios, los cuales fueron modificaciones morfológicas observadas en los resultados de esta tesis.

Principales características morfológicas inducidas por el tratamiento con el aWnt en células de neuroblastoma humano-MSN

i) Filopodios

Una de las características principales de las células que recibieron el tratamiento con el aWnt en diferentes concentraciones fue la formación de protuberancias delgadas (0.1 a 0.3 μ m) de membrana plasmática parecidas a dedos, llenas de haces de filamentos paralelos y apretados de F-actina, con diferente longitud y orientación, conocidas como filopodios (Mattila y Lappalainen, 2008). Tanto en las células diferenciadas como no diferenciadas tratadas por cinco días con el aWnt, se observó el desarrollo de un mayor número de filopodios en su periferia. En el caso de las células diferenciadas (tratadas desde el primer día de diferenciación), este fenómeno ocurrió aunado a la retracción de neuritas usualmente formadas durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, las neuritas formadas en presencia del tratamiento con el aWnt fueron aparentemente de menor longitud en comparación con las presentes en un estado diferenciado.

Una función biológica para los filopodios la sugiere el conjunto de evidencias recientes, que muestran que los filopodios pueden tener: un papel estructural, participar en la tensión mecánica, la adhesión selectiva a sustratos determinados e involucrándose en la transducción de señales (Davenport et al., 1993; Gómez et al., 2001). Asimismo, se ha descrito su participación en la migración celular, crecimiento de neuritas y como precursores de las espinas dendríticas en las neuronas (Mattila y Lappalainen, 2008). Por otra parte, la extensión y retracción de filopodios en respuesta a pistas extracelulares ha mostrado ser un paso inicial importante que determina la dirección del avance del cono de crecimiento de las células nerviosas. Estudios *in vitro* han demostrado que los conos de crecimiento sometidos a gradientes de factores solubles extienden filopodios hacia la fuente de la señal atractiva antes del movimiento del cuerpo del cono de crecimiento (Gundersen y Barrett, 1980; Zheng

et al., 1996). Por estas razones, el análisis de los mecanismos por los que filopodios se extienden y retraen puede ser un paso importante en la comprensión de cómo las señales extracelulares generan y guían el cono de crecimiento.

El inicio, elongación y retracción de filopodios dependen de la polimerización precisa y regulada, así como de la convergencia y entrecruzamiento de los filamentos de actina que los subyace. Los filopodios de una neurona típica se componen de un haz de 15-20 filamentos de actina orientados con sus extremos puntiagudos (de crecimiento rápido) hacia la punta del filopodio (Lewis y Bridgman, 1992). Estos haces de filamentos de actina se extienden en el cuerpo del cono de crecimiento. Evidencia acumulada a partir de una variedad de tipos de células ha mostrado que el citoesqueleto de actina se ensambla cerca del borde de crecimiento y se transporta hacia atrás con el tiempo por un fenómeno conocido como flujo retrógrado (Lin et al., 1996; Welch et al., 1997; Katoh et al., 1999). En un estudio con una línea de células de neuroblastoma se encontró que la extensión y retracción de los filopodios depende del equilibrio entre la tasa de ensamblaje del citoesqueleto de actina en la punta y el flujo retrógrado. Tanto la tasa de ensamblaje como de flujo pueden variar con el tiempo en un solo filopodio y entre filopodios en un solo cono de crecimiento (Mallavarapu y Mitchison, 1999).

Con base en lo anterior, los resultados obtenidos por el tratamiento con el aWnt en células MSN diferenciadas y no diferenciadas sugieren que la activación farmacológica de la vía Wnt (y sus proteínas) podrían participar directamente en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina para producir la extensión o retracción de filopodios en la periferia de estas células. Por ello, estos hallazgos son relevantes, ya que la mejor comprensión de las funciones del citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas durante la iniciación y la elongación de filopodios podría proporcionar información nueva sobre los mecanismos de formación de filopodios y sus funciones en distintos tipos celulares ó bien durante la diferenciación, crecimiento y establecimiento de la polaridad neuronal.

ii) Lamelipodios

Otra característica sobresaliente de las células tratadas con el aWnt en diferentes concentraciones fue la formación de protuberancias o láminas salientes delgadas (0,1-0,2m) de diferentes formas y dimensiones conocidas como lamelipodios. Estas estructuras se formaron únicamente en las células no diferenciadas tratadas por 6DIV con el aWnt. Los lamelipodios son protuberancias celulares compuestas por una malla ramificada de F-actina,

por lo general, con ángulos de 70° entre los filamentos, que resultan de la nucleación y ramificación de filamentos (Small et al., 2002). La frecuencia de ramificación es alta cuando en las proximidades cercanas de la membrana plasmática se encuentran filamentos cortos empujando contra ella. Al igual que en los filopodios, los extremos afilados de rápido crecimiento de los filamentos de actina están orientados hacia la membrana plasmática. Y en ambos casos (tanto en filopodios como en lamelipodios) el alargamiento de los filamentos empuja el borde celular creciente hacia adelante, y por lo tanto promueve la extensión o la migración celular (Pollard y Borisy, 2003; Chhabra y Higgs, 2007; Mattila y Lappalainen, 2008).

