



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA MADURACIÓN
Y MANTENCIÓN DEL APARATO POSTSINÁPTICO DE LA UNM DE VERTEBRADOS
MEDIADOS POR EL RECEPTOR FZD9**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular**

POR

**JORGE ALFREDO OJEDA ORELLANA
CONCEPCIÓN-CHILE
AGOSTO 2017**

**Profesor Guía: Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción**

© JORGE ALFREDO OJEDA ORELLANA
CONCEPCIÓN-CHILE
Julio 2017

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Pablo Henríquez Hohmann
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas



1. Dr. José Leonardo Gúzman González
Comisión Evaluadora
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

2. Dr. Gonzalo Yévenes Crisóstomo
Comisión Evaluadora
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

3. Dr. Felipe Court
Comisión Evaluadora
Universidad Mayor

AGRADECIMIENTOS



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	V
INDICE DE ESQUEMAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	IX
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	IX
ABREVIACIONES	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La UNM de vertebrado.....	1
1.2 Las células de Schwann perisinápticas controlan la estabilidad sináptica.....	4
1.3 Formación de la UNM.....	7
1.4 Maduración de la UNM.....	9
1.4.1 Maduración del terminal presináptico.....	10
1.4.2 Maduración del terminal postsináptico.....	11
1.5 Constitución molecular en la maduración de la UNM.....	17
1.5.1 Componentes moleculares del terminal presináptico que participan de la maduración de la UNM de vertebrado.....	17
1.5.2 Proteínas de la matriz extracelular (MEC) que controlan la maduración de la UNM de vertebrado.....	18
1.5.3 Constituyentes moleculares involucrados en la maduración del aparato postsináptico.....	20
1.6 Señalización Wnt.....	24
1.6.1 Señalización Wnt en la UNM.....	28
1.6.2 El receptor Wnt Fzd9 modula la agregación del AChR.....	34
1.7 Aproximaciones experimentales para el estudio <i>in vivo</i> de la UNM de vertebrado.....	38
2. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	40
3. OBJETIVO GENERAL:.....	42
3.1 Objetivos Específicos:.....	43
3.1.1 Objetivo 1.....	43
3.1.2 Objetivo 2.....	43
3.1.3 Objetivo 3.....	43

4.	MATERIALES	43
4.1	Animales de experimentación.....	43
4.2	Cepas Bacterianas.	44
4.3	Plásmidos.	45
4.4	Equipos comerciales.....	46
4.5	Anticuerpos.	47
4.6	Reactivos y soluciones en general.....	48
4.7	Material en general y recursos disponibles.....	49
5.	MÉTODOS.....	51
5.1.1	Transformación de bacterias E. coli DH5 α	51
5.1.2	MidiPrep.....	51
5.1.3	Purificación de plásmidos a gran escala por precipitación con PEG (Maxiprep).....	53
5.1.4	Electroporación de músculo de ratón.	54
5.1.5	Axotomía del nervio facial.	55
5.1.6	Tinción de músculo completo LAL con α -BTX conjugada a fluoróforos.	57
5.1.7	Inmunohistoquímica.	57
5.1.8	Adquisición de imágenes.....	58
5.1.9	Análisis de la unión neuromuscular.	59
5.1.10	Análisis de área y perímetro del aparato postsináptico.....	60
5.1.11	Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico.	61
5.1.12	Cuantificación de la aposición pre y post sináptica de la UNM de vertebrado.....	62
5.1.13	Proyecciones y videos en tres dimensiones de la UNM de vertebrado.	63
5.2	Registro intracelular de fibras musculares electroporadas.....	64
5.2.1	Preparación del músculo LAL.	64
5.2.2	Estimulación presináptica.	64
5.2.3	Registro de potenciales postsinápticos.	65
5.2.4	Análisis de registros electrofisiológicos.....	68
5.2.5	Tiempo de subida 10 – 90.	70
5.2.6	Tiempo de decaimiento (τ).	70
5.2.7	Resistencia de entrada.	70
5.3	Extractos de proteínas totales.....	72
5.3.1	Cuantificación de proteínas.....	72
5.4	Western Blot.	73
5.4.1	Electroforesis de proteínas.....	73
5.4.2	Transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	74
5.4.3	Boqueo, incubación con anticuerpos y revelado.	75
5.5	Análisis estadístico.	76

6.	RESULTADOS	77
6.1	Estandarización de electroporación del músculo LAL	77
6.1.1	La electroporación del músculo <i>Levator auris longus</i> es altamente eficiente.	77
6.1.2	La electroporación del músculo LAL no modifica la morfología postsináptica en la UNM de vertebrado.....	81
6.1.3	La transgénesis transiente mediante la técnica de electroporación del músculo LAL permite estudiar la estructura y función de la UNM de vertebrados.	85
6.2	La vía ACh/CDK5 regula la agregación de los AChR durante el estadio postnatal.	93
6.2.1	Nestina es distribuida en regiones de baja densidad de agregados del AChR en la UNM de vertebrados.	94
6.2.2	Cdk5 es distribuido en regiones de baja densidad de AChRs en el componente postsináptico de la UNM cuando es sobreexpresada <i>in vivo</i> en el músculo LAL.....	97
6.2.3	La sobreexpresión de Cdk5 altera la maduración del componente postsináptico promoviendo la formación de estructuras fragmentadas.	100
6.3	Wnt3a promueve la desagregación del AChR para producir un fenotipo de envejecimiento de la UNM de vertebrados.....	103
6.3.1	La sobreexpresión <i>in vivo</i> de Wnt3a modifica la morfología del componente postsináptico de la UNM de vertebrados.	104
6.3.2	La sobreexpresión de Wnt3a afecta negativamente el perfil de inervación de la UNM de vertebrado.....	107
6.3.3	La sobreexpresión de Wnt3a en músculo LAL postnatal incrementa la liberación de neurotransmisor evocada, sin alterar su liberación espontánea.	112
6.4	El receptor Wnt Fzd9 altera la morfología y transmisión sináptica en la UNM de vertebrado.	115
6.4.1	Fzd9 altera la maduración morfológica y funcional de la sinapsis neuromuscular de vertebrado.....	115
6.4.2	Fzd9 es distribuido tempranamente en regiones sinápticas de la UNM de vertebrado durante la maduración postnatal.	116
6.4.3	El mantenimiento de Fzd9 en el componente postsináptico es afectado por la pérdida de inervación.....	120
6.4.4	Fzd9 afecta la maduración morfológica de la UNM de vertebrado.	125
6.4.5	Efectores de la vía Wnt dependiente de β -catenina alteran la maduración del aparato postsináptico en la UNM de vertebrado.	130
6.4.6	La sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9 altera la aposición de los componentes pre y post-sinápticos de la UNM de vertebrado.	134
6.4.7	Fzd9 es un regulador del ensamblaje funcional de la UNM de vertebrado.	137
6.4.8	Fzd9 afecta la liberación evocada y espontánea del neurotransmisor ACh.....	142
6.4.9	La sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9 reduce la resistencia de entrada de la membrana.....	144
6.4.10	La ganancia y disminución de Fzd9 muscular no modifican el área de la sección transversal de miofibras electroporadas.	146
6.5	El efector de la vía Wnt β -catenina es redistribuido en la organización postnatal de la UNM de vertebrado.....	148
6.5.1	β -catenina se distribuye en la UNM durante la maduración.	148

6.5.2	La distribución de β -catenina en etapa postnatal es mantenida por el aparato presináptico de la UNM de vertebrado.....	152
6.5.3	La activación de la vía Wnt, altera la localización de β -catenina.	154
7.	DISCUSIÓN.....	157
7.1	Electroporación del músculo LAL como herramienta de estudio de la UNM de vertebrados.	157
7.1	La vía ACh/Cdk5/Nestina promueve la reorganización morfológica del aparato postsináptico en la UNM de vertebrado durante etapas postnatales.....	162
7.1	Wnt3a promueve la fragmentación del aparato postsináptico y modifica la transmisión sináptica de la UNM.	171
7.2	Fzd9 altera la morfología y función de la UNM en el desarrollo postnatal.....	179
7.3	β -catenina participa de la organización in vivo de los agregados de AChRs en la UNM de vertebrado en la etapa postnatal.....	190
8.	CONCLUSIONES	200
9.	ANEXOS	201
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	204



INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Esquema general de la maduración postnatal y estructuración morfológica y funcional de la UNM de vertebrado	17
Esquema 2	Activación de la vía de señalización ACh/Cdk5 en etapa embrionaria de la UNM de vertebrado.....	23
Esquema 3	Activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	26
Esquema 4	Vías de señalización involucradas en el modelo de maduración de la UNM.....	37
Esquema 5	Electroporación del músculo LAL	55
Esquema 6	Esquema anatómico del nervio facial	56
Esquema 7	Estructura morfológicas del aparato postsináptico en la UNM.....	60

Esquema 8 Cambios producidos en el registro durante el proceso de penetración de la micropipeta en una fibra muscular.....	67
Esquema 9 Trazos representativos de la resistencia de entrada de membrana.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos.....	47
Tabla 2 Anticuerpos secundarios utilizados.....	48

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1 Electroporación de músculo <i>Levator auris longus</i> (LAL).	79
Figura 2 Eficiencia de electroporación del músculo <i>Levator auris longus</i> (LAL).	80
Figura 3 La sobreexpresión <i>in vivo</i> de Tomato no altera la maduración del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.....	85
Figura 4 La electroporación de músculo LAL con la proteína fluorescente Tomato no altera la morfología de los componentes de la sinapsis neuromuscular.....	87
Figura 5 La sobreexpresión de la proteína fluorescente roja Tomato no afecta la liberación evocada y espontánea de neurotransmisor en fibras musculares de LAL a P21-P23.	90
Figura 6 La sobreexpresión de la proteína Tomato no altera la dinámica de liberación del neurotransmisor ACh.....	92
Figura 7 Distribución postnatal de la proteína de filamentos intermedios nestina en la UNM de vertebrado.	97

Figura 8 Localización <i>in vivo</i> de Cdk5-GFP sobreexpresado en fibras musculares.	99
Figura 9 La sobreexpresión <i>in vivo</i> de Cdk5-GFP afecta la maduración de la UNM de vertebrado.....	103
Figura 10 La sobreexpresión <i>in vivo</i> del ligando secretado Wnt3a modifica la morfología del componente postsináptico de la UNM de vertebrado.....	106
Figura 11 La sobreexpresión de Wnt3a modifica el componente presináptico de la sinapsis neuromuscular.	108
Figura 12 Los cambios estructurales de la UNM de vertebrado inducidos por Wnt3a alteran la aposición de los terminales pre y post sinápticos.	112
Figura 13 La sobreexpresión de Wnt3a en fibras musculares de LAL adulto incrementa la liberación evocada sin alterar la liberación espontánea de neurotransmisor.	114
Figura 14 Distribución postnatal de Fzd9 en la UNM de vertebrado.	119
Figura 15 Axotomía del nervio facial.....	122
Figura 16 La Axotomía del nervio facial altera la distribución postsináptica de Fzd9 endógeno en el músculo LAL.	125
Figura 17 Fzd9 es distribuido en regiones sinápticas de la UNM de vertebrado.	126
Figura 18 La ganancia y pérdida de función del receptor Fzd9 altera la transición morfológica del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.	130
Figura 19 La sobre-expresión de los componentes de la vía de señalización Wnt/ β -catenina Lrp6, Lrp6 Δ C y Dkk1 afectan la transición placa a pretzel del aparato postsináptico en la UNM.....	133
Figura 20 La sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9 muscular afecta la aposición de los componentes pre y post-sinápticos de la UNM.	137
Figura 21 La sobre-expresión o silenciamiento de la expresión del receptor Fzd9 muscular no altera la dinámica de liberación del neurotransmisor ACh.....	139

Figura 22 La sobre-expresión y silenciamiento de Fzd9 muscular indican un curso no alterado en la transición de las subunidades de los AChR postsinápticos en la UNM de vertebrado.....	141
Figura 23 La sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9 afectan la liberación evocada y espontánea de neurotransmisor en miofibras de músculo LAL.	144
Figura 24 La sobre-expresión y silenciamiento de Fzd9 reducen la resistencia de entrada de la membrana (R_{in}) de fibras musculares.	145
Figura 25 La ganancia o pérdida de expresión del receptor Wnt Fzd9 mediante electroporación de músculo LAL, no altera el tamaño de las miofibras.....	147
Figura 26 Localización de β -catenina durante la maduración postnatal de la UNM de vertebrados.	151
Figura 27 La axotomía del nervio facial afecta la localización de β -catenina en músculos LAL.	154
Figura 28 La sobreexpresión muscular de Wnt3a modifica la localización de β -catenina en la UNM.	156
Figura 29 Anexo 1. Distribución de los efectores nestina y p35 de la vía ACh/Cdk5 en la UNM de vertebrado y cultivo de células musculares diferenciadas.....	201
Figura 30 Anexo 2. Localización de receptores Fzds en la UNM de vertebrado.	203

ABREVIACIONES

%p/v	: porcentaje peso volumen
%v/v	: porcentaje volumen / volumen
°C	: grados Celsius
µg	: micro gramo
µL	: micro litro
µs	: micro segundo
Abs	: absorbancia
ACh	: acetilcolina
APC	: adenomatous polyposis coli
ATP	: adenosina trifosfato
bp	: pares de bases nucleotídicas
BSA	: albúmina de suero de bovino
BTX	: bungarotoxina
cADN	: ácido desoxirribonucleico complementario
Cdk5	: quinasa dependiente de ciclina 5 (<i>Cyclin Dependent Kinase 5</i>)
CK	: creatina quinasa
CMV	: citomegalovirus
CRD	: dominio rico en cisteínas
ELA	: esclerosis lateral amiotrófica.
EPC	: corriente postsinápticas excitatorias (<i>Excitatory Postsynaptic Currents</i>)
EPP	: potencial de placa evocado (<i>Evoked Endplate Potential</i>).
DKK1	: dickkopf 1
DMEM	: medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	: dimetilsulfóxido
DNA	: ácido desoxirribonucleico
DNAsas	: desoxirribonucleasas
dNTPs	: desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	: ditioneitol
Dvl	: dishevelled
EDTA	: ácido etilendiamino tetraacético
Fdz	: frizzled
g	: gramo
GAPDH	: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GSK-3β	: quinasa de la glicógeno sintasa 3β
h	: horas
HA	: hemaglutinina

HRP	:	peroxidasa de rábano
IGF-1	:	factor de crecimiento de insulina
IgG	:	inmunoglobulina G
JNK	:	quinasa amino terminal de c-jun
LDH	:	lactato deshidrogenasa
kb	:	kilo base
kDa	:	kilo Dalton
Km	:	constante de Michaelis-Menten
L	:	litro
LAL	:	músculo elevador de la oreja (<i>Levator auris longus</i>).
LB	:	medio de cultivo Luria-Bertani
LDL	:	lipoproteína de baja densidad
Lrp	:	proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
M	:	molar
m	:	contenido cuantal
mA	:	mili amperes
MAP-1B	:	proteína asociada a microtúbulos 1B (<i>Microtubule Associated Protein</i>).
MEC	:	matriz extracelular
mEPC	:	corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (<i>miniature Excitatory Postsynaptic Currents</i>)
mEPP	:	potencial de placa en miniatura (<i>Miniature Endplate Potential</i>)
mg	:	mili gramos
MHC	:	cadena pesada de miosina
min	:	minuto
mL	:	mili litro
mm	:	mili metro
mM	:	milimolar
MRFs	:	factores reguladores de la miogénesis
mRNA	:	ácido ribonucleico mensajero
n	:	número de elementos analizados
N°	:	número
NA	:	apertura numérica (<i>Numerical Aperture</i>).
NF	:	neurofilamento
ng	:	nano gramo
nm	:	nano metro
<i>n, N</i>	:	en la mayoría de los casos <i>n</i> se refiere al número de imágenes, fibras o terminales analizados y <i>N</i> al número de individuos usados.
OCT	:	medio de inserción para muestras de tejidos congelados para asegurar la temperatura óptima de corte (<i>Optimal Cutting Temperature</i>)