Existen estudios sobre la relación entre la dinámica de los MTs y la formación de lamelipodios que muestran a través de mediciones directas en la dinámica de los MTs, una correlación linear entre los parámetros de la dinámica de MTs, la tasa de locomoción celular y el tamaño de los lamelopodios (Mikhailov y Gundersen, 1998). Los resultados de uno de estos estudios demuestran una relación lineal entre la dinámica de los MTs y la formación de lamelipodios, apoyando la idea de que la dinámica de los MTs puede contribuir a la locomoción celular mediante la regulación del tamaño del lamelipodio, probablemente a través de factores difusibles (Mikhailov y Gundersen, 1998). Estos trabajos permiten plantear la posibilidad de que el aWnt podría promover un aumento en la dinámica del citoesqueleto facilitando su reorganización, así como la formación de estructuras como los COMTs de tubulina en el soma, y los filopodios y los lamelipodios de actina en la periferia de la célula.

iii) Fibras de estrés

Otro de los cambios en el citoesqueleto de actina evidentes después del tratamiento con el aWnt fue el incremento en la formación de estructuras contráctiles conocidas como fibras de estrés. Estas estructuras compuestas por paquetes de haces antiparalelos de filamentos de actina asociados a miosinas II, se generan por la polimerización de redes de actina y proporcionan la fuerza de contracción que contribuye a la morfogénesis y la migración celular. En un trabajo realizado con cultivos de células epiteliales mamarias de ratón (C57MG), se encontró que la adición de medio Wnt-3a a estas células produjo alteraciones en su morfología y la inmunotinción de proteínas del citoesqueleto permitió ver que los MFs de actina se reorganizaron llevando al alineamiento en una sola dirección de las fibras de estrés de actina y otras proteínas asociadas a ésta. Hallazgos indican que la proteína Wnt-3a puede actuar como una señal para reorganizar las estructuras del

citoesqueleto de actina (Shibamoto et al., 1998). En relación con nuestros resultados, estos datos sugieren que la activación de la vía Wnt mediada por el agonista empleado podría inducir la formación y el alineamiento de fibras de estrés de actina, a través de cambios en el arreglo y distribución del citoesqueleto de actina de las células de neuroblastoma humano tratadas.

iv) Ruffles u ondulaciones membranales

Un cambio más, resultado del tratamiento con el aWnt a células de neuroblastoma en cultivo, fue la formación de protuberancias móviles con forma de ondulaciones en la superficie celular que contienen mallas de filamentos de actina recién polimerizados. Estas protuberancias que se conocen como ruffles u ondulaciones membranales, son uno de los primeros cambios estructurales observados en las células en respuesta a factores extracelulares (entre ellos, diversas GTPasas) y son un rasgo característico de muchas células activas en migración. Cuando la membrana no es capaz de unirse a un sustrato, la protuberancia de la membrana se regresa para reciclarse en la célula (Ridley, 1994). Esta información sugiere que el aWnt podría estar funcionando como un factor extracelular que al activar la vía Wnt favorece un estado dinámico del citoesqueleto que le permite modificar constantemente su morfología a través de la formación de estructuras, entre ellas las ondulaciones en la membrana compuestas por filamentos de actina y las anteriormente descritas. Más específicamente, podrían estar involucrados otros componentes de la vía Wnt, ya que múltiples estudios han enfatizado la importancia de las diferentes GTPasas Rho, así como sus sustratos río abajo (p.e. la Rho cinasa, ROCK) en la regulación de la dinámica de actina durante el establecimiento de la polaridad neuronal (Bradke y Dotti, 1999; Kunda et al., 2001; Schwamborn y Püschel, 2004; Da Silva et al., 2003; Witte y Bradke; 2008). Además, la formación de: ruffles, fibras de estrés, filopodios y lamelipodios, se cree que es controlada por el grupo de las GTPasas Rho, específicamente RhoA, Rac1 y Cdc42; los dos primeros, componentes de la vía de señalización Wnt no canónica cuya función principal es la modulación del citoesqueleto, y el último de ellos una GTPasa relacionada también con la remodelación del citoesqueleto (Luo, 2000).

Además, existe evidencia que muestra que la reorganización de la actina es una parte integral de algunas vías de transducción de señales, y que muchas moléculas de señalización interactúan con el citoesqueleto de actina. Trabajos sobre la regulación mediada por GTPasas Rho de la señalización hacia el citoesqueleto de actina y

morfogénesis neuronal, han descrito el papel de los miembros de esta familia de GTPasas (Luo, 2002; Pertz, 2010). Se sabe que la GTPasa Rho provoca la formación de fibras de estrés contráctiles y complejos de adhesión focal (Ridley y Hall, 1992) mientras que su pariente cercano Rac induce las protrusiones de lamelipodias y complejos focales en ellas (Nobes y Hall, 1995; Ridley et al., 1992); por lo que se ha sugerido que esta familia de GTPasas podría tener un papel importante en la regulación de la motilidad celular. Además, se ha visto que Rac induce la rápida polimerización de actina en ondulaciones membranales cerca de la membrana plasmática, mientras que Rho induce el ensamblaje de las fibras de estrés principalmente a través del empaquetamiento de filamentos de actina (Machesky y Hall, 1997). De manera similar, Cdc42, otro miembro de la familia Rho, participa en el control de la polaridad de los citoesqueletos de actina y de los MTs (Cau y Hall, 2005) e induce la formación de un tercer tipo de estructura basado en actina, que se encuentra en la periferia celular, los filopodios. En algunos trabajos, se ha sugerido un modelo molecular sobre el control coordinado de la motilidad celular por Rho, Rac y Cdc42 (Nobes y Hall, 1995).

Los resultados del presente trabajo sugieren que la activación de la vía Wnt por medio del aWnt, podría estar actuando principalmente a través de la vía no canónica Wnt/PCP, ya que en ella las GTPasas de la familia Rho (Rac y Rho) desempeñan un papel crucial en la regulación del citoesqueleto de actina. De esta manera, es posible que el aWnt pudiera favorecer la formación de fibras de estrés a través de Rho, así como de lamelipodias y rufles mediante Rac. Los resultados de esta tesis que apoyan lo anterior son los obtenidos por el tratamiento con moduladores negativos de la vía Wnt, los cuales se discuten a continuación.

Consecuencias del tratamiento con los moduladores negativos sFRP2, Dkk-1 y Y-27632 sobre los efectos del aWnt en células de neuroblastoma humano-MSN.

Antes de iniciar con la discusión de esta sección es pertinente recordar un aspecto de los antagonistas de suma importancia, que es el nivel al cual actúan. Dkk-1, actúa a nivel membranal donde se acopla al correceptor LRP5/6, promoviendo su endocitosis. La internalización de LRP5/6 inhibe la activación de la vía canónica. Por su parte, sFRP2 actúa a nivel extracelular capturando al ligando Wnt endógeno, con lo cual bloquea la señalización de Wnt por ambas vías, canónica y no canónica. Por otra parte, Y-27632, actúa a nivel intracelular, inhibiendo selectivamente a la Rho-cinasa (ROCK; blanco de la GTPasa Rho).

Teniendo en cuenta la explicación anterior, los resultados de los experimentos realizados con diferentes concentraciones de moduladores negativos de las vías canónica

y/o no canónica como Dkk-1 y sFRP2 parecen no haber tenido efecto sobre los cambios inducidos por el aWnt sobre los citoesqueletos de actina y tubulina, lo cual sugiere que el efecto inhibitor del antagonista sFRP2 pudiera ocurrir solamente cuando antagoniza moléculas Wnt endógenas secretadas por las células y no sobre el agonista sintético utilizado en este proyecto. Por otro lado, la falta de inhibición de Dkk-1 que actúa antagonizando al co-receptor de la vía canónica LRP5, sugiere que el aWnt podría actuar preferentemente activando a la vía no-canónica.

No obstante, uno de los efectos del aWnt en el citoesqueleto de actina de las células MSN pudo ser bloqueado por el inhibidor de ROCK, Y-27632, ya que la coaplicación de este inhibidor en dos distintas concentraciones (10 y 20 μ M) con el aWnt (1 μ M) a cultivos de células de neuroblastoma humano no diferenciadas durante 4DIV, impidió la formación de fibras de estrés en estos cultivos celulares. Este resultado es similar al encontrado en un experimento con fibroblastos, en el que el uso de drogas que inhiben la actividad de la miosina II, entre ellas Y-27632, produjo la desaparición de los ensamblajes de actina y miosina que dan lugar a las fibras de estrés, así como a las adhesiones focales de la matriz celular, sin afectar la polarización y la motilidad de los fibroblastos tratados. De hecho, la tasa de motilidad de los fibroblastos incrementó después del tratamiento con el inhibidor. Y de manera similar a lo observado fibroblastos con el inhibidor de ROCK (Shutova et al., 2008), en nuestras células de neuroblastoma humano, una de las características del tratamiento fue la transformación de la lamela en tallos largos e inmóviles ensamblados por MTs (Shutova et al., 2008). En esos experimentos y los presentados en esta tesis, se observó que después del tratamiento, las células adquirieron un fenotipo no contráctil, es decir, carente de fibras de estrés, pero con largos filamentos en forma de tallo.

De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que la activación y los efectos de la vía Wnt a través del aWnt están relacionados con la actividad de la GTPasa Rho, uno de los componentes de la vía no canónica Wnt/PCP y su efector ROCK. Estos hallazgos apoyan las sugerencias de que los efectos observados en la reorganización del citoesqueleto derivan de la actividad del aWnt que favorece la activación de vías no canónicas y en particular de sus componentes, especialmente las GTPasas Rho.

El resto de los efectos producidos por el aWnt: filopodios, lamelipodios, rufles y COMTs, así como el considerable crecimiento de las células tratadas y su núcleo, podrían estar relacionados con la actividad de otros componentes o diferentes vías Wnt de señalización intracelular. Entre los componentes que podrían participar en el rearrreglo del

citoesqueleto están: Rac o sus efectores que forman parte de la vía Wnt/PCP, el cual se sabe que induce la formación de lamelipodios y rufles; Cdc42 que si bien no es parte de la vía canónica, como se explicó tiene efectos en los citoesqueletos de actina y tubulina, específicamente en la formación de filopodios o en la polaridad celular por medio de vías no canónicas al interactuar con componentes como GSK-3 β y APC (McCartney et al., 1999; Mogensen et al., 2002; Kita, et al., 2006), los cuales también por sí mismos pueden afectar el citoesqueleto. E incluso, podrían ser resultado de otros componentes de la vía Wnt canónica que están asociados al citoesqueleto como: Dvl (Krylova et al., 2000; Torres y Nelson, 2000; Capelluto et al., 2002), CK1 (Behrend et al., 2000; Wolff et al., 2005); Axina (Ciani et al., 2004) y β -catenina (Tao et al., 1996; Huang et al., 2007). Por ello, es necesario realizar otros trabajos enfocados en determinar el efecto de los bloqueadores de Rac y Cdc42, sobre el tratamiento con el aWnt, para ver si son o no capaces de prevenir los cambios del citoesqueleto, para así poder discernir la vía de acción del aWnt.