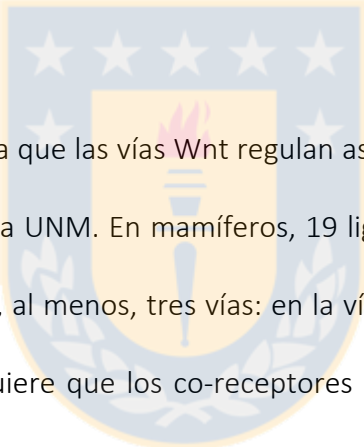
p	: probabilidad estadística
PO –P42	: día postnatal 0 al 42
PBS	: tampón fosfato salino
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
PFA	: paraformaldehído
PKA	: proteína quinasa A
PKC	: proteína quinasa C
pM	: pico molar
pRL-SV40	: vector que codifica para la proteína luciferasa de renilla
PSA	: persulfato de amonio
QC	: contenido cuántico (<i>Quantal Content</i>).
rp	: revoluciones por minuto
RRP	: contingente de vesículas sinápticas listas para ser liberadas (<i>Readily Releaseable Pool</i>).
	RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción reversa
s	: segundo
SD	: desviación estándar
SDS	: dodecil sulfato de sodio
SEM	: error estándar de la media
Sfrp	: proteína soluble relacionada con Frizzled
SOC	: medio de cultivo óptimo en glucosa
SV	: vesículas sinápticas
SV2	: proteína 2 de la vesícula sináptica
TA:	: músculo tibial anterior (<i>Tibialis anterior</i>).
TBS:	: tampón Tris salino
TCF/LEF	: factor de células T / factor estimulante linfoide
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilen diamina
Tris	: Tris(hidroximetil)amino-metano
U	: unidad enzimática
UV	: ultra violeta
V	: Voltios
VACht	: transportador vesicular de la acetilcolina (<i>Vesicular Acetylcholine Transporter</i>).
Vm	: Potencial de la membrana plasmática.
xg	: gravedad centrífuga
µg	: micro gramo
µL	: micro litro

RESUMEN

El establecimiento de contactos entre las neuronas y sus células blanco es esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Este proceso gradual es coordinado principalmente por moléculas secretadas desde los componentes pre y postsinápticos para la formación, establecimiento, maduración y mantención de las sinapsis. Un modelo arquetípico de sinapsis es la Unión Neuromuscular (UNM) de vertebrado, una sinapsis periférica donde el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado desde el terminal presináptico, constituido por el axón motor, y se une a receptores de acetilcolina (AChR) que se encuentran agregados en la especialización postsináptica de la fibra muscular. La sinapsis neuromuscular presenta un alto grado de organización subcelular, además de gran tamaño y fácil accesibilidad experimental, lo que ha permitido el entendimiento de principios generales de la sinaptogénesis, de la función neurofisiológica y al desarrollo potencial de terapias para desórdenes musculares.

Durante el desarrollo embrionario, la diferenciación presináptica se acompaña de cambios en las terminales del motor que entran en contacto con las fibras musculares, mientras que la diferenciación postsináptica se caracteriza por la formación de agregados del receptor de acetilcolina (AChR) en la membrana muscular. Dos moléculas presinápticas controlan la diferenciación postsináptica temprana: agrina, a través de su unión al receptor MuSK estabiliza a los agregados del AChR, mientras acetilcolina (ACh) a través de una vía que involucra a la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5), los dispersa.

Luego, en la fase postnatal, el proceso de maduración es evidenciado en los cambios morfológicos postsinápticos en los que pequeñas densidades uniformes de AChR en forma de placa ovalada son transformadas en estructuras multiperforadas grandes y elaboradas con forma de pretzel. Las diferentes morfologías visualizadas en la transición de placa a pretzel se han utilizado como un parámetro cuantitativo de maduración. Sin embargo, a pesar de una morfología bien descrita, las moléculas y los mecanismos que regulan el proceso de maduración y mantenimiento de la UNM no han sido del todo descritos.



Creciente evidencia revela que las vías Wnt regulan aspectos claves de la sinaptogénesis durante el desarrollo de la UNM. En mamíferos, 19 ligandos Wnt se unen a 10 posibles receptores Fzd activando, al menos, tres vías: en la vía canónica, la unión de un ligando Wnt al receptor Fzd requiere que los co-receptores LRP5 / 6 induzcan la acumulación citosólica de β -catenina y su translocación nuclear para activar genes blanco. Esta vía puede ser inhibida por las proteínas DKK, que actúan a través de co-receptores LRP5 / 6. Dos vías no canónicas son activadas por Wnts: la vía de polaridad celular en el plano (PCP) y las vías Wnt/ Ca^{2+} , activando diferentes efectores intracelulares. Evidencia relevante muestra que las diversas vías Wnt controlan el ensamblaje embrionario de la UNM a) induciendo la agregación aneural temprana de AChRs en la membrana del músculo, b) estabilizando los agregados de AChRs en la región sináptica, y dispersando los agregados de AChR en regiones extrasinápticas. En este trabajo, hemos abordado

experimentalmente la posibilidad de que receptores Fzd podrían estar involucrados en la generación de estas diferentes respuestas.

Previamente hemos mostrado que Fzd9 se distribuye junto con los agregados de AChR en UNMs de estadio embrionario y que, en cultivo de células C2C12 diferenciadas a miotubos tratados con agrina, Fzd9 disminuye la agregación de AChRs comparado con el control. A su vez, el silenciamiento de Fzd9 induce un mayor número de agregados de AChR. Basados en estos hallazgos y los trabajos anteriores, se abordó la hipótesis “Fzd9 promueve la maduración del aparato post sináptico de la UNM de vertebrados a través de una vía Wnt dependiente de β -catenina”. Dada la similitud del efecto desagregante de Fzd9 con la vía activada por ACh/Cdk5 en etapas embrionarias, la hipótesis secundaria derivada de la hipótesis principal es que “los mecanismos moleculares activados por el receptor Fzd9 involucran además la participación de efectores moleculares de la vía de señalización ACh/Cdk5”.

En esta tesis, la aproximación *in vivo* fue desarrollada en UNMs de músculo *Levator auris longus* (LAL) donde se estandarizó la detección endógena y el análisis de proteínas distribuidas en los componentes pre y postsinápticos en condiciones de modulación de proteínas a través de electroporación de alta eficiencia de fibras musculares, que fueron combinados con ensayos de inmunofluorescencia y de neurotransmisión muscular mediante registro electrofisiológico intracelular de preparados *ex vivo* de músculo LAL. Se evaluó la posible función desagregante de AChRs de la vía ACh/Cdk5 en etapas postnatales

mediante su activación por sobre-expresión de Cdk5 muscular, lo que indicó que Cdk5 promueve la fragmentación del aparato postsináptico. En el estudio de los efectores de la vía Wnt en la UNM, se analizaron los cambios morfológicos postsinápticos, además del acoplamiento Excitación-Constracción (E-C). A su vez, mediante microscopía confocal se analizó tanto la localización de proteínas Wnt como su distribución en UNM inervadas y denervadas mediante la resección de un segmento del nervio facial. Los resultados muestran que Fzd9 se distribuye junto con los agregados del AChR durante el desarrollo postnatal co-localizando con los componentes pre y postsinápticos de la UNM. Teniendo en cuenta la localización postsináptica de Fzd9, analizamos su posible función a través de la ganancia y pérdida de expresión de Fzd9 por electroporación. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de Fzd9 aumenta la complejidad del aparato postsináptico probablemente reorganizando los agregados de AChRs. A su vez, el silenciamiento de Fzd9 promueve la aparición de estructuras postsinápticas fragmentadas. Adicionalmente, la sobreexpresión de Wnt3a en ratones adultos también induce la morfología fragmentada, un fenotipo similar a los aparatos postsinápticos descritos en envejecimiento. Los efectores de la vía de señalización Wnt / β -catenina mostraron resultados comparables. Para entender la relevancia de los cambios morfológicos del aparato postsináptico en términos funcionales, se realizaron registros intracelulares de fibras musculares mediante la estimulación presináptica de preparados *ex vivo* del músculo LAL. Luego de estimulación a alta frecuencia, encontramos que la sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9 no afectó la liberación de neurotransmisor desde el terminal presináptico en P21.

Sin embargo, se observó que las amplitudes de los pulsos evocados estaban disminuidas cuando Fzd9 era sobre-expresado. A baja frecuencia de estimulación, el registro intracelular de fibras electroporadas con Fzd9 muestra una disminución significativa del tamaño del potencial de placa terminal evocado (EPP) y de la liberación espontánea de neurotransmisor (mEPP). Estos análisis se correlacionaron con una disminución en la resistencia de entrada de membrana, lo que sugiere que el receptor postsináptico Fzd9 está involucrado en la transmisión sináptica. En forma sorprendente, se observó que la fragmentación del aparato postsináptico inducida por Wnt3a se acompañó de transmisión neuromuscular más eficiente. Finalmente, analizamos la relación pre y postsináptica donde en los ratones electroporados para sobre-expresar o silenciar Fzd9, se observó una pérdida de la precisión en el alineamiento de los AChRs postsinápticos con los terminales presinápticos. En forma similar, cuando se sobre-expresó Wnt3a en etapa adulta, se encontró una disminución en la yuxtaposición del terminal presináptico en relación a los AChRs en la membrana muscular. En conjunto, concluimos que Fzd9 y efectores de la vía Wnt dependiente de β -catenina podrían afectar la organización postsináptica para el ensamblaje de UNMs funcionales, modulando la distribución postsináptica de los agregados de AChRs.

ABSTRACT

The establishment of contacts between neurons and their target cells is essential for the correct performance of the nervous system and the assembly of the presynaptic neurotransmitter release machinery with the postsynaptic apparatus. This gradual process is coordinated by secreted stimulatory and inhibitory molecules from pre- and post-synaptic components for the formation, growth, maturation, and maintenance of the synapse. An archetypal model to study the development of synapses is the vertebrate neuromuscular junction (NMJ), a peripheral cholinergic synapse constituted by a presynaptic motor nerve terminal, a postsynaptic muscle specialization and terminal Schwann cells. This synapse presents a high grade of subcellular specialization, large size and easier experimental accessibility that has contributed to understanding the general principles of synaptogenesis *in vivo* and the development of therapies for neuromuscular disorders.

During embryonic development, presynaptic differentiation is accompanied by changes in motor terminals that contact the muscle fibers, whereas postsynaptic differentiation is characterized by the formation of aggregates of the acetylcholine receptor (AChR) on the muscle membrane. Two presynaptic molecules control early postsynaptic differentiation: agrin, through its binding to the MuSK receptor stabilizes AChR aggregates, whereas acetylcholine (ACh), through a pathway involving the cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), disassemble them. Then, in the postnatal stage, the maturation process is evidenced in

the postsynaptic morphological changes where small plaque-like uniform AChR densities are transformed into bigger multiperforated and elaborated branches with a pretzel-like shape. In turn, the different morphologies visualized in the plaque-to-pretzel transition have been used as a quantitative parameter of maturation. However, in spite of a well-described morphology, the molecules and mechanisms regulating the NMJ maturation and maintenance process have been poorly described.

Growing evidence reveals that Wnt pathways regulate key aspects of synaptogenesis during NMJ development. In mammals, 19 Wnt ligands bind 10 possible Fzd receptors activating, at least, three pathways: In the canonical pathway, Wnt binding to Fzd receptor requires the co-receptors LRP5/6 to induce the cytosolic accumulation of β -catenin and its nuclear translocation to activate target genes. This pathway can be inhibited by DKK proteins, which act through LRP5/6 co-receptors. Two non-canonical pathways are activated by Wnts: the PCP and the Wnt/ Ca^{2+} pathways, both activating different intracellular effectors. Strong evidence demonstrates that different Wnt pathways control the embryonic assembly of the NMJ by a) inducing the early aneural clustering of AChRs on the muscle membrane, b) the stabilization of AChRs in the synaptic region, and the dispersion of AChR aggregates in extrasynaptic regions. In this work, we have focused on the idea that Fzd receptors could be involved in these different responses.

We have previously shown that Fzd9 distributes along with AChR aggregates in embryonic NMJs, and in C2C12 myotubes treated with agrin, Fzd9 impaired the AChR clusters compared with controls. In turn, the silencing of Fzd9 resulted in an increased number of

AChR clusters. Based on these findings and previous reports, we hypothesized that “Fzd9 promotes the maturation of the postsynaptic apparatus at the vertebrate NMJ through a β -catenin dependent Wnt pathway”. Given the similarities of the disaggregating effect of Fzd9 with that of the pathway activated by ACh/Cdk5 in embryonic stages, the secondary hypothesis derived from the main hypothesis is that “the molecular mechanisms activated by the Fzd9 receptor involve the participation of molecular effectors of the ACh/Cdk5 pathway”.

In this thesis, the *in vivo* approach was developed in NMJs of *Levator auris longus* muscle (LAL) where was standardized the endogenous detection, and the analysis of distributed proteins in the pre and postsynaptic components under protein modulation through high-efficiency electroporation of muscle fibers, which were combined with immunofluorescence and muscle neurotransmission studies by intracellular electrophysiological recording of *ex vivo* LAL muscle preparations. The possible AChR disaggregating function of the ACh / Cdk5 pathway was evaluated in postnatal stages by its activation by overexpression of muscle Cdk5, indicating that Cdk5 promotes the fragmentation of the postsynaptic apparatus. In the study of the effectors of Wnt pathway at the NMJ, the postsynaptic morphological changes, and the Excitation-Contraction (E-C) coupling, were analyzed. At the same time, the location of Wnt proteins and their distribution were analyzed by confocal microscopy on innervated, and denervated NMJs by resection of a segment of the facial nerve. The results shown that Fzd9 is distributed along with AChR aggregates during postnatal development by co-locating with the pre

and postsynaptic components of the UNM. Taking into account the postsynaptic localization of Fzd9, we analyzed its possible function through the gain and loss of Fzd9 expression by electroporation. The results indicated that the overexpression of Fzd9 increases the complexity of the postsynaptic apparatus probably by reorganizing the clusters of AChRs. In turn, the silencing of Fzd9 promotes the appearance of fragmented postsynaptic structures. Also, the overexpression of Wnt3a in adult mice induces fragmented morphology, a phenotype similar to the postsynaptic apparatus described in aging. To understand the relevance of the postsynaptic morphological changes in functional terms, intracellular muscle fibers were recorded by presynaptic stimulation of LAL muscle *ex vivo* preparations. After stimulation at high-frequency, we found that overexpression or silencing of Fzd9 did not affect neurotransmitter release from the presynaptic terminal at P21. However, decreased amplitudes of evoked pulses were observed upon Fzd9 expression. Its effect was evidenced analyzing intracellular recording at low frequency observing a marked decrease in the size of evoked and miniature end plate potential upon Fzd9 overexpression. It was correlated with the input membrane resistance, suggesting that the postsynaptic Fzd9 receptor is involved in synaptic transmission. Surprisingly, we found that the Wnt3a-dependent fragmentation of the postsynaptic apparatus correlated with more efficient neuromuscular transmission. Finally, we found that the pre- and post-synaptic ratio on overexpressed and silenced Fzd9 mice failed to align precisely the postsynaptic AChRs by presynaptic terminals, while the overexpressed Wnt3a reduced the juxtaposition of the presynaptic terminal on the

postsynaptic AChRs. Taken together, we conclude that Fzd9 and β -catenin-dependent Wnt pathway effectors could change the postsynaptic organization for the assembly of functional UNMs by modulating the postsynaptic distribution of AChRs clustering.



1.INTRODUCCIÓN

1.1 La UNM de vertebrado.

El establecimiento de contactos entre las neuronas y sus células blanco es esencial para el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Este proceso gradual es coordinado principalmente por moléculas secretadas desde los componentes pre y postsinápticos para la formación, establecimiento, maduración y mantención de las sinapsis [1]. Durante la formación de las sinapsis se produce el ensamblaje entre la maquinaria liberadora de neurotransmisores y el aparato receptor post-sináptico [2]. Estas estructuras especializadas son altamente dinámicas y se encuentran bajo constante reorganización en respuesta a las señales extracelulares, las cuales forman la base para la plasticidad sináptica [3].

Un modelo arquetípico de sinapsis es la Unión Neuromuscular (UNM) de vertebrados, una sinapsis periférica donde el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es liberado desde el terminal presináptico, constituido por el axón motor, y se une a receptores de acetilcolina (AChR) que se encuentran agregados en la membrana de la fibra muscular postsináptica. La sinapsis neuromuscular presenta un alto grado de organización subcelular, además de gran tamaño y fácil accesibilidad experimental, lo que ha permitido el entendimiento de

principios generales de la sinaptogénesis, de la función neurofisiológica y al desarrollo potencial de terapias para desórdenes musculares.

En esta sinapsis un potencial de acción se propaga por el axón hasta alcanzar el terminal presináptico, produciendo la entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje. Esto origina la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática. La ACh liberada al espacio sináptico se une a los receptores nicotínicos del terminal postsináptico, causando la apertura de estos canales iónicos de ACh permeables tanto a sodio como a potasio. El flujo neto de iones en función del gradiente de concentración y gradiente eléctrico, es una corriente transmembrana de sodio hacia el interior del terminal postsináptico. El resultado es una despolarización transitoria en la placa motora, llamado potencial de placa (EPP). La amplitud de la despolarización de la placa terminal es proporcional con la cantidad de neurotransmisor liberado y con el número de AChRs activados. El potencial de placa generado en condiciones normales es suficiente para provocar la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje, generando un potencial de acción que desencadena los eventos que producen la contracción muscular (Esquema 1).

Diversos fármacos y toxinas han sido ensayados para bloquear la contracción muscular. La D-tubocuranina es un alcaloide procedente de la planta *Chondrodendron tomentosum*, y es antagonista de los receptores nicotínicos que bloquea la unión de la ACh a su receptor. La α -bungarotoxina (α -BTX), uno de los componentes derivados del veneno de

la serpiente *Bungarus multicinctus* es un antagonista competitivo que se une cuasi irreversible a los AChRs impidiendo la unión de ACh. Un péptido neurotóxico ampliamente utilizado que procede de los caracoles marinos del género *Conus* es μ -conotoxina. Su acción inhibitoria es sobre los canales de sodio musculares dependientes de voltaje, lo que impide que se produzca el potencial de acción muscular, sin afectar la generación del potencial de acción en la fibra nerviosa, y permitiendo que la ACh se una a los AChRs postsinápticos para que se produzca el potencial de placa. Estas moléculas han permitido profundizar en la comprensión de la función sináptica y la descripción de desórdenes musculares mediante el estudio de registros electrofisiológicos. Sin embargo, se conocen escasos antecedentes concernientes a los determinantes moleculares que comandan el desarrollo post-natal de esta sinapsis y que conducen a su maduración y mantención. En esta línea, hemos profundizado acerca de los efectores moleculares que median la maduración de la UNM utilizando como modelo de estudio la UNM de vertebrados.

En la UNM madura, la transmisión sináptica nace de un estímulo presináptico (potencial de acción) que depolariza el terminal permitiendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. La entrada de calcio extracelular promueve la liberación del neurotransmisor ACh. El neurotransmisor se une a los AChRs cambiando la permeabilidad iónica de la célula muscular y con ello, el potencial de membrana postsináptico, lo que producirá un potencial de placa por la entrada de sodio y, finalmente, un potencial de acción. Mediante el bloqueo de la contracción muscular por la inhibición de los canales

de sodio dependientes de voltaje con la toxina μ -conotoxina, se ha estudiado los potenciales de placa (EPPs) en la maduración de la UNM. En comparación a la etapa adulta, los EPPs observados al inicio del nacimiento presentan una menor amplitud, son lentos en la fase ascendente y con un aumentado período que le toma al cambio de voltaje alcanzar su valor final. En el esquema 1 se muestran trazos representativos de EPPs en la fase de desarrollo postnatal (Modificado de Shi [4]; Bewick [5]; Fisiología Celular de Nervio y Músculo, 4° edición 2003).

1.2 Las células de Schwann perisinápticas controlan la estabilidad sináptica.

Durante el desarrollo embrionario, las células gliales asociadas a la sinapsis neuromuscular que son originadas desde las células de las crestas neurales se llaman células de Schwann (CS). En ratón, la generación de sus precursores toma lugar en E12-13, que se desarrollan a CSs inmaduras a E13-15 y que persisten hasta el nacimiento [6]. Durante el desarrollo postnatal, las CSs inmaduras se diferencian en dos poblaciones con funciones distintas, las células de Schwann extrasinápticas que mielinizan el axón de la motoneurona y las células de Schwann perisinápticas (CSPs) o terminales que cubren la UNM extendiendo procesos en lugar de envolver la porción del axón terminal. Ambas poblaciones viajan junto al axón motor y su crecimiento está regulado por el crecimiento axonal [7] así como por factores derivados del músculo como neurotrofina-3 que determina el número de CSPs [8]. Una vez que las células CSs contactan las fibras

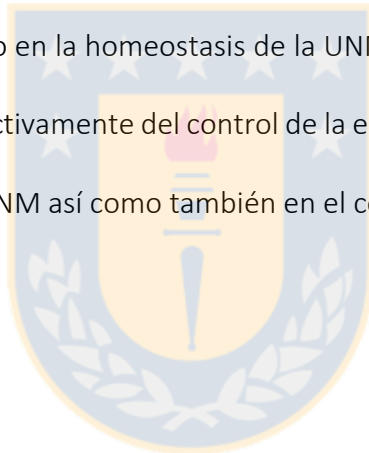
musculares, las CSPs difieren de las CS mielinizantes en su (a) ubicación física, rodeando la sinapsis, (b) función, las CSPs proporcionan apoyo al control sináptico además de carecer de mielina, y (c) diferenciación en la expresión de genes, ya que exhiben cantidades elevadas de la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) y S100, en comparación con CSs mielinizantes [7]. Las CSPs desempeñan una función importante en la formación y mantenimiento de la UNM. La señalización de neuroregulina-2 activa la transcripción muscular de AChRs en los mionúcleos subsinápticos [9], lo que es necesario para iniciar los cambios en la expresión genética en la fibra muscular para establecer la UNM. Además, se ha demostrado que las CSPs son fundamentales para la sustentabilidad de la función de la UNM, dado que la pérdida de CSPs en sinapsis maduras conlleva a su disrupción [10]. Estudios iniciales indican que en reinervación de nervios dañados, las CSPs eliminan los deshechos de los terminales nerviosos [11] y promueven la regeneración extendiendo procesos que guían al axón motor regenerado nuevamente al terminal postsináptico y formando puentes entre UNM inervadas y denervadas en condiciones de denervación parcial [12-16].

También ha sido mostrada una función moduladora de la actividad neuronal y plasticidad sináptica a través de la liberación de moléculas neuroactivas llamadas gliotransmisores [17]. Esto se produce dado que las CSs podrían ser activadas por estímulos de frecuencias distintos [18], detectando las diferencias en la actividad sináptica en curso y decodificándolas para proporcionar una retroalimentación específica a la sinapsis. Se ha mostrado que las CSPs pueden inducir una disminución en la actividad sináptica en

respuesta a la liberación de ACh inducida a través de los receptores muscarínicos de ACh y adenosina A₁ expresados en la membrana de las CSPs [19-22]. Estas señales mediadas por el Ca²⁺ de la glia resulta en la activación diferencial de la potenciación sináptica a través de receptores de adenosina A_{2A} y depresión sináptica por los receptores de adenosina A₁, ambos presinápticos [23], proporcionando un nivel crítico en la modulación del balance de la potenciación y depresión que influyen la transmisión sináptica.

Adicionalmente, la evidencia ha mostrado otro complejo mecanismo de depresión sináptica que involucra a las células musculares, donde una transiente de Ca²⁺ liberado desde el almacenamiento interno en las CSPs, generado por receptores purinérgicos o muscarínicos, induce la liberación de glutamato desde las CSs, lo cual activa receptores metabotrópicos sobre la membrana muscular postsináptica [24]. La activación de los receptores estimula la síntesis de óxido nítrico (ON) en el músculo. El ON difunde al terminal del axón motor y causa la depresión de la liberación de neurotransmisor [25]. En contraposición, en la potenciación de la liberación del neurotransmisor se ha propuesto que las prostaglandinas producidas por las CSs actúan directamente sobre el axón terminal presináptico [26]. En un modo más reciente, se ha descrito que un posible mecanismo involucra ACh y la expresión diferencial de distintas isoformas de AChEs. AChE se encuentra en la lámina basal y también agregada a través del anclaje por colágeno Q en las hendiduras sinápticas, evitando la repetitiva activación de los AChRs postsinápticos del músculo, mientras que butiril-colinesterasa (BChE) es anclado a las CSPs a través de un anclaje a la membrana enriquecido en prolinas. Cuando BChE es inhibida en forma

específica, la liberación del neurotransmisor ACh fue deprimida en forma significativa a través de la activación de AChRs $\alpha 7$ nicotínicos localizados sobre las CSPs que fueron activadas por el excedente de ACh. Cuando ambas isoformas de AChE y BChE fueron inhibidas, el excedente de neurotransmisor incrementó e indujo una importante reducción de la liberación de ACh que comprometió la contracción muscular gatillada por la estimulación presináptica. Esto indica que los AChRs $\alpha 7$ nicotínicos en las CSPs podrían actuar como un sensor para el exceso de ACh ajustado por BChE y podría representar un modulador extrasináptico en la homeostasis de la UNM [27]. Estos antecedentes indican que las CSPs participan activamente del control de la estabilidad sináptica en el desarrollo y mantenimiento de la UNM así como también en el control de la plasticidad sináptica.



1.3 Formación de la UNM.

La coordinada estructura de la UNM sugiere la participación de señales que estimulan e inhiben el ensamblaje de sus componentes, asegurando su correcta formación [1]. La formación de agregados de alta densidad del AChR es un marcador temprano y preciso de diferenciación del aparato postsináptico de la UNM [28]. Se ha descrito que en músculo embrionario de ratón, durante los estadios E12,5-E13,5 en ausencia del componente neural, el AChR es acumulado en la región media de las fibras musculares [29]. Este

“patrón previo” de agregación del AChR sirve de guía para el posicionamiento del axón motor [30, 31]. La formación de agregados del AChR aneurales así como los innervados está mediada por el receptor tirosina quinasa específico de músculo (MuSK) [32]. Una vez que la motoneurona alcanza la fibra muscular, ACh, que es liberada desde el terminal presináptico, produce la dispersión de agregados del AChR localizados en la membrana muscular, con excepción de los que se encuentran en la zona sináptica, en aposición con el aparato presináptico [33-36]. En esta región sináptica, el proteoglicán agrina, también secretado por el componente presináptico, se une directamente al receptor de lipoproteína de baja densidad Lrp4 formando un complejo con MuSK que señala en favor de la estabilización de los agregados de AChR en la membrana muscular [37-41]. Intracelularmente, la activación de MuSK recluta a un conjunto de moléculas efectoras como rapsina [42], que interacciona con el AChR mediante moléculas como HSP90 [43], α -actina [44] y calpaína [45], estabilizando los agregados de AChR. Río abajo de MuSK, proteínas de la familia de quinasas Src (SFK) fosforilan la subunidad β del AChR en respuesta a agrina, facilitando el anclaje, estabilización y mantenimiento de los agregados del AChR en la densidad postsináptica [46, 47]. Así mismo, la activación de la vía agrina/Lrp4/MuSK recluta a la proteína adaptadora Dok7 [48], que se une a la proteína Tumorous imaginal discs 1 (Tid1) [49]. En apoyo a una función crucial de estas proteínas, se ha descrito que ratones deficientes para MuSK, rapsina, LRP4 o Dok7 muestran una completa ausencia de estructuras postsinápticas de la UNM [38, 48, 50, 51]. Aun cuando ratones nulos para agrina presentan agregados del AChR en etapas aneurales y una

ensanchada banda de distribución de AChRs en músculo diafragma, estos desaparecen más tarde, lo que sugiere que esta proteína controla la mantención de estos agregados [33]. De esta manera, la motoneurona secreta señales positivas y negativas para la agregación del AChR a través de receptores transmembrana localizados en el sarcolema de la fibra muscular, promoviendo así el desarrollo de estructuras postsinápticas para la formación de la UNM.

1.4 Maduración de la UNM.

Los cambios estructurales que se originan durante la formación de la UNM, tanto en el desarrollo pre como post-natal, culminan en la consolidación de sinapsis funcionales que regulan la contracción muscular. En un modo particular, el proceso de maduración de la UNM ocurre durante las primeras semanas postnatales y, a medida que transcurre, la estabilidad de la sinapsis neuromuscular se ve incrementada persistiendo a lo largo de la adultez [1, 28]. Aun cuando la organización molecular subyacente al proceso de maduración de la UNM queda de manifiesto principalmente en la redistribución de los agregados del AChR en la membrana postináptica [1, 52], este proceso está acompañado de una reorganización del terminal presináptico [53, 54], así como del espacio sináptico [55] y de las células de Schwann [56]. De este modo, **todos los componentes moleculares de la sinapsis neuromuscular se reorganizan para configurar una sinapsis madura.**

1.4.1 Maduración del terminal presináptico.

En un orden temporal de los cambios que consolidan UNMs de vertebrado funcionales, desde etapas tempranas del desarrollo de la fibra muscular [57, 58], los paquetes de nervio penetran a las masas musculares en estadio E13,5, contactando células musculares en estadio E14,5 al mismo tiempo que las fibras musculares se fusionan [57, 59-61]. Posteriormente, uno de los primeros acontecimientos observados durante la maduración postnatal de la UNM es la eliminación de la poli-inervación de aparatos postsinápticos por más de un terminal motor mediante la retracción de axones que culmina alrededor de P18 con el contacto sináptico de un axón motor por fibra muscular [62, 63]. Estos cambios se ven reflejados en un aumento de la amplitud de potenciales de placa evocados (EPPs) [64]. La mielinización de axones motores comienza a detectarse en P4 [65] e incrementa sobre la segunda semana postnatal hasta la adultez [59]. En UNMs de músculo LAL, las zonas de liberación de neurotransmisor conocidas como zonas activas (ZA) de cada terminal presináptico, incrementan desde un promedio de 75 AZ en P2 para alcanzar las 210 ZA en P6 y finalmente, un número de 850 AZ en etapas adultas. Al mismo tiempo, el área postsináptica crece alrededor de 3,5 veces [66]. En esta etapa y hasta alcanzar la adultez, el grupo de vesículas listo para ser liberado (RRP) incrementa al menos 2 veces al igual que las ZA, mientras que el contenido cuantal aumenta aproximadamente 4 veces [66]. Una considerable facilitación sináptica (liberación de mayores cantidades de neurotransmisor debido a una entrada creciente de Ca^{2+} al terminal presináptico) en la liberación del neurotransmisor ACh se observa al inicio de la neonatalidad, que cambia

gradualmente en el desarrollo postnatal, lo que conlleva a que la depresión sináptica o agotamiento de un grupo de vesículas listas para ser liberadas, corresponda a la observada en etapas adultas [67, 68].