Respecto a las vías que podrían estar involucradas están: vías Wnt canónicas alternativas ó la vía Wnt/Ca²⁺, ya que en diferentes trabajos se han mostrado los efectos de distintas vía canónicas alternativas en la reorganización del citoesqueleto y la polaridad neuronal (Salinas, 2007), así como los efectos del incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular en la alteración del estado de ensamblaje de los MF de actina (Shibamoto et al., 1998), lo cual abre la posibilidad de que la señalización de Wnt a través de la vía Wnt/ Ca²⁺ module el estado dinámico de la neurona y con ello la organización y la morfología del citoesqueleto.

X. Conclusiones

Los resultados de la presente tesis demuestran que los cultivos de células de neuroblastoma humano-MSN son un modelo celular *in vitro* adecuado para estudiar la morfología celular y sus cambios. Además, estas células son capaces de diferenciarse a neuronas (Sidell et al., 1983; Reynolds et al., 1986; Sonnenfeld e Ishii, 1982) y expresar proteínas del citoesqueleto como F-actina y α -tubulina.

En este trabajo se demostró que la activación de la vía de señalización Wnt por el aWnt, modifica la organización y distribución de las proteínas del citoesqueleto de F-actina y α -tubulina provocando un rearrreglo de la morfología de células de neuroblastoma humano-MSN diferenciadas y no diferenciadas, (Mercado-Gómez et al., 2008; Lie et al., 2005; Zhang et al., 2011).

La aplicación del aWnt afecta de manera más importante al citoesqueleto de actina, ya que es este el que presenta las principales modificaciones, indicando su papel central en los cambios morfológicos celulares evocados por señales extracelulares como el aWnt.

La aplicación de distintas dosis del aWnt (1, 5 y 10 μ M) produjo el incremento en el número de filopodios y la formación de lamelipodios de distinta forma y acomodo. Así como el cambio en la direccionalidad de las fibras de estrés y la formación de ondulaciones membranales y COMTs.

El tratamiento con el aWnt a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M) produce cambios morfológicos similares entre las dosis. Demostrando su eficacia a dosis bajas.

Las alteraciones en la organización de las proteínas del citoesqueleto inducidas por el aWnt inician desde el segundo día de tratamiento, sin embargo alcanzan su máximo desarrollo hasta el cuarto día, a partir del cual permanecen constantes hasta el quinto día.

La diferenciación inducida por el tratamiento con AR y NGF se bloquea por la presencia simultánea del aWnt, lo que sugiere que la activación de la vía Wnt tiene un efecto predominante en la diferenciación neuronal.

La aplicación de los inhibidores de la vía Wnt sFRP2 y Dkk-1 no previene las alteraciones morfológicas inducidas por el aWnt, sugiriendo que las proteínas afectadas directamente por estos inhibidores no participan en el efecto del aWnt.

El inhibidor de ROCK, Y-27632, previene la formación de fibras de estrés, bloqueando parcialmente el efecto del aWnt sugiriendo que la vía de señalización Wnt más involucrada es la vía no canónica Wnt/PCP y destacando la actividad de la GTPasa Rho.

Finalmente, en conjunto estos resultados sugieren un importante papel de la vía Wnt en los acontecimientos moleculares que subyacen al rearrreglo del citoesqueleto células de neuroblastoma, ya que los cambios morfológicos observados se dan en respuesta a señales de la vía Wnt desencadenadas por el agonista.

Dada la magnitud de los eventos morfológicos y la multitud de vías de señalización implicadas desde la activación de receptores en la membrana celular hasta el citoesqueleto, estos resultados aportan información valiosa para el entendimiento de cómo la vía de señalización Wnt y sus diferentes componentes están involucrados en la morfogénesis de células neuronales, dejando pendiente el estudio de la participación de las vías alternas Wnt en el efecto del aWnt.

REFERENCIAS

- Akhmanova, A. and Steinmetz, M. O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9, 309–322.
- Albertinazzi, C., Gilardelli, D., Paris, S., Longhi, R. and de Curtis, I. (1998). Overexpression of a neural-specific Rho family GTPase, cRac1B, selectively induces enhanced neuritogenesis and neurite branching in primary neurons. *The Journal of Cell Biology*, 142, 815–825.
- Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y. and Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*, 275, 1308–1311.
- Amos, L.A. and Schliper, D. (2005). Microtubules and maps. *Advances in Protein Chemistry*, 71, 257-298.
- Attar, N. and Cullen, P. J. (2010). The retromer complex. *Advances in Enzyme Regulation*, 50, 216-236.
- Awasaki, T., Saito, M., Sone, M., Suzuki, E., Sakai, R., Ito, K. and Hama, C. (2000). The *Drosophila* Trio plays an essential role in patterning of axons by regulating their directional extension. *Neuron*, 26, 119–131.
- Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A. and Aaronson, S. A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 16180-16187.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. and Aaronson, S. A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nature Cell Biology*, 3, 683-686.
- Barnes, A. P. and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *The Annual Review of Neuroscience*, 32, 347-381.
- Bateman, J., Shu, H. and Van Vactor, D. (2000). The guanine nucleotide exchange factor Trio mediates axonal development in the *Drosophila* embryo. *Neuron*, 26, 93–106.