1.4.2 Maduración del terminal postsináptico.

Desde el nacimiento y hasta alcanzar la forma madura de la UNM de vertebrado, se desarrolla una serie de eventos que implican modificaciones importantes en el componente postsináptico y que, al igual que en el desarrollo embrionario, señales positivas y negativas para la agregación del AChR que regulan la formación de la sinapsis neuromuscular [69, 70], podrían promover su maduración. En la fase terminal del desarrollo embrionario, el número de AChRs en la membrana muscular aumenta y se distribuye en agregados de densidad uniforme con forma de placa ovoide [28, 71]. Durante el desarrollo postnatal, las placas bien delimitadas son transformadas en elaboradas formas tipo “pretzel” [59, 72]. Estas estructuras postsinápticas incrementan su tamaño conforme crece la fibra muscular y además adquieren múltiples perforaciones (espacios de sarcolema con baja densidad de AChRs donde éstos no son estabilizados) y ramificaciones que se generan de la aparición de regiones carentes de agregados del AChR [59, 72]. **En estas regiones es donde se cree que señales negativas para la agregación del AChR cumplen una función fundamental en la maduración de la UNM de vertebrados.** En modelos *in vivo* e *in vitro*, la cuantificación de las distintas estructuras morfológicas del

aparato postsináptico que coexisten en la transición placa a pretzel han sido utilizadas para seguir el curso de la maduración de la UNM así como la función de distintas proteínas implicadas en este proceso [4, 52, 72-75]. La redistribución de los agregados del AChR está acompañada de cambios en la organización topológica de la membrana postsináptica que a PO es relativamente plana [28], pero que penetra en la zona de contacto con el axón motor y comienzan a formarse invaginaciones de membrana llamados "pliegues de unión" [1, 28]. Esta estructuración presenta subdominios que sirven de plataforma para la organización espacial diferencial de receptores y proteínas asociadas a la membrana [76-79]. Como resultado, las proteínas postsinápticas alcanzan distintos destinos en la membrana muscular; así, los AChRs se agregan en alta densidad en las cimas de los pliegues de unión, mientras otras proteínas, como distintas formas de la acetilcolinesterasa encargadas de la hidrólisis del neurotransmisor ACh, o los canales de sodio dependientes de voltaje, se localizan en los valles de dichas estructuras [80]. Junto con la reorganización de los agregados de AChRs en la membrana muscular, hasta la segunda semana postnatal el AChR presenta una estructura con una configuración molecular de subunidades $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Posteriormente, la subunidad γ es reemplazada por la subunidad ϵ ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$) favoreciendo la conductancia (facilidad de un ión para cruzar la membrana a través de canales) al ión Ca^{2+} [81, 82]. La vida media de AChRs sinápticos se ve incrementada con la maduración de la UNM contribuyendo a ello tanto la inserción de nuevos AChRs como el reciclaje de AChRs internalizados [83, 84]. Estos procesos están mediados por señales que resultan en la transcripción de genes de proteínas

postsinápticas específicamente por parte de los núcleos subsinápticos de la fibra muscular, ubicados en directa aposición con el terminal motor [85-87].

El comportamiento funcional de la UNM se correlaciona con la estructuración de los componentes pre y post-sinápticos. En ratas, ha sido descrito que en miofibras de músculo diafragma de estadio embrionario E15 no se observa actividad eléctrica espontánea (mEPP) [57, 88], pero posterior a ese estadio ha sido posible medir mediante la estimulación del nervio frénico, potenciales de acción y contracción muscular en músculo diafragma de ratas y ratones [57, 61, 88, 89]. Sin embargo, los tiempos de subida y decaimiento, definidos como el intervalo entre el comienzo mismo de la fase ascendente y el pico de la señal, y el intervalo entre el pico y el 90 % de la fase de decaimiento, respectivamente, son lentos y prolongados debido a la acción de la ACh [88], pues la enzima acetilcolinesterasa que hidroliza ACh, alcanza los niveles de adultez sobre P20 [90, 91]. Además, se observa una alta frecuencia y gran amplitud de mEPPs que disminuyen progresivamente hasta las 12 semanas postnatales [5, 57, 92, 93]

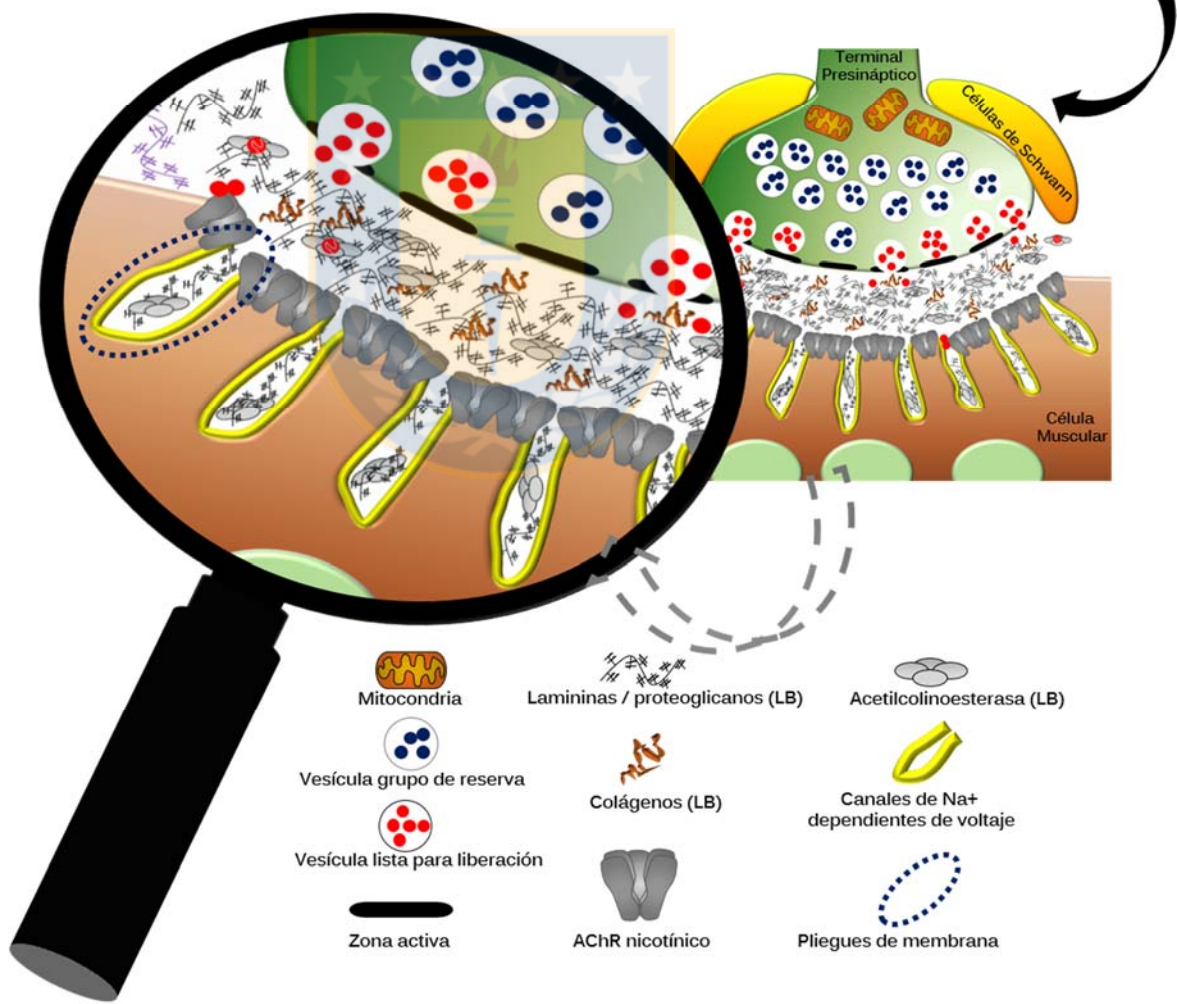
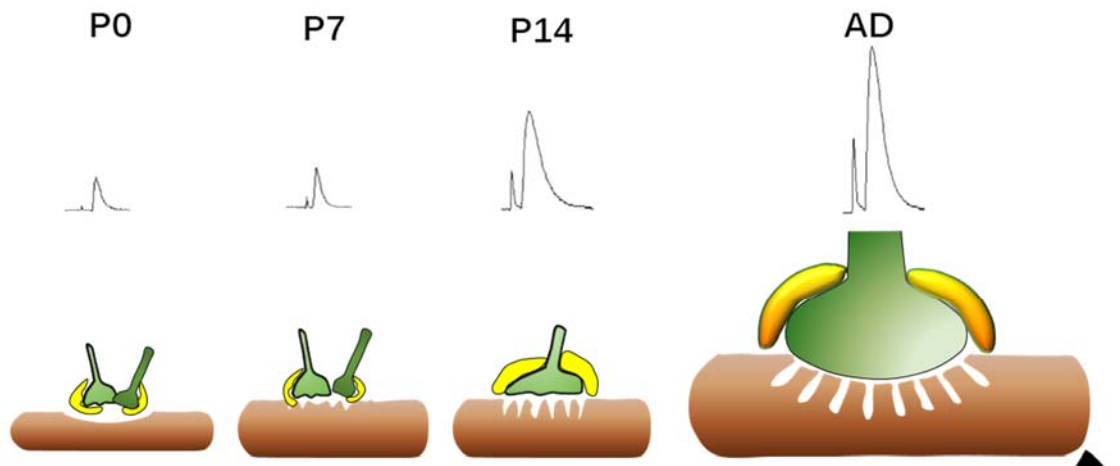
Los registros intracelulares en E17 muestran un potencial de membrana de reposo o diferencia de potencial entre el interior y exterior de la miofibra en función de la distribución de iones de -30 ó -40 mV. Sin embargo, las miofibras incrementan rápidamente en tamaño hasta el primer día postnatal y los potenciales de membrana en reposo alcanzan -80 a -90 mV. En forma paralela al mismo período de tiempo, incrementa el porcentaje de fibras musculares con EPPs de tiempos de subida rápidos [5, 57, 92, 93].

Estos cambios conducen en última instancia a una elevada velocidad y alta precisión del acoplamiento sináptico de las sinapsis maduras que contribuyen a la demanda funcional de cada sinapsis [66].

El remodelamiento de la UNM es un proceso que ocurre durante toda la vida. Una pérdida gradual de masa muscular, una disminución en el número de motoneuronas, la aparición de fenotipos de denervación y la disminución de unidades motoras contribuyen a la progresión del envejecimiento neuromuscular [94, 95]. Los cambios morfológicos en UNMs envejecidas (24 meses) varían dependiendo del músculo y están relacionados a los niveles de actividad muscular [94, 96] pero en general, músculos rostrales muestran menores cambios asociados al envejecimiento que músculos caudales [94]. Ha sido descrito que un aumento en la fragmentación y tamaño del aparato postsináptico, una disminución en la densidad de AChRs desde el sarcolema, un aumento en la denervación y de los brotes del axón terminal presináptico, así como una denervación parcial por el adelgazamiento del preterminal y/o la porción del axón terminal, además de un aumento de inervación múltiple contribuyen a los mecanismos asociados con los cambios funcionales neurofisiológicos del envejecimiento de la UNM [94-108]. Existe una correlación de los cambios estructurales del terminal neuromuscular con la capacidad funcional presente en etapas de vejez [109, 110]. Previamente ha sido descrito que músculos EDL, sóleo y gastrocnemio de animales de 29-33 meses presentan un incremento en la resistencia de entrada de membrana (cambio de voltaje a través de la

membrana generado por una corriente que es igual al valor de la corriente multiplicado por la resistencia) [109]. En los mismos estadios se observó que en músculo diafragma, los potenciales de placa motora espontáneos incrementan su amplitud en un 54%. Por otra parte, en animales de 29-35 meses se ha observado un incremento en la amplitud de EPPs cercano al 100% para los músculos EDL y sóleo, mientras que no se observaron cambios en este parámetro para el músculo diafragma. Estos antecedentes son consistentes con que recientemente fue reportado que la fragmentación del aparato postsináptico relacionada al envejecimiento no se encuentra asociada al deterioro de la transmisión neuromuscular [110]. Por lo tanto, aun cuando se ha sugerido que la remodelación tipo fragmentación del aparato postsináptico está asociada con un deterioro de la transmisión neuromuscular, pudiendo contribuir a la debilidad muscular relacionada al envejecimiento, la fragmentación como tal no es un indicador de afección neuromuscular.

Esta multiplicidad de cambios que contribuyen a la maduración, mantenimiento y envejecimiento de la UNM realza la importancia acerca del estudio de los mecanismos moleculares que regulan la coordinación temporal y espacial de estos eventos.



Esquema 1 Esquema general de la maduración postnatal y estructuración morfológica y funcional de la UNM de vertebrado

A medida que la etapa de maduración de la UNM progresa ocurre la eliminación de la poli-inervación (P0 - P18). En paralelo, el sarcolema del componente postsináptico forma una cuneta (pliegue primario) (P0 - P7), que continua invaginándose para formar los pliegues secundarios (pliegues de unión) (P7 - P14) determinantes en la eficiencia de la transmisión neuromuscular. Los AChRs (gris) comienzan a enriquecerse en las crestas de los pliegues de unión (P0 - AD), cercanos a las zonas activas (líneas negras) o sitios de liberación de vesículas con ACh (puntos rojos y azules) de los contingentes de vesículas listas para ser liberadas (círculos con puntos rojos) y de reserva (círculos con puntos azules) desde el terminal presináptico, mientras que los canales de Na^+ dependientes de voltaje se concentran en los valles de los pliegues de unión (amarillo). Las moléculas que constituyen la lámina basal sináptica (LB) también están segregadas. La enzima acetilcolinesterasa se distribuye en la LB y en los valles asociada a la membrana a través de colágeno Q. Lamininas $\alpha 2$, $\alpha 5$ y $\beta 2$ están presentes tanto en la hendidura sináptica como entre los pliegues, mientras que laminina $\alpha 4$ sólo se localiza entre los pliegues. Colágenos tipo XIII y XXV se encuentran asociados a la membrana postsináptica mientras que colágeno tipo IV se encuentra en la LB.