- Behrend, L., Stöter, M., Kurth, M., Rutter, G., Heukeshoven, J., Deppert, W. and Knippschild, U. (2000). Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *European Journal of Cell Biology*, 79(4), 240-251.
- Belenkaya, T. Y., Wu, Y., Tang, X., Zhou, B., Cheng, L., Sharma, Y. V., Yan, D., Selva, E. M. and Lin, X. (2008). The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Developmental Cell*, 14,120–131.
- Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T. and Narumiya, S. (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, 26, 431–441.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D.I. and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell*, 94, 109–118.
- Bovolenta, P., Rodriguez, J. and Esteve, P. (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axón guidance. *Development*, 133(22), 4399-4408.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 6), 737-746.
- Bradke, F. and Dotti, C. G. (1999).The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283, 1931–1934.
- Bradke, F. and Dotti, C. G. (2000). Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 10 (5), 574-581.
- Bradley, R. S. and Brown, A. M: (1990). The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *The EMBO Journal*, 9, 1569-1575.
- Brown, M. D., Cornejo, B. J., Kuhn, T. B. and Bamburg, J. R. (2000). Cdc42 stimulates neurite outgrowth and formation of growth cone filopodia and lamellipodia. *Journal of Neurobiology*, 43, 352–364.

- Capelluto, D. G., Kutateladze, T. G., Habas, R., Finkielstein, C. V., He, X. and Overduin, M. (2002). The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature*, 419 (6908), 726-729.
- Cau, J. and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *Journal of Cell Science*, 118, 2579-2587.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology*, 9, 1110–1121.
- Chuman, Y., Uren, A., Cahill, J., Regan, C., Wolf, V., Kay, B. K. and Rubin, J. S. (2004). Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1. *Peptides*, 25, 1831-1838.
- Cingolani, L. A. and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience*, 9 (5), 344-356.
- Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M. J., Dale, T. C. and Salinas, P. C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: dishevelled signals locally to stabilize microtubules. *Journal of Cell Biology*, 164 (2), 243–253.
- Ciani, L. and Salinas, P. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(5): 351-362.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127 , 469–480.
- Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H. (2004). Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 2000–2011.
- Coudreuse, D. Y., Roel, G., Betist, M. C., Destree, O., and Korswagen H. C. (2006). Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science*, 312, 921–924.
- Coudreuse, D. and Korswagen, H. C. (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134, 3–12.
- Craig, A. M. and Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annual Review of Neuroscience*, 17, 267–310.

- Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W. and Dotti, C.G. (2003) RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profiling Ila-mediated control of actin stability. *The Journal of Cell Biology*, 162, 1267-1279.
- Davenport, R.W., Dou, P., Rehder, V. and Kater. S.B. (1993). A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature*, 361, 721–724.
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10):745-756.
- Di Cunto, F. Imarisio, S., Hirsch, E., Broccoli, V., Bulfone, A., Migheli, A., Atzori, C., Turco, E., Triolo, R., Dotto, G.P., Silengo, L., Altruda, F. (2000). Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron*, (1), 115-127.
- Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. and Moon, R. T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 2625-2634.
- Eickholt, B. J., Walsh, F. S., and Doherty, P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *Journal of Cell Biology*, 157, 2, 211–217.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic*, 5(7), 470-477.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E. and Rottner, K. (2009). Filopodia: Complex models for simple rods. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(8-9), 1656-64.
- Fanto, M., U. Weber, D.I. Strutt, and M. Mlodzik. (2000). Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Current Biology: CB*, 10, 979–988.
- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W. H., Miki, T., Bottaro, D. P., Kraus, M. H. and Aaronson, S. A. (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 19465-19472.

- Fletcher, D. A. and Mullins, R. D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463 (28), 485-492.
- Forscher, P., and Smith, S.J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *The Journal of Cell Biology*, 107,1505–1516.
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Guidato, S., Griffith, J., Baena-Lopez, A., Itasaki, N., Maurice, M. M. and Vincent, J. P. (2008b) Wingless secretion requires endosome-to-Golgi retrieval of Wntless/Evi/Sprinter by the retromer complex. *Nature Cell Biology*, 10, 170–177.
- Fumoto, K., Kadono, M., Izumi, N. and Kikuchi, A. (2009). Axin localizes to the centrosome and is involved in microtubule nucleation. *EMBO reports*, 10 (6), 606-613.
- Giniger, E. (2002). How do Rho family GTPases direct axon growth and guidance? A proposal relating signaling pathways to growth cone mechanics. *Differentiation*, 70 (8), 385–396.
- Goold, R. G., Owen, R. and Gordon-Weeks, P. R. (1999). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *Journal of Cell Science*, 112 (19), 3373–3384.
- Gomez, T.M., Robles, E., Poo, M. and Spitzer, N.C. (2001). Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science*, 291 (5510), 1983–1987.
- Gundersen, R.W. and Barrett, J.N. (1980). Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor. *The Journal of Cell Biology*, 87 (3 Pt 1), 546–554.
- Gupton, S.L. and Gretler, F.B. (2007). Filopodia: The fingers that do the walking. *Science's STKE*, 2007 (400): re5.
- Gwak, J., Cho, M., Gong, S.J., Won, J., Kim, D.E., Kim, E.Y., Lee, S. S., Kim, M., Kim, T. K., Shin, J. G. and Oh, S. (2006) Protein-kinase-C-mediated β -catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway. *Journal of Cell Science*, 119 (Pt 22), 4702–4709.

- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279 (5350), 509–514.
- Hall, A. C., Lucas, F. R. and Salinas, P. C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*, 100 (5), 525–535.
- Harris, K. M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 9 (3), 343–348.
- Hausler, K. D., Horwood, N. J., Chuman, Y., Fisher, J. L., Ellis, J., Martin, T. J., Rubin, J. S. and Gillespie, M. T. (2004). Secreted frizzled-related protein- 1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19 (11), 1873-1881.
- Hausmann G, Banziger C, Basler K. Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nature Reviews*, 2007, 8(4), 331–336.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K. and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 131(8), 1663-1677.
- Herrmann, H. and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*, 73: 749-789.
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. and Zipursky, S. L. (1999). Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell*, 97(7), 853–863.
- Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H. and Narumiya, S. (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *The Journal of Cell Biology*, 141(7), 1625–1636.
- Huang, P., Senga, T. and Hamaguchi, M. (2007). A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene*, 26 (30), 4357-4371.

- Hur, E. M. and Zhou, F. Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(8), 539–551.
- Inestrosa, N. C and Arenas, E. (2010). Emerging roles of Wnt in the adult nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 11 (2), 77-86.
- Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y. and Narumiya, S. (1997). p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Letters*. 404(2-3), 118–124.
- Jalink, K. van Corven, E. J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W. H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of Cell Biology*, 126(3), 801–810.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X. and Rao, Y. (2005). Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell*, 120(1), 123–135.
- Jin, Z. and Strittmatter, S. M. (1997). Rac1 mediates collapsin-1- induced growth cone collapse. *The Journal of Neuroscience*, 17(16), 6256–6263.
- Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. and Neal, M. J. (2000). Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport*, 11(18), 3963-3967.
- Kalman, D., Gomperts, S. N., Hardy, S., Kitamura, M. and Bishop, J. M. (1999). Ras family GTPases control growth of astrocyte processes. *Molecular Biology of the Cell*. 10(5), 1665–1683.
- Kandel, R. (2001). Principios de neurociencia. Madrid: Editorial McGraw-Hill-Interamericana (71-75).
- Kasas, S., Wang, X., Hirling, H., Marsault, R., Huni, B., Yersin, A., Regazzi, R., Grenningloh, G., Riederer, B., Forrò, L., Dietler, G. and Catsicas, S. (2005). Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 62(2):124-132.

- Katoh, K., Hammar, K., Smith, P. J. and Oldenbourg, R. (1999). Birefringence imaging directly reveals architectural dynamics of filamentous actin in living growth cones. *Molecular Biology of the Cell*, 10(1), 197–210.
- Kaufmann, N., Wills, Z. P. and Van Vactor, D. (1998). *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. *Development*, 125(3), 453–461.
- Kaverina, I. and Straube, A. (2011). Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(9):968-974.
- Kawano, Y. and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 116 (Pt 13), 2627-2634.
- Kim, G.H. and Han J.K. (2005). JNK and ROKalpha function in the noncanonical Wnt/RhoA signaling pathway to regulate *Xenopus* convergent extension movements. *Developmental Dynamics*, 232(4), 958–968.
- Kimelman, D. and Xu, W. (2006). Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25(57), 7482–7491.
- Kita, K., Wittmann, T., Näthke, I. S. and Waterman-Storer, C.M. (2006). Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Molecular Biology of the Cell*, 17(5), 2331–2345.
- Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L. and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12 (11):709-721.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), 1942–1952.
- Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S. and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationships between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1201–1211.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T. W., Amaravadi, L., Brown, D. E., Guyot, D., Mays, G., Leiby, K., Chang, B., Duong, T., Goodearl, A. D., Gearing, D.P., Sokol, S. Y. and McCarthy, S. A. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238(2), 301-313.

- Krylova, O., Messenger, M. J. and Salinas, P. C. (2000). Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3 β . *Journal of Cell Biology*, 151 (1), 83–93.
- Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K. E., Ehler, E., Henriquez, J.P., Hughes, S. M. and Salinas, P.C. (2002). WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron*, 35(6), 1043–1056.
- Kuhn, T. B., Brown, M. D. and Bamburg, J. R. (1998). Rac1- dependent actin filament organization in growth cones is necessary for β 1-integrin-mediated advance but not for growth on poly-D-lysine. *Journal of Neurobiology*, 37(4), 524–540.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A. (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *The Journal of Neuroscience*, 21(7), 2361-2372.
- Lamoureux, P., Altun-Gultekin, Z. F., Lin, C., Wagner, J. A. and Heidemann, S. R. (1997). Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *Journal of Cell Science*, 110(Pt 5), 635–641.
- Lee, M.K. and Cleveland, D. W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 187-217.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S. S., Lee, A. and Luo, L. (2000). Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron*, 25(2), 307–316.
- Lee, J. L., Lin, C. T., Chueh, L. L. and Chang, C. J. (2004). Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14602-14609.
- Letourneau, P. C. (1983). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. *The Journal of Cell Biology*. 97(4), 963–973.
- Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E. and Lim, L. (1996). The p160 Rho-binding kinase ROKa is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5313–5327.

- Lewis, A. K. and Bridgman, P. C. (1992). Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *The Journal of Cell Biology*, 119(5), 1219–1243.
- Li, Z., Van Aelst, L. and Cline, H. T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons *in vivo*. *Nature Neuroscience*, 3(3), 217–225.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jesseberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R. and Gage, F.H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063), 1370-1375.
- Liebl, E., Forsthoefel, D. J., Franco, L.S., Sample, S.H., Hess, J.E., Cowger, J.A., Chandler, M. P., Shupert, A. M. and Seeger, M. A. (2000). Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal Trio's role in axon pathfinding. *Neuron*, 26(1), 107–118.
- Lin, C.H., Espreafico, E.M., Mooseker, M.S. and Forscher, P. (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron*, 16(4), 769–782.
- Lin, K., Wang, S., Julius, M. A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr. and Luyten, F. P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), 11196-11200.
- Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781–810.
- Lucas, F.R. and Salinas, P.C. (1997). WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Developmental Biology*, 192(1), 31-44.
- Lucas, F. R., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R. and Salinas, P. C. (1998). Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodeling induced by WNT-7a or lithium. *Journal of Cell Science*, 111(10), 1351–1361.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes and Development*, 8(15), 1787–1802.

- Luo, L., Hensch, T. K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature*, 379(6568), 837–840.
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*. 1(3), 173–180.
- Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 18, 601-635.
- MacDonald, B.T., Tamai, K. and He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*. 17(1): 9-26.
- Machesky L. M. and Hall A. (1997). Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *The Journal of Cell Biology*, 138(4), 913-926.
- Mallavarapu A. and Mitchison T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 1097-1106.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411(6835), 321-325.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G. H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L. and Wu, D. (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular Cell*, 7(4), 801-809.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., Glinka, A. and Niehrs, C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664-667.
- Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D. and Solnica-Krezel, L. (2002). Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Current Biology: CB*. 12(11), 876–884.
- Mattila P. K. and Lappalainen P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9(6), 446-454.

- McCartney, B.M., Dierick, H. A., Kirkpatrick, C., Moline, M. M., Baas, A., Peifer, M. and Bejsovec, A. (1999). *Drosophila* APC2 is a cytoskeletally associated protein that regulates wingless signaling in the embryonic epidermis. *The Journal of Cell Biology*, 146(6), 1303–1318.
- McQueen P, Ghaffar S, Guo Y, Rubin EM, Zi X, Hoang BH. (2011). The Wnt signaling pathway: implications for therapy in osteosarcoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 11(8):1223-1232.
- Mercado-Gómez, O., Hernández-Fonseca, K., Villavicencio-Queijeiro, A., Massieu, L., Chimal-Monroy, J. and Arias, C. (2008). Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3beta activity and induces morphological changes in cortical neurons: role of tau phosphorylation. *Neurochemical Research*, 33(8), 1599-1609.
- Mikhailov, A. and Gundersen, G. G. (1998). Relationship Between Microtubule Dynamics and Lamellipodium Formation Revealed by Direct Imaging of Microtubules in Cells Treated With Nocodazole or Taxol. *Cell Motility and Cytoskeleton*, 41(4), 325-340.
- Mikels, A. J. and Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25(57), 7461–7468.
- Miller, J.R., Rowning, B. A., Larabell, C. A., Yang-Snyder, J. A., Bates, R. L., and Moon, R.T. (1999). Establishment of the dorsal-ventral axis in *Xenopus* embryos coincides with the dorsal enrichment of dishevelled that is dependent on cortical rotation. *The Journal of Cell Biology*. 146(2), 427–437.
- Miller J. R. (2002). The Wnts. *Genome biology*. 3(1), REVIEWS3001.
- Mogensen, M. M., Tucker, J. B., Mackie, J. B., Prescott, A. R. and Näthke, I. S. (2002). The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, 157(6), 1041–1048.
- Nakayama, A. Y., Harms, M. B. and Luo, L. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5329–5338.
- Naumanen, P., Lappalainen, P. and Hotulainen, P. (2008). Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy*, 231(3), 446-454.

- Newsome, T., Schmidt, S., Dietzl, G., Keleman, K., Asling, B., Debant, A. and Dickson, B. J. (2000). Trio combines with Dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in *Drosophila*. *Cell*, 101(3), 283–294.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53–62.
- Pan, C. L., Baum, P. D., Gu, M., Jorgensen, E. M., Clark, S. G. and Garriga, G. (2008) C. elegans AP-2 and retromer control Wnt signaling by regulating mig-14/Wntless. *Developmental Cell*, 14(1), 132–139.
- Papakonstanti, E.A. and Stournaras, C. (2008). Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Letters*, 582(14), 2120-2127.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling – where are we now? *Journal of Cell Science*, 123(Pt 11), 1841-1850.
- Pollard, T. D. and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), 453–465.
- Pollard, T. D. and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326 (5957), 1208-1212.
- Port, F., Kuster, M., Herr, P., Furger, E., Banziger, C., Hausmann, G. and Basler, K. (2008). Wingless secretion promotes and requires retromer-dependent cycling of Wntless. *Nature Cell Biology*, 10(2), 178–185.
- Reichsman, F., Smith, L. and Cumberledge, S. (1996) Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *The Journal of Cell Biology*, 135(3), 819-827.
- Reynolds, C. P., Biedler, J. L., Spengler, B. A., Reynolds, D. A., Ross, R. A., Frenkel, E. P. and Smith, R. G. (1986). Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(3), 375-387.
- Ridley, A.J. and A. Hall. (1992) The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3), 389–399.

- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C. L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* . 70(3), 401–410.
- Ridley, A. J. (1994). Membrane ruffling and signal transduction. *Bioessays*. 16(5): 321-327.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*, 50(4), 649–657.
- Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J. M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C. and Bovolenta, P. (2005). SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nature Neuroscience*, 8(10), 1301-1309.
- Rogers, S. L. and Gelfand, V. I. (2000). Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(1):57-62.
- Rubin, J. S., Barshishat-Kupper, M., Feroze-Merzoug, F. and Xi, Z. F. (2006). Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2093-2105.
- Ruchhoeft, M. L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C. E. and Harris, W. A. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by Rho-family GTPases *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 19(19), 8454–8463.
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A. and Arias, C. (2011). GSK3 Function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011:189728.
- Salinas, P.C., Fletcher, C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Nusse, R. (1994) Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Development*, 120(5): 1277-1286.
- Salinas, P. C. (2007). Modulation of the microtubule cytoskeleton: a role for a divergent canonical Wnt pathway. *Trends in Cell Biology*, 17(7): 333-342.
- Salinas, P. C. and Zou, Y. (2008). Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annual Review of Neuroscience*, 31: 339-358.
- Schulte, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacological Reviews*, 62(4): 632-667.