1.5 Constitución molecular en la maduración de la UNM.

1.5.1 Componentes moleculares del terminal presináptico que participan de la maduración de la UNM de vertebrado.

En la UNM inmadura, ha sido descrito cambios en la densidad y distribución de canales iónicos presinápticos, en la propagación de potenciales de acción y en el factor de seguridad (capacidad de la transmisión neuromuscular para ser efectiva en variadas condiciones fisiológicas y de estrés), a lo largo de la conducción de axones inmaduros [111, 112]. En UNMs neonatales la transmisión sináptica evocada por motoneuronas

depende conjuntamente de los canales tipo N y P/Q [113]. Sin embargo, en UNM adultas la liberación del neurotransmisor es mediada por canales de Ca^{2+} tipo P/Q mientras que los canales de calcio tipo L y N participan sólo bajo ciertas condiciones experimentales y patológicas. En PO, las motoneuronas presentan canales de sodio Nav1.1, 1.2 y 1.3 y 1.6 expresados en diferentes niveles de mRNA. Durante la segunda semana postnatal, la expresión de Nav1.1 incrementa junto con el mRNA para Nav1.6. Animales nulos para Nav1.6 pierden el aumento postnatal normal de la densidad de corriente, corriente iónica que atraviesa la membrana en una superficie determinada, indicando que es requerido para la función de motoneuronas maduras [114]. Otro organizador sináptico de la UNM es el precursor del péptido amiloide (APP). Se ha mostrado que APP es acumulado en la UNM [115, 116], siendo importante para el desarrollo pre y postnatal de la sinapsis neuromuscular. En ratones doble mutantes que carecen de APP y la proteína 2 homóloga a APP (APLP2), se observa una menor densidad de ZA y vesículas sinápticas, lo que resulta consistente con una disminución en la frecuencia de mEPPs y fallos sinápticos [117, 118].

1.5.2 Proteínas de la matriz extracelular (MEC) que controlan la maduración de la UNM de vertebrado.

En la reestructuración de los componentes pre y postsinápticos que toman lugar en la maduración de la UNM, la matriz extracelular (MEC) participa en un modo activo. La lámina basal que ocupa el espacio sináptico de la UNM está compuesta principalmente

por proteínas de la MEC como proteoglicanos de heparán sulfato, lamininas y colágenos [119]. Evidencia indirecta sugiere que agrina organiza el ensamblaje postsináptico y promueve los cambios topológicos de los agregados de AChR durante la maduración de la UNM [52]. Las isoformas de lamininas de cadenas $\alpha 4$, $\alpha 5$ y $\beta 2$ se localizan específicamente en la UNM y cumplen importantes funciones en su mantención y organización [120]. Ensayos de delección de genes que codifican para lamininas indican que laminina $\beta 2$ controla la distribución de las zonas activas [121-123], manteniendo así la correcta aposición con los agregados del AChR [54]. Lamininas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ interactúan con las proteínas postsinápticas utrofina y sintrofina $\beta 2$ del complejo distroglicán (CDG), el cual une el citoesqueleto de la fibra muscular con la matriz extracelular en forma especializada [124], pues en regiones extrasinápticas de la miofibra, distrofina, sintrofinas $\alpha 1$ y $\beta 1$ y laminina $\alpha 2$ están presentes en toda la superficie de la fibra muscular [125-127]. Se ha observado que en ratones nulos para α -distrobrevina (α DB), una proteína citoplasmática que forma parte del CDG y es concentrada en la membrana muscular postsináptica, puede formar UNMs, pero el proceso de maduración es anormal [124]. El complejo α DG une agrina para favorecer la estabilidad de los agregados del AChR [128-131] e interactuar con rapsina, requerido para el andamiaje de los AChRs [132, 133]. Por otra parte, existe evidencia que ha mostrado que colágenos son organizadores de la actividad sináptica. Específicamente, Colágeno IV es requerido para la mantención del terminal presináptico adulto [121], mientras que colágeno XIII, una proteína

transmembrana postsináptica, regula la maduración topológica de los agregados del AChR, afectando la aposición pre y postsináptica y la localización de las células de Schwann [134]. Por su parte, en fases iniciales de inervación motora intramuscular Colágeno XXV CLAC-P (*Col25a1*), que presenta una alta homología con colágeno XIII, es requerido para que las motoneuronas contacten células musculares durante el desarrollo, promoviendo la formación de la UNM [135].

1.5.3 Constituyentes moleculares involucrados en la maduración del aparato postsináptico.

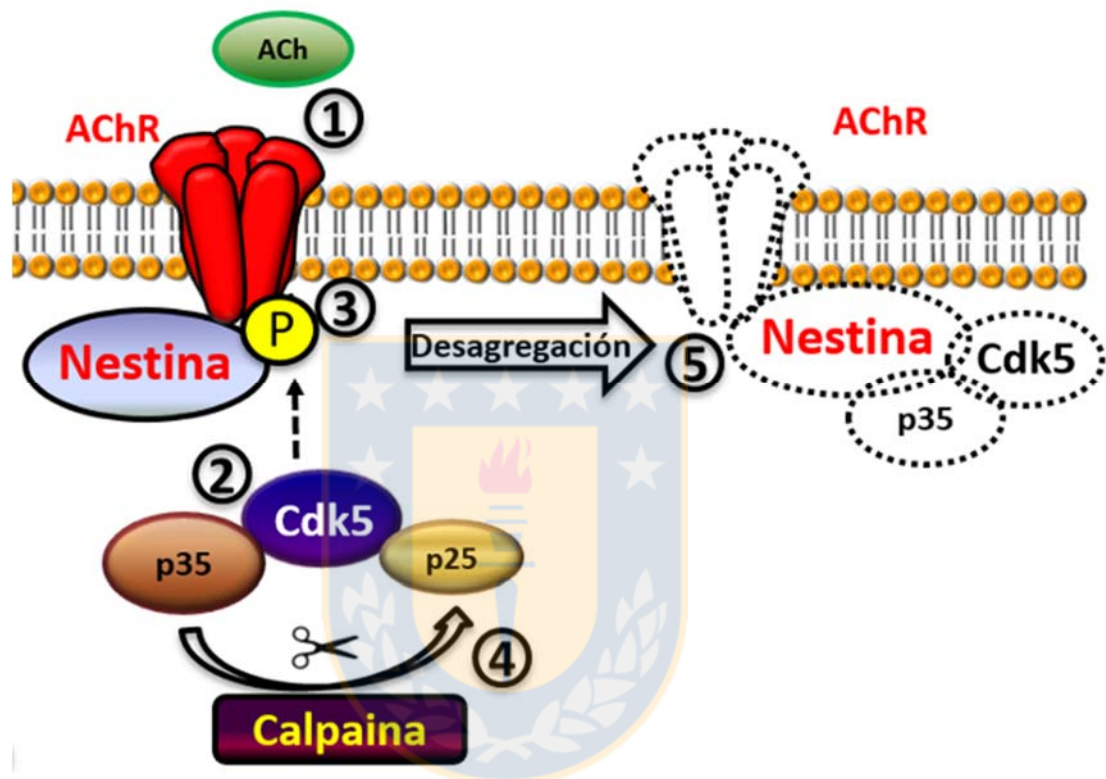
Existe relativamente poca evidencia respecto a los mecanismos moleculares que median la progresiva formación de zonas carentes de AChRs durante la maduración del aparato postsináptico la UNM. Por ejemplo, aun cuando se ha descrito que proteína quinasa C (PKC) muscular induce la desagregación del AChR, participando de la transición placa a pretzel, esta señalización es más bien requerida para la retracción de axones durante el paso de eliminación sináptica [73]. Por otra parte, existe evidencia respecto a que la agregación del AChR es controlada por la dinámica local del citoesqueleto asociado a la membrana postsináptica [136, 137]. A este respecto, se ha descrito que los AChRs que son incorporados a zonas de baja densidad no son estabilizados [83, 84] sino que son rápidamente internalizados y redistribuidos en las ramas de alta densidad de estos agregados [136]. En las zonas carentes de agregados del AChR también existe una mayor

concentración de actina polimerizada (F-actina), lo que está regulado por ADF/cofilina [136]. Más aún, en dichas regiones se encuentran proteínas asociadas a podosomas, organelos ricos en actina y proteínas de anclaje capaces de remodelar la matriz extracelular y promover la maduración del aparato postsináptico a través de cambios topológicos en la agregación del AChR [138]. Una de las proteínas asociadas a podosomas es LL5 β y tiene por función delimitar las zonas de alta densidad del AChR [74]. Por otra parte, se ha reportado que ratones nulos para efexina-1, un factor intercambiador de guanina (GEF) de la familia GTPasa RhoA, que regula la dinámica de actina, muestran una formación embrionaria normal de la UNM; sin embargo, la transición placa a pretzel y el desarrollo de los pliegues de membrana se observan desorganizados [75]. Efexina-1 desestabiliza la agregación del AChR a través de RhoA, evento importante para la pérdida de AChRs en las zonas carentes de este receptor en la UNM [75]. De forma interesante, otra de las proteínas que se encuentra en estas regiones carentes de agregados del AChR es la proteína de filamentos intermedios nestina [139], que tiene una importante participación en la desagregación de los AChR durante los estadios embrionarios.

En el contexto del desarrollo embrionario de la UNM, la señal negativa para la agregación del AChR analizada con mayor detalle es el neurotransmisor ACh (Esquema 2). Embriones de ratones carentes en acetiltransferasa de colina (AChT), enzima única para la síntesis de ACh, presentan un incremento en el número y en la amplitud de la banda donde se localizan los agregados del AChR inervados [33]. En concordancia con estos resultados, en

cultivos de miotubos tratados con carbacol (CCh), un agonista no hidrolizable de ACh, los agregados del AChR inducidos con agrina son dispersados [33, 35]. De forma interesante, ratones doble mutantes para AChT/agrina rescatan la inhibición de agregados de AChR observados en mutantes para agrina en la etapa tardía de ensamble de la UNM [35]. ACh actúa activando río abajo a la quinasa dependiente de ciclina-5 (Cdk5) [45, 140]. Ratones nulos para Cdk5 presentan defectos morfológicos en los terminales pre y postsinápticos y, al igual que los mutantes de AChT, una banda central más amplia de agregados del AChR que los animales control [141]. Se ha descrito que Cdk5 inactivo se asocia con filamentos intermedios de nestina en un estado no fosforilado en la membrana postsináptica [140]. Ante la estimulación de ACh, nestina recluta a p35, un activador de Cdk5, lo que resulta en la fosforilación de nestina generando la pérdida de estabilidad y consecuente disociación del complejo desde la membrana postsináptica para su degradación [140]. Como resultado, la forma activa de Cdk5 y p35 se disocian y su disponibilidad incrementa la desagregación de un mayor número de AChRs. En forma adicional, la exposición de miotubos a carbacol promueve la activación de la calpaína dependiente de Ca^{2+} , la que escinde a la proteína p35 para generar p25, que se ha descrito como un activador de Cdk5 aún más potente que p35 [45]. Consistente con el modelo, en miotubos obtenidos desde ratones nulos para Cdk5, o bien bajo el silenciamiento mediante un siARN contra Cdk5, se induce un mayor número y tamaño de agregados del AChR bajo tratamientos con agrina respecto del control [141]. Estos antecedentes describen una importante función de esta vía de señalización en el desarrollo de la UNM regulando el tamaño de los agregados del

AChR desde su formación o estabilización y cuya contribución durante la maduración de la sinapsis neuromuscular en etapas postnatales no ha sido analizada.



Esquema 2 Activación de la vía de señalización ACh/Cdk5 en etapa embrionaria de la UNM de vertebrado.

ACh se une a receptores de acetilcolina (1) incrementando los niveles de Ca^{2+} intracelular que activan la proteína calpaina (2) para activar Cdk5 (3) y escindir el efector p35 en una forma corta p25 (4). Ambos efectores activan a Cdk5 (5) que fosforila a la proteína de filamentos intermedios nestina para inducir la desestabilización y pérdida de los AChRs desde la membrana.

Los antecedentes expuestos muestran la existencia de efectores intracelulares que inhiben la agregación de AChRs. Sin embargo, poco se sabe de las señales organizadoras que cumplen una función instructiva y que podrían gatillar este proceso en la maduración

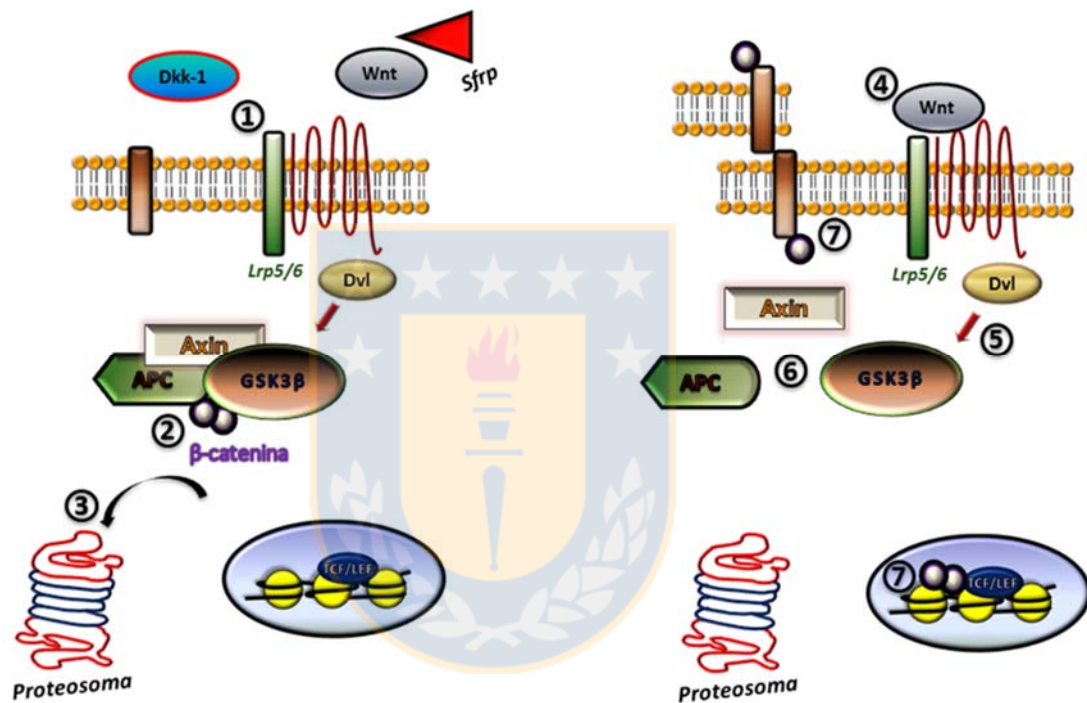
de la UNM. Al respecto, si bien efexina-1 es activado por ligandos Efrina en varios contextos celulares [142, 143], esto no se ha mostrado directamente en la UNM madura. Por otra parte, aun cuando efectores de la vía ACh/Cdk5, como nestina, se localizan en regiones carentes de AChR en sinapsis maduras [139], en este contexto la ACh liberada en la sinapsis es rápidamente degradada en el espacio sináptico por acción de la acetilcolinesterasa [144], lo que hace improbable que esta sea la señal desencadenante de la vía. Así, **esta tesis se enmarcó en la identificación de señales que inducen la desagregación del AChR en el contexto de la maduración de la UNM.** Al respecto, evidencia obtenida en los últimos años relacionada a la formación embrionaria de la UNM, incluyendo datos de nuestro laboratorio, nos permitieron orientar este trabajo de tesis hacia la mirada general donde **vías de señalización gatilladas por ligandos Wnt podrían regular el proceso de maduración de la UNM *in vivo*.**