- Schwamborn, J.C. and Püschel, A.W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nature Neuroscience*, 7(9), 923-929.
- Semenov, M. V., Tamai, K., Brott, B. K., Kuhl, M., Sokol, S. and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Current Biology: CB*, 11(12), 951-961.
- Shi, S. H., Cheng, T., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2004). APC and GSK-3 β are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Current Biology*, 14(22), 2025–2032.
- Shibamoto, S., Higano, K., Takada, R., Ito, F., Takeichi, M. and Takada, S. (1998). Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signaling. *Genes to Cells: devoted to molecular and cellular mechanisms*, 3(10):659-670.
- Shutova, M. S., Alexandrova, A. Y. and Vasiliev, J. M. (2008). Regulation of polarity in cells devoid of actin bundle system after treatment with inhibitors of myosin II activity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 65(9), 734-746.
- Sidell, N., Altman, A., Haussler, M. R. and Seeger, R. C. (1983). Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Experimental Cell Research*, 148(1), 21-30.
- Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B. and Moon, R.T. (1997). Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Developmental Biology*, 182(1), 114–120.
- Sonnenfeld, K. H. and Ishii, D. N. (1982) Nerve growth factor effects and receptors in cultured human neuroblastoma cell lines. *Journal of Neuroscience Research*, 8(2-3), 375-391.
- Steven, R., Kubiseski, T. J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Ruiz Morales, A., Hogue, C. W., Pawson, T. and Culotti, J. (1998). UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell*, 92(6), 785–795.
- Strutt, D.I., Weber, U. and Mlodzik, M. (1997). The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling. *Nature*, 387(6630), 292–295.

- Tahinci, E. and Symes, K. (2003). Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Developmental Biology*, 259(2), 318–335.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T. and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Developmental Cell*, 11(6), 791–801.
- Taketo, M. M. (2004). Shutting down Wnt signal-activated cancer. *Nature Genetics*, 36(4):320-322.
- Tao, Y.S., Edwards, R. A., Tubb, B., Wang, S., Bryan, J. and McCrea, P. D. (1996) Beta-catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *The Journal of Cell Biology*, 134(5), 1271–1281.
- Torres, M. A., and Nelson, W.J. (2000). Colocalization and redistribution of Dishevelled and actin during Wnt-induced mesenchymal morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 149(7):1433–1442.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S. and Rubin, J. S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wntless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4374-4382.
- Van Leeuwen, F. N., Kain, H.E., Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W. and Collard, J. G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *The Journal of Cell Biology*, 139(3), 797–807.
- Vastrik, I., Eickholz, B. J., Walsh, F. S., Ridley, A. and Doherty, P. (1999). Sema3A induced growth-cone collapse is mediated by Rac1 amino acids 17–32. *Current Biology: CB*, 9(18), 991–998.
- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. and Mitchison, T.J. (1997). Actin dynamics in vivo. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), 54–61.
- Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, JR. 3rd. and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448–452.

- Winder, S. J, and Ayscough, K. R. (2005). Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118 (Pt 4), 651-654.
- Winter, C.G., Wang, B., Ballew, A., Royou, A. Karess, R. Axelrod, J.D. and Luo, L. (2001). Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell*. 105(1), 81–91.
- Witte, H. and Bradke, F. (2008). The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(5): 479-487.
- Wolff, S., Xiao, Z., Wittau, M., Süssner, N., Stöter, M. and Knippschild, U. (2005). Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 delta) with the light chain LC2 of microtubule associated protein 1A (MAP1A). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1745(2), 196–206.
- Wong, W. T., Faulkner-Jones, B., Sanes, J. R. and Wong, R. O. (2000). Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *The Journal of Neuroscience*, 20(13), 5024–5036.
- Yamada, K. M., Spooner, B. S. and Wessells, N. K. (1971). Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. *The Journal of Cell Biology*, 49(3), 614–635.
- Yamashita, T., Ticker, K. L. and Barde, Y. A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24(3), 585–593.
- Yang, P. T., Lorenowicz, M. J., Silhankova, M., Coudreuse, D. Y., Betist, M. C. and Korswagen, H. C. (2008). Wnt signaling requires retromer-dependent recycling of MIG-14/Wntless in Wnt-producing cells. *Developmental Cell*, 14(1),140–147. [PubMed: 18160347].
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120(1), 137–149.
- Yoshino, K., Rubin, J. S., Higinbotham, K. G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S. Y. and Perantoni, A. O. (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mechanisms of Development*, 102(1-2), 45-55.

- Zhai, L., Chaturvedi, D. and Cumberledge, S. (2004). Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33220–33227.
- Zhang, L., Yang, X., Yang, S. and Zhang, J. (2011). The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 33(1-8).
- Zheng, J.Q., Wan, J. J. and Poo, M. M. (1996). Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *The Journal of Neuroscience*. 16(3), 1140–1149.
- Zhou, F. Q. and Snider, W. D. (2005). GSK-3 β and microtubule assembly in axons. *Science*, 308(5719), 211–214.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Näthke, I. S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Current Biology*, 11(1), 44–49.