1.6 Señalización Wnt.

Los genes *Wnt* codifican para miembros de una familia de proteínas secretadas que han sido descritas en distintas especies. En humanos, se han identificado 19 proteínas Wnt y se sabe que comparten un 27 a 83% de identidad en su secuencia de aminoácidos, teniendo además un patrón conservado de 23 ó 24 residuos de cisteína [145]. Durante el desarrollo embrionario, las proteínas Wnt cumplen diversas funciones que gobiernan el destino celular mediados a través de la posible unión a uno de los 10 receptores Frizzled

(Fzd) [146], y la subsecuente activación de la proteína Dishevelled (Dvl) que puede continuar la señalización intracelular a través de, al menos, tres posibles vías: la vía canónica, donde β -catenina activa genes blanco a nivel nuclear, la vía de polaridad celular planar que involucra c-Jun quinasa (JNK) y reordenamientos de citoesqueleto [147] y la vía Wnt/Ca²⁺ que regula señales de destino y movimiento celular durante el desarrollo [148, 149]. Los receptores de superficie Fzd poseen un dominio N-terminal rico en cisteínas (CRD), además de siete dominios transmembrana y un corto tallo citoplasmático con un motivo de unión PDZ en el extremo C-terminal [146]. En la vía de señalización canónica Wnt/ β -catenina (Esquema 2) participan los miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad LRP-5 y LRP-6, los que unen ligandos Wnts y actúan como co-receptores, formando un complejo ternario junto a receptores Fzd [150]. En esta vía, la activación de Dvl conduce a la inactivación de la glicógeno sintasa quinasa β (GSK3 β), desorganizando el complejo de degradación de β -catenina conformado, entre otras, por las proteínas β -catenina, axina [151] y APC (Adenomatous Polyposis Coli) [152, 153], resultando en un incremento de los niveles citosólicos de β -catenina seguido de su posterior traslocación al núcleo, donde se asocia a miembros de la familia de factores de transcripción TCF/LEF, para activar la expresión de genes blanco [154]. En ausencia de ligandos Wnt, β -catenina es fosforilada en un complejo multiproteico, con lo cual se gatilla su ubiquitinación y posterior degradación en el proteosoma [155]. Es importante señalar que β -catenina tiene dos posibles destinos celulares: una fracción citosólica capaz de

translocar al núcleo como respuesta a la activación de la vía Wnt canónica, y una fracción asociada a la membrana plasmática que media uniones célula-célula y célula-matriz extracelular a través de su unión a diversas proteínas, tales como cadherinas e integrinas, respectivamente [156, 157].



Esquema 3 Activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.

En ausencia de la unión de un ligando Wnt a un receptor Fzd y co-receptor Lrp5/6 (1), β -catenina es secuestrada por el complejo formado por APC, Axina y GSK3 β (2) donde esta última fosforila β -catenina para ser degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma (3). Por otra parte, cuando un ligando Wnt se une a receptor Fzd y su co-receptor (4) se activa la proteína Dvl que inhibe la actividad quinasa de GSK3 β (5) desarmando el complejo de degradación de β -catenina (6) acumulándose y activando la transcripción de genes dependientes de factores TCF/LEF (7), o participando de contactos celulares (7).

La vía Wnt PCP controla la polaridad ortogonal en epitelios, el proceso de gastrulación y la orientación celular [158, 159]. En este caso, Dvl activa a las GTPasas pequeñas RhoA y Rac1, junto a JNK (c-jun amino N-terminal kinase), reorganizando el citoesqueleto de actina y microtúbulos [160, 161]. Por su parte, la vía Wnt/Ca²⁺ induce ventralización embrionaria en *X. laevis* [148] y regula la migración celular en el desarrollo del corazón [162]. En esta vía, la activación de Dvl induce la liberación intracelular de calcio y la activación de la proteína quinasa C (PKC) [163] y de la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII), lo que finalmente activa la transcripción de genes blanco y el movimiento celular a través del factor de transcripción NFAT [164]. Se han reportado otros receptores que señalizan a través de unión a ligandos Wnt como Ryk y Ror2 [165-171]. Además, existen varios inhibidores endógenos de la vía de señalización Wnt. La proteína Dkkopf-1 (Dkk1) se une a Lrp5/6 impidiendo la formación del complejo de membrana ternario Wnt-Fzd-LRP5/6, por lo que inhibe específicamente la vía Wnt/ β -catenina [172]. Por su parte, las formas solubles de receptores Fzd, Sfrps 1-5 descritas en ratón y humano [173] y la proteína WIF (Wnt Inhibitory Factor) [174-176] actúan secuestrando ligandos Wnt, inhibiendo la activación intracelular de las vías Wnt en general. **La diversidad de componentes e interacciones en la vía Wnt determinan las diferentes respuestas celulares controladas por estas vías. Esto hace necesario identificar a los actores moleculares relevantes y su expresión espacio-temporal en cada contexto celular específico.**

1.6.1 Señalización Wnt en la UNM.

En los últimos años, distintos ligandos Wnt y sus receptores Fzd, han emergido como moléculas clave que regulan aspectos de la conectividad neuronal incluyendo la sinaptogénesis [161]. Los primeros antecedentes que indican la participación de ligandos Wnt en sinaptogénesis neuromuscular provienen de organismos invertebrados, donde se ha descrito que modulan en forma positiva y negativa la formación de la UNM. En la formación de sinapsis neuromusculares de *D. melanogaster*, Wingless (Wg) ortólogo de Wnt-1, cumple funciones esenciales para el desarrollo pre y postsináptico. Una función alterada de Wingless afecta la formación de las zonas activas presinápticas y la formación de estructuras postsinápticas [177]. Estos efectos son mediados a través del receptor DFzd2 [178] ubicado en la membrana pre y postsináptica. En el componente presináptico se activa una vía de señalización a través de *Shaggy*, ortólogo de GSK3 β , involucrando un aumento local de β -catenina, mientras que en el aparato postsináptico Wg estimula la endocitosis del complejo Wg/DFzd2 y, en la cercanía del núcleo, el dominio C-terminal de DFzd2 es clivado y translocado al núcleo para, probablemente, regular la actividad transcripcional [178]. En el estudio de los mecanismos que regulan el balance bidireccional de la señalización Wnt en la formación de ambos componentes pre y postsinápticos, se ha mostrado que el proteoglicano de haparán sulfato perlecán/Trol regula la distribución de Wnt/Wg, generando UNMs aberrantes e incrementando la vía canónica

Wnt/Wg en la presinapsis, mientras que la vía postsináptica de importación nuclear de un fragmento del receptor Fzd/Dfzd (INF) fue suprimida [179]. Junto con participar del ensamblaje pre y postsináptico de la UNM de *D. melanogaster*, se ha mostrado que los ligandos Wnt/Wg son localmente secretados por células gliales para regular en forma específica la agregación postsináptica de los receptores de glutamato y la función sináptica [180]. Esto muestra a Wg y los receptores Fzd como una señal positiva para el desarrollo pre y postsináptico en *D. melanogaster*. Por su parte, en *C. elegans*, la motoneurona DA9 extiende su axón en forma longitudinal a lo largo del cordón espinal dorsal formando sinapsis con los músculos dorsales del nemátodo. La zona proximal del axón carece de UNMs por lo cual es conocida como subdominio asináptico. En esta región, Wnt/Lin-44 restringe la expresión de Fzd/Lin-17 al subdominio asináptico en la zona posterior y actúa como una señal repulsora para inhibir la formación de sinapsis prematuras [181]. Consistentemente, mutantes de *C. elegans* carentes de Wnt/Lin-44 y Fzd/Lin-17 desarrollan sinapsis ectópicas en el subdominio asináptico [181]. Así, en organismos invertebrados, los ligandos Wnt ejercen funciones pro y antisinaptogénicas. De forma interesante, **ambos efectos son mediados por receptores Fzd, los que presentan una expresión espacial y temporal acorde con su función en este proceso.**

En vertebrados, las primeras evidencias de la participación de la señalización Wnt en la sinaptogénesis neuromuscular provinieron de estudios de efectores de las vías, tales como Dvl [182], APC [183] y β -catenina [184]. Ensayos de pérdida de función de los tres

genes que codifican para Dvl inhiben la agregación del AChR inducida por agrina en cultivos de miotubos [182]. Dvl interacciona con MuSK, activando a la proteína quinasa efectora de GTPasas pequeñas PAK [182]. Consistentemente, músculos diafragma de ratones nulos para Dvl en estadio E18,5 presentan una distribución anormal de los agregados del AChR en la banda central [185]. Por otra parte, se ha encontrado que APC colocaliza con agregados del AChR en la UNM madura y que la disrupción de la interacción entre APC y el AChR disminuye la capacidad de agrina para inducir agregados del AChR [183]. La posible función de β -catenina sobre la agregación del AChR ha sido más bien controversial. Por una parte, se ha mostrado que en miotubos donde se ha silenciado la expresión de β -catenina, así como frente a una disrupción de su interacción con α -catenina, la agregación del AChR se ve inhibida [184]. En contraposición, experimentos en miotubos por sobreexpresión de β -catenina, así como tratamiento con inhibidores de GSK3 β , como Litio y BIO, que acumulan β -catenina citosólica, inducen la desagregación del AChR dependiente de agrina [185-187]. Reafirmando el concepto de β -catenina como señal desagregante del AChR, la inhibición *in vivo* de la expresión de esta proteína en músculos, pero no en motoneuronas, induce defectos morfológicos y funcionales en la UNM [188]. Los agregados del AChR en estos animales son de mayor tamaño y distribuidos más ampliamente a lo largo de la placa terminal. Adicionalmente, se observan alteraciones en el aparato presináptico, como aumento de la ramificación axonal y disminución de liberación del neurotransmisor [188]. En su conjunto, estas evidencias

sugieren que proteínas efectoras de la señalización Wnt pueden regular positiva y negativamente la agregación del AChR. Más específicamente, ellas indican que **β -catenina muscular puede actuar como señal desagregante de los AChRs.**

Consistente con lo anterior, evidencia creciente indica la posible participación de ligandos Wnt en la diferenciación postsináptica de la UNM de vertebrados. Se ha reportado que la inhibición de la expresión de Wnt11r en embriones de pez cebra genera una pérdida del patrón previo de agregación del AChR en la banda central muscular defectos en la guía del axón hacia el músculo [30]. Wnt11r interactúa directamente con el receptor MuSK/unplugged, que presenta el dominio extracelular CRD de los receptores Fzd de la vía Wnt, y la pérdida de función de Wnt11r presentó defectos similares a los observados en mutantes de este receptor [30]. En seres humanos, la disfunción del dominio CRD de MuSK ha sido asociada a un tipo de miastenia gravis, enfermedad neuromuscular caracterizada por la fatiga y debilidad muscular que producen una neurotransmisión deficiente a causa de la generación de anticuerpos contra MuSK y otros componentes postsinápticos [189]. En mamífero, la pérdida del dominio CRD de MuSK causa importantes defectos en la generación del pre-patrón de agregación de los AChRs y el inicio de la formación de la UNM, así como también afecta la diferenciación sináptica lo que queda de manifiesto por la disminución de AChRs y el crecimiento exacerbado de axones motores sin contactar los terminales postsinápticos [190]. De manera interesante, recientemente se ha reportado que en mamífero, el proceso de formación de la UNM

podría no requerir de la interacción de los ligandos Wnt con MuSK siendo suficiente la activación de MuSK a través de la unión de agrina al co-receptor Lrp4, mientras que en el desarrollo de pez cebra, la activación de MuSK podría no requerir de agrina/Lrp4 sino que de los ligandos Wnts. De esta manera se establece una diferencia evolutiva en la señalización que regula la agregación de AChRs en ambas especies[191]. Sin perjuicio de lo anterior, también ha sido mostrado que la pérdida de función de Wnt4 en células musculares de ratón disminuye el patrón previo de agregación del AChR, mientras que el tratamiento con Wnt4 *in vitro* incrementó la agregación del AChR. Ambos efectos fueron mediados a través de la interacción de Wnt4 con el receptor MuSK [31]. Otros ligandos Wnt, como Wnt9a y Wnt11 igualmente inducen la agregación del AChR en cultivos de células musculares a través de su interacción con este receptor [192]. En forma adicional, recientemente fue reportado que Wnt4 y Wnt11 contribuyen de manera cooperativa a la formación de la UNM de mamífero a través de la activación de las vías Wnt canónica dependiente de β -catenina y PCP, esta última dependiente de la proteína de andamiaje Vangl2, que induce la polarización celular [193]. Estos resultados indican que ligandos Wnt pueden inducir la agregación aneural del AChR involucrando distintas vías de señalización.

En estudios de desarrollo de la UNM en músculos de ala de embriones de pollo, se determinó que fibras musculares expuestas al inhibidor de la señalización Wnt Sfrp1 presentaron una disminución de la agregación del AChR [185], sugiriendo la participación de ligandos Wnt en la diferenciación postsináptica *in vivo*. Consistentemente, cuando

fibras musculares de pollo fueron expuestas al ligando Wnt3, que es secretado por las motoneuronas en estadios de formación de la UNM [194], se produjo un aumento de agregados del AChR *in vivo*, revelando que señales Wnt secretadas por la motoneurona podrían inducir este evento [185]. En miotubos C2C12 se observó que Wnt3 actúa induciendo la formación de microagregados inestables del AChR a través de la activación de la GTPasa pequeña Rac1 [185], que reorganiza el citoesqueleto de actina en varios sistemas [195] y participa de la vía Wnt PCP [196]. Posteriormente, los microagregados del AChR son estabilizados y aumentados en tamaño por agrina a través de la activación de la GTPasa pequeña RhoA [185]. Así, Wnt3 derivado de motoneuronas podría inducir la agregación del AChR por una vía Wnt no canónica. De modo contrario a Wnt3, el ligando Wnt3a que presenta cerca de un 80% de identidad con Wnt3 [197], es expresado en tejido muscular embrionario durante los estadios de formación de la UNM; en miotubos C2C12 el tratamiento con Wnt3a produjo una disminución en el número y tamaño de los agregados del AChR inducidos por agrina [186]. Además, Wnt3a es capaz de dispersar los agregados del AChR inducidos previamente por agrina. Este efecto negativo sobre la agregación del AChR ha sido asociado a un aumento de β -catenina citosólica, sin modificación de la actividad transcripcional TCF/LEF [186]. Así, Wnt3a derivado del músculo podría inhibir la agregación del AChR por una vía dependiente de β -catenina. En conjunto, estos antecedentes sugieren la participación de ligandos Wnt en la formación de la UNM, regulando la agregación del AChR ya sea en forma positiva como negativa. **Sin**

embargo, la función de la vía de señalización Wnt en la maduración de la UNM no ha sido reportada.

1.6.2 El receptor Wnt Fzd9 modula la agregación del AChR.

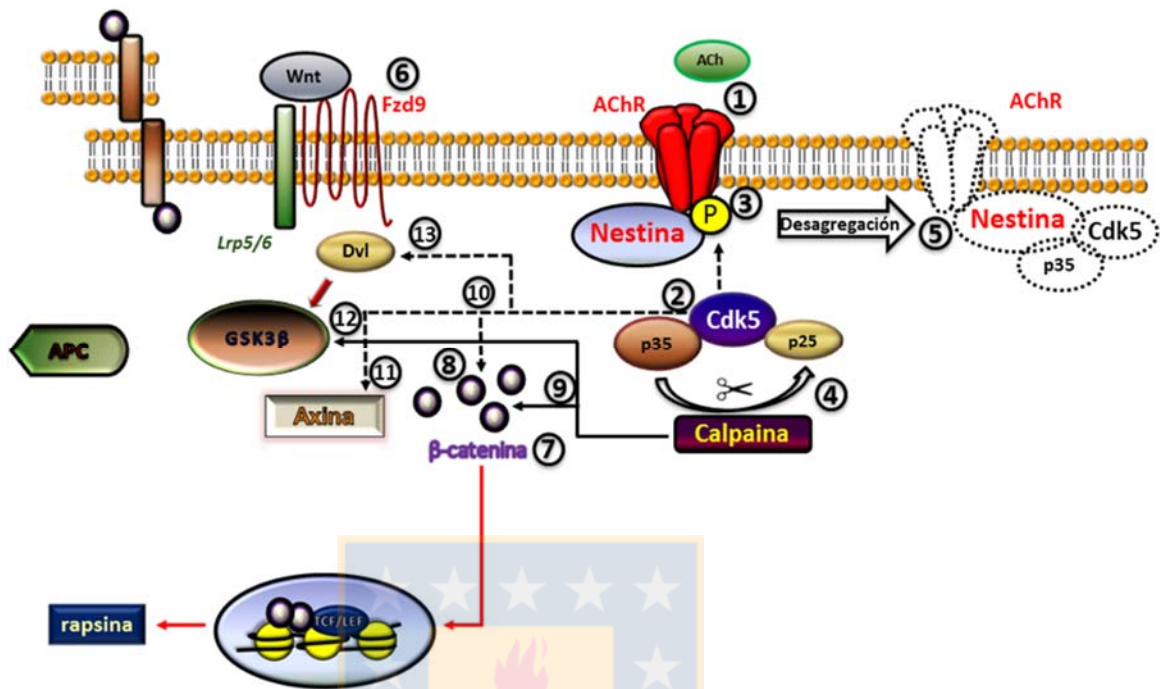
Los antecedentes antes expuestos sugieren que ligandos Wnt podrían regular la dinámica de agregación del AChR a través de su interacción con distintos receptores. Considerando que en las UNMs de invertebrados los ligandos Wnt ejercen funciones pro y antisinaptogénicas a través de receptores Fzd, en nuestro laboratorio hemos abordado la posible función de estos receptores en el contexto de la UNM. A este respecto, estudios previos por microarreglos de mRNA han demostrado que la expresión del receptor Fzd9 se encuentra disminuida en músculos esqueléticos denervados respecto a músculos control, sugiriendo que la expresión del receptor Fzd9 en tejido muscular depende de señales neuronales [198]. De un modo interesante, estudios realizados en nuestro laboratorio en células musculares C2C12, indican que Fzd9 es expresado en músculo esquelético durante la sinaptogénesis de la UNM. A su vez, ensayos de sobre-expresión y silenciamiento mostraron que el receptor Fzd9 podría tener una función desagregadora del AChR, lo que es concomitante a un incremento de los niveles de β -catenina citosólica. Consistente con lo anterior es que, en estadios embrionarios, tanto Fzd9 como β -catenina se localizan en dominios postsinápticos de la UNM de vertebrados [199]. Estos antecedentes son además la primera evidencia de una función crucial de receptores Fzd

y de la señalización dependiente de β -catenina en el ensamble de la UNM. Más aún, ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio indican que en etapas postnatales de maduración de la UNM también estarían presentes tanto Fzd9 como β -catenina, donde la función desagregadora de Fzd9 sobre el AChR podría estar contribuyendo *in vivo* en la formación o mantención de las zonas carentes de AChRs, promoviendo la maduración del aparato postsináptico.

Basados en estudios en tejido muscular que indican que la denervación provoca un retraso en la transición placa a pretzel de la UNM [72], y dado que Fzd9 presenta un expresión disminuida en músculo denervado [198], hemos evaluado el posible efecto de la señalización activada por Fzd9 sobre la maduración de la UNM. Experimentos de transgénesis *in vivo* por electroporación de fibras musculares con plasmidios que codifican para Fzd9 ha mostrado que la sobreexpresión de este receptor podría acelerar la aparición de estructuras postsinápticas complejas observadas en UNMs [200]. Considerando en conjunto los antecedentes presentados, nosotros creemos que **Fzd9 induce la maduración de la UNM a través de la inhibición de la agregación del AChR por una vía Wnt que involucra a β -catenina**. Más aún, considerando que se ha descrito en otros modelos celulares que existen distintas interacciones entre efectores de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y ACh/Cdk5 [201-203] que eventualmente podrían estar actuando en la maduración de la UNM, proponemos que **la señalización Wnt/ β -catenina podría compartir componentes moleculares de la vía de señalización activada por ACh**, lo

que promovería la desagregación de los AChRs y con ello la maduración de la UNM de vertebrados a través de la formación de estructuras postsinápticas complejas (Esquema 3).





Esquema 4 Vías de señalización involucradas en el modelo de maduración de la UNM

ACh actúa a través de Cdk5 para inhibir la agregación del AChR (1). Cdk5 inactiva se une a p35 para asociarse al filamento intermedio nestina (2). La estimulación de ACh activa la fosforilación de nestina por Cdk5/p35 (3) mientras que, por otra parte, activa a calpaína dependiente de calcio que escinde a p35 en una forma corta p25 aún más potente para la actividad de Cdk5 (4). Ambos complejos inician la desestabilización de los AChRs desde la membrana y su degradación (5). Como resultado, la forma activa Cdk5/p35 o Cdk5/p25 se disocian de nestina incrementándose el número de complejos activos para promover la desagregación de AChRs. Hallazgos de nuestro laboratorio muestran que en cultivos de miotubos Fzd9 (6) tiene una actividad similar anti-agregación del AChR a través de β -catenina (7). Es por ello que se ha considerado a β -catenina como un efector clave en la conexión de ambas vías de señalización para la maduración de la UNM ya que es i) acumulado frente a la activación de la vía de señalización Wnt (8), ii) proteolisada por calpaína (9), iii) fosforilada en el residuo Y654 por una tirosina quinasa desconocida después de la activación de Cdk5 (10) y cuyos niveles de fosforilación son también regulados por axina. Axina puede ser regulada por Cdk5 inhibiendo la actividad GSK3 β (11). Esta última puede ser además proteolisada por calpaína (12). Adicionalmente, Dvl podría ser regulado indirectamente por Cdk5 para inducir la desestabilización de los agregados del AChRs (13).

1.7 Aproximaciones experimentales para el estudio *in vivo* de la UNM de vertebrado.

Diversas aproximaciones experimentales con base en animales transgénicos, infección viral y métodos de entrega de ADN no viral pueden ser utilizadas para revelar la función de organizadores moleculares en procesos como la reparación y regeneración muscular, o bien, en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la maduración y mantención morfológica y funcional de subdominios especializados del sarcolema, como la placa motora.

Uno de los métodos para el estudio *in vivo* de genes es la utilización de un campo eléctrico que permita la transfección transiente de un plasmidio con seguridad y alta eficiencia [204]. La electroporación o electrotransferencia *in vivo* ha sido testeada en diversos tejidos y órganos blanco que incluyen el hígado (Heller, 1996), tejido cardiaco [205], piel [206], cerebro [207], médula espinal [208] y tendón [209], entre otros [210]. Uno de los tejidos ampliamente estudiado mediante la utilización de plasmidios de ADN expresados por electrotransferencia es el músculo esquelético [204, 211] ya que los vectores pueden ser expresados por más de dos meses en función de la naturaleza postmitótica y longevidad de las miofibras, permitiendo una expresión estable y prolongada de un gen sin la integración cromosómica [212, 213]. Esto potencia el uso de la electroporación como una herramienta de transfección *in vivo* de acción tejido-específica y localizada. Un músculo que presenta ventajas experimentales es *Levator Auris longus* (LAL) [214]. Su localización superficial formando parte de los músculos craneales, su delgadez al estar

constituido por 3-5 capas de células y la orientación de los terminales de placa motora en un mismo plano, facilitan la tinción y observación completa del patrón de inervación neuromuscular [214-216]. Además, en este músculo se han ensayado distintos tratamientos farmacológicos analizados a través de registros electrofisiológicos para comprender los mecanismos moleculares que regulan la neurotransmisión [217-221], así como posibles tratamientos terapéuticos para enfermedades neuromusculares. Esta búsqueda se ha combinado con el uso de animales transgénicos generados a través de manipulación genética, lo que ha sido una potente herramienta de estudio [221, 222]. Sin embargo, el tejido muscular requiere de una correcta inervación funcional que, producto de la intervención genética, puede estar condicionada a un desarrollo anormal del músculo, dificultando la correcta interpretación del fenotipo neuromuscular [223]. A este respecto, el desarrollo embrionario de modelos existentes de animales transgénicos de interés, para las vías Wnt/ β -catenina y ACh/Cdk5, presentan diversas alteraciones en los sistemas óseo y muscular, además de una menor tiempo de supervivencia postnatal, lo que condiciona el estudio de la maduración de la UNM [224, 225]. Es por ello que la electroporación postnatal de músculo LAL resulta ser una intervención idónea para abordar el estudio de las vías Wnt/ β -catenina y ACh/Cdk5, en el desarrollo postnatal *in vivo* de la UNM de mamífero. Aun cuando la electroporación ha sido escasamente utilizada para el estudio que subyace a la comprensión de la regulación sináptica, se ha descrito previamente que en fibras aisladas de músculo *flexor digitorum brevis* (FDB), la

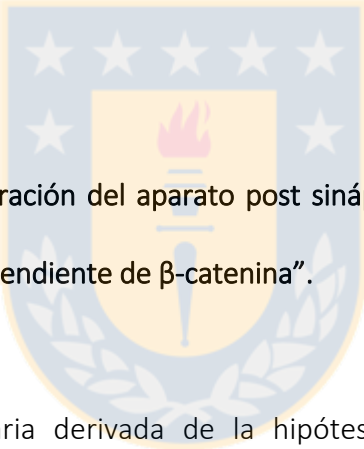
sobreexpresión mediante electroporación de canales iónicos tipo L, $\alpha 1s$ DHPR dependientes de Ca^{2+} , son funcionalmente insertados en la triada manteniendo las propiedades fisiológicas de acoplamiento de estimulación muscular [226]. En forma adicional, a través de la misma estrategia experimental se ha descrito la participación de los canales rectificadores de K^+ en respuesta a la estimulación repetitiva y condiciones de fatiga [227-229]. Estos antecedentes validan la electroporación de músculo como una aproximación funcional para el estudio de la fibra muscular en etapas postnatales. En esta tesis hemos desarrollado la electroporación de plasmidios codificantes para proteínas de interés en músculo LAL, como herramienta de manipulación genética para el análisis morfológico del aparato postsináptico y del acoplamiento excitación-contracción, a través de la estimulación presináptica del nervio facial en etapas de maduración y mantención postnatal de la sinapsis neuromuscular.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO

El proceso de maduración de la UNM de vertebrados implica la coordinada actividad de señales agregantes y desagregantes que inducen los cambios morfológicos necesarios que estructuran una sinapsis funcional. En esta línea, vías de señalización activadas por agrina, que estabiliza los agregados del AChR en la membrana postsináptica, o por ACh, que inhiben dicha agregación, podrían co-existir para modelar la sinapsis neuromuscular. Sin embargo, se desconocen las señales que inducen la maduración de la sinapsis

neuromuscular que sucede en etapas de desarrollo postnatal. Al respecto, las proteínas Wnt surgen como moléculas candidatas para regular la maduración de la UNM ya que cumplen diversas funciones en aspectos del desarrollo neuronal durante la formación de complejos circuitos neuronales. Más aún, funciones duales han sido descritas para ligandos Wnt en la formación de la UNM. En la sinaptogénesis, ligandos Wnt regulan en forma positiva y negativa la agregación del AChR promoviendo la agregación y desagregación del AChR a través de Wnt3 [185] y Wnt3a [186], respectivamente, en el aparato postsináptico. Basados en evidencias obtenidas de organismos invertebrados, nosotros postulamos la participación de receptores Fzd, cuya función en procesos de sinapsis neuromuscular en vertebrados no ha sido reportada. De forma interesante, estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el receptor Fzd9 se expresa en la membrana del músculo y se acumula en las zonas sinápticas de la UNM en formación [199]. Además, estudios funcionales realizados en miotubos C2C12 tratados con agrina muestran que la sobreexpresión del receptor Fzd9 presenta un efecto negativo sobre la agregación del AChR [199]. Por otra parte, la sobreexpresión de Fzd9 induce la acumulación de β -catenina citosólica [199], lo que podría estar relacionado con la inhibición de la agregación del AChR y con ello participar del ensamblaje de la UNM hacia su forma madura [188]. En forma adicional, hemos encontrado que la sobreexpresión del receptor Fzd9 en músculo esquelético también podría tener una función dispersadora de agregados del AChR en regiones de la zona sináptica carentes de agregados del AChR [200]. Considerando estudiar los mecanismos moleculares que expliquen el efecto del

receptor Fzd9 en la UNM, escasos antecedentes han sido reportados respecto a la maduración de esta sinapsis. Sin embargo, los determinantes moleculares de la vía de ACh que promueven el desarme de los agregados del AChR se han descrito con mayor detalle [4] y se encuentran también presentes en estadios postnatales. Nosotros creemos que el mecanismo molecular por el cual el receptor Fzd9 induce la maduración del aparato postsináptico comparte efectores intracelulares de la vía de ACh (Esquema 4). Considerando los antecedentes presentados hemos planteado como hipótesis principal que:



“Fzd9 promueve la maduración del aparato post sináptico de la UNM de vertebrados a través de una vía Wnt dependiente de β -catenina”.

Como hipótesis secundaria derivada de la hipótesis principal se plantea que **“los mecanismos moleculares activados por el receptor Fzd9 involucran además la participación de efectores moleculares de la vía de señalización ACh/Cdk5”.**

3. Objetivo General:

Determinar el mecanismo molecular por el cual el receptor Fzd9 de la vía de señalización Wnt promueve los cambios morfológicos del aparato postsináptico en la UNM de vertebrado.

3.1 Objetivos Específicos:

3.1.1 Objetivo 1

Estudiar la distribución endógena de efectores moleculares de la vía ACh/Cdk5 y el efecto de activadores e inhibidores en la maduración del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.

3.1.2 Objetivo 2

Estudiar el efecto morfológico y funcional de la activación de la vía Wnt/ β -catenina a través de la sobre-expresión de Wnt3a en la UNM de vertebrado.

3.1.3 Objetivo 3

Estudiar la localización endógena de Fzd9 además de efectores de la vía Wnt en el desarrollo postnatal y evaluar los cambios morfológicos y funcionales a través de la sobreexpresión y silenciamiento de Fzd9 en la maduración y/o mantención del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.

4. Materiales

4.1 Animales de experimentación.

Se obtuvieron ratones Swiss Webster desde el animalario del Departamento de

Farmacología de la Universidad de Concepción, desde el Instituto de Salud Pública de Chile, desde el animalario de la Pontificia Universidad Católica de Chile y desde el animalario de la Universidad de Sevilla. Los procedimientos experimentales fueron aprobados y conducidos siguiendo los protocolos del manual de bioseguridad y bioética de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Gobierno de Chile) y del Comité de Bioética de la Universidad de Concepción. Todos los tratamientos de intervención quirúrgica se realizaron bajo anestesia inhalatoria (Isoflurano 2,5% con una mezcla de oxígeno a 0,8-1 L/minuto) y en colaboración con la Clínica Veterinaria de la Universidad de Concepción.

4.2 Cepas Bacterianas.

E. coli DH5 α : Cepa utilizada para la preparación de vectores plasmidiales en pequeña y gran escala. Estas bacterias competentes para transformación química por el método de Inoue modificado presentan una eficiencia de transformación promedio de 10^{6-7} ufc/ng de ADN plasmidial súper enrollado.

Medios de cultivo de bacterias.

Caldo LB (MoBio): extracto de Levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L (Mo Bio) y NaCl 10 g/L para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos a purificar.

Agar LB (MoBio): para el crecimiento de colonias en placas.

Medio SOB (2 % Triptona; 0,5 % extracto de levadura; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; pH 7,0): para el crecimiento bacteriano en el proceso de generación de bacterias competentes.

Medio SOC (medio SOB con glucosa 20 mM): para la recuperación de bacterias transformadas con productos de ligación.

4.3 Plásmidos.

pCMV/tdTomato: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato bajo el control del promotor CMV. El gen de resistencia es kanamicina.

pSCP/Fzd9HA: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Fzd9 fusionada al epítotope HA (Hemaglutinina) bajo el control del promotor de CMV. Las bacterias transformadas son seleccionadas en ampicilina.

pCSCP/Wnt3aHA: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Wnt3a fusionada al epítotope HA (Hemaglutinina) bajo el control del promotor de CMV. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

pFUX/shFzd9: vector de expresión eucarionte derivado de FUXH1-OffEGFP que codifica para un shRNA contra Fzd9. El gen de resistencia corresponde al antibiótico ampicilina.

pcDNA3-cdk5GFP (# 1346): vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Cdk5 en fusión con la proteína bajo el control del promotor de CMV. La selección de bacterias transformadas se realiza con el antibiótico ampicilina.

pDkk1-Flag: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Dkk1 fusionada al epítotope Flag bajo el control del promotor de CMV. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

pCS/dC-Lrp6-Myc: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Lrp6 fusionada al epítotope Myc carente de los últimos 9 aminoácidos de la región C-terminal, bajo el control del promotor de CMV. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

pCS/Lrp6-Myc: vector de expresión eucarionte que contiene el gen que codifica para la proteína Lrp6 fusionada al epítotope Myc bajo el control del promotor de CMV. Posee el gen de resistencia al antibiótico ampicilina.

4.4 Equipos comerciales.

Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system: kit para extracción de ADN plasmídico desde bacterias transformadas basado en una lisis alcalina y la unión del ADN en una matriz de sílica.

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QiaGen): kit para extracción de ADN plasmídico desde medio líquido de bacterias transformadas mediante lisis alcalina y una columna de intercambio iónico. Se obtienen cantidades entre 100 a 200 µg de ADN.

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QiaGen): kit de extracción de ADN plasmídico desde medio líquido de bacterias transformadas mediante lisis alcalina y una columna de intercambio iónico. Se obtienen cantidades aproximadas a 1000 µg de ADN.

4.5 Anticuerpos.

Lista de anticuerpos primarios utilizados en la dilución indicada respecto del propósito experimental.

Tabla 1 Anticuerpos utilizados en los distintos experimentos.

Antígeno	Tipo	Especie	Origen	Propósito	Dilución
Neurofilamento (ab8135)	Policlonal	Conejo	ABCAM	IF	1:1000
Fzd9 (ARP41253)	Policlonal	Conejo	Aviva System	IF	1:200
Fzd9 (RyD)	Policlonal	Cabra	Aviva System	IF	1:200
SV2 (AB 2315387)	Monoclonal	Ratón	DSHB	IF	1:200
MAP1B (SC-8970)	Policlonal	Cabra	Santa Cruz	IF	1:200
β-catenina (ABE208)	Policlonal	Conejo	Millipore	IF	1:1000
ChAT (AB144P)	Policlonal	Cabra	Millipore	IF	1:200

Antígeno	Tipo	Especie	Origen	Propósito	Dilución
S100 (Z0311)	Policlonal	Conejo	Dako	IF	1:1000
α BTX			Molecular Probe	IF	1/500
DAPI			ThermoFisher	IF	1/100

Tabla 2 Anticuerpos secundarios utilizados.

Antígeno	Tipo	Especie	Origen	Propósito	Dilución
Cy2	Policlonal	Donkey (H+L)	Jackson	IF	1/250
Cy3	Policlonal	Donkey (H+L)	Jackson	IF	1/250
Cy5	Policlonal	Donkey (H+L)	Jackson	IF	1/250

4.6 Reactivos y soluciones en general

Acetato de sodio(3 M; pH 5,2), etanol (Merck), fenol/cloroformo (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 v/v), HCl (10 M, Merck), isopentano (Merck), isopropanol (Merck), medio de montaje acuoso VectaMount AQ (Laboratorio Vector), medio de montaje acuoso para fluorescencia (DakoCytomation), Paraformaldehído (Sigma), PBS 1X (136 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 8,1 mM de Na₂HPO₄; 1,5 mM de KH₂PO₄; pH 7,4); glicerol; Tampón Trisfosfato/BSA 1% (20,7 mM de Tris; 72,3 mM de NaCl; 1 %p/v de BSA); Isoflorano (Baxter); Solución fisiológica externa (135 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 12 mM de NaHCO₃, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂ y 12 mM de glucosa).

4.7 Material en general y recursos disponibles.

Cubreobjetos discoidales de vidrio de 12mm de diámetro, portaobjetos, placas de cultivo celular de 35, 60 y 100mm de diámetro, placas de 24 pocillos, pipetas estériles, tubos cónicos de 15 y 50mL, material de disección, Sylgard 184.

EL Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo contempla todas las normas de bioseguridad detalladas en el manual respectivo de CONICYT y la Universidad de Concepción. Cuenta con un espacio físico de 60 metros cuadrados dotado de una sala de cultivo equipada con un gabinete de bioseguridad (Nuaire) tipo II, una cámara de incubación Thermo Hepaclass 100 (37°C, 5% de CO₂), un microscopio invertido Olympus CK40, una centrífuga (Kubota) y un baño termostático. Además, para el procesamiento de tejido muscular, el laboratorio cuenta con un gabinete de bioseguridad tipo I y material quirúrgico adecuado para la disección de animales, un estereomicroscopio confocal ApoTome.2 (Zeiss), tres estereomicroscopios con luz fría (Leyca) con cámara digital (Moticam 2000), un microscopio óptico (Zeiss), un microscopio de epifluorescencia (Nikon 80i) y un vibratomo (Leica). El laboratorio posee cuatro refrigeradores 2-8 °C, tres refrigeradores de -20 °C, un refrigerador de -80 °C, una balanza electrónica, pHmetro, homogenizador de tejidos, microcentrífuga de sobremesa, fuentes de poder, cámara de electroforesis y electrotransferencia de proteínas y agitadores orbitales (Labnet). Tenemos un sistema de fotodocumentación para geles y para la cuantificación de proteínas, ADN y ARN (Qubit), un termociclador, un equipo de autoclave.

Se cuenta además con facilidades de acceso a dependencias y equipamiento del Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. En su conjunto, estos laboratorios están equipados con: dos termocicladores con gradiente de temperatura (Mastercycle Eppendorf y Perkin Elmer), termociclador para realizar RT-PCR *in situ*, tres microcentrífugas de sobremesa (Eppendorf, IEC y Fisher), Freezer de -80 °C, pH metro, una centrífuga de velocidad (Sorvall) y un contador de centelleo líquido. El laboratorio central para técnicas histológicas dispone de lupa estereoscópica (Stemi SV 6, Zeiss) con iluminación de fibra óptica, un crióstato, tres micrótomos, estufas para inclusión en parafina, dos estufas de secado de muestras, tres refrigeradores, dos microscopios de estudio y tres baños para estiramiento de cortes. La sala de microscopía está equipada con un fotomicroscopio Axiphot/Epifluorescencia (Zeiss), un fotomicroscopio D7082 (Zeiss) y un fotomicroscopio Zeiss Axioplan II equipado con cámara de video para el procesamiento de imágenes.

Por otra parte, la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción cuenta con el Centro de Microscopía Avanzada CMA-BioBio, que contiene un microscopio de súper resolución LSM Elyra (Zeiss), un microscopio confocal LSM700 (Zeiss) y un microscopio espectral LSM 780 (Zeiss). Este centro también tiene entre sus prestaciones un citómetro de flujo, un microdisector láser, una completa sala de histología y cultivo celular, además de una sala de procesamiento de imágenes con los programas computacionales de Imaris y fiji con distintos módulos de edición de videos y análisis de co-localización.

5. Métodos.

5.1.1 Transformación de bacterias *E. coli* DH5 α .

Para la generación de vectores plasmidiales se transformó la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α químicamente competente, mezclando entre 25 y 50 ng de ADN de concentración conocida con 50 μ L de bacterias. Se incubó la mezcla en hielo por 30 min, luego se incubó por 90 s a 42 °C y posteriormente se llevó a hielo rápidamente por 2 min. Las bacterias se recuperaron agregando 250 μ L de caldo LB e incubando a 37 °C a 200 rpm de agitación por 1 h. Se sembró una alícuota de 50 μ L de bacterias en placas de agar con ampicilina o kanamicina 100 μ g/mL según corresponda, para selección de colonias transformadas. Para la purificación de los vectores plasmidiales se creció una colonia aislada en caldo LB con ampicilina o kanamicina 100 μ g/mL por 12-16 h a 37 °C y 200 rpm para tratar de acuerdo a los kit comerciales *QIAGEN Plasmid Midi kit* de QIAGEN y *QIAGEN Plasmid Maxi kit* de QIAGEN.

5.1.2 MidiPrep.

Utilizado para la purificación de ADN plasmidial desde cultivo bacteriano en un rango de eficiencia de 100-200 μ g. Está basado en el mismo principio de acción que la extracción por MiniPrep. Con el objetivo de generar copias de los vectores plasmidiales a mayor

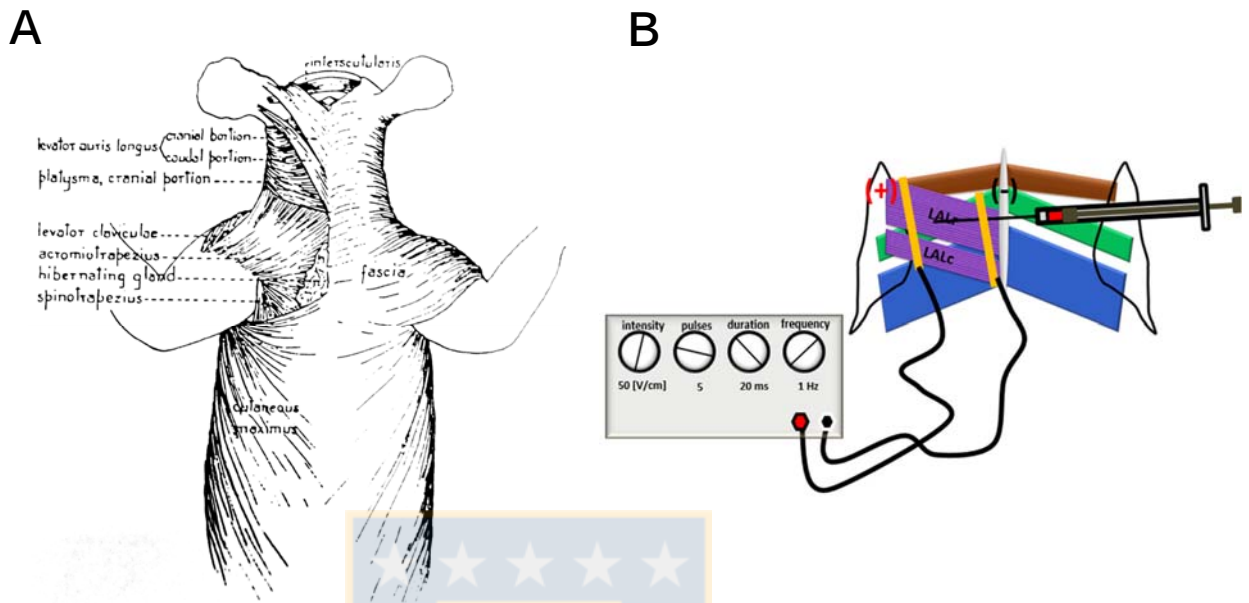
escala y de alta pureza para experimentos de transfección, éstos fueron purificados por MidiPrep utilizando el kit comercial *QIAGEN Plasmid Midi kit (QiaGen)*. El método se basa en la lisis alcalina de las bacterias y afinidad por una matriz hecha de sílica que se une al ADN en presencia de una sal caotrópica. Posee una eficiencia de hasta 200 µg de ADN plasmidial. Se sembró en una placa con agar 50 µL de bacterias mantenidas en glicerol y se incubó por 16 h a 37 °C. Una colonia aislada fue inoculada en 100 mL de medio LB con antibiótico y fue incubada a 37 °C con agitación por toda la noche. Las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 6.000 xg por 15 min y el sedimento fue resuspendido en 4 mL de tampón P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL ARNasa A). Luego, se agregó 4 mL de tampón P2 (200 mM NaOH; 1 %p/v SDS) para lisar las bacterias, se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó tampón P3 (3 M acetato de potasio pH 5,5). La mezcla fue centrifugada a 18.000 xg por 45 min a 4°C y la fase acuosa transparente fue aplicada a una columna de afinidad por ADN previamente equilibrada con tampón QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 %v/v isopropanol; 0,15 %v/v Triton X-100). El ADN unido a la columna fue lavado con tampón QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 8,5; 15 % v/v isopropanol) y eluido con 5 mL de tampón QF (1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl pH 7,0; 15 %v/v isopropanol). Posteriormente, el ADN fue precipitado con 3,5 mL de isopropanol y centrifugado a 13.000 xg por 30 min a 4 °C. Finalmente, el sedimento fue lavado con Etanol 70 %v/v, secado y resuspendido en un volumen de entre 50 y 100 µL de agua ultra pura.

5.1.3 Purificación de plásmidos a gran escala por precipitación con PEG (Maxiprep).

Se creció un cultivo de 500 mL de medio LB conteniendo el antibiótico apropiado inoculado con una colonia transformada con el plásmido correspondiente, entre 18 y 20 h a 37 °C con agitación. Luego, las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4.000 rpm (Rotor GSA, Sorvall) por 15 min a 4 °C. El sedimento fue resuspendido en 10 mL de tampón P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNasa A). Posteriormente, se agregó 10 mL de tampón P2 (200 mM NaOH; 1 %p/v SDS) para lisar las bacterias, se mezcló vigorosamente por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregó tampón P3 (3 M acetato de potasio pH 5,5). La mezcla fue centrifugada a 18.000 xg por 45 min a 4°C y la fase acuosa transparente fue aplicada a una columna de afinidad por ADN previamente equilibrada con tampón QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15 %v/v isopropanol; 0,15 %v/v Triton X-100). El ADN unido a la columna fue lavado con 60 mL de tampón QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS pH 8,5; 15 % v/v isopropanol) y eluido con 15 mL de tampón QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 15 %v/v isopropanol). Posteriormente, el ADN fue precipitado con 10,5 mL de isopropanol y centrifugado a 13.000 xg por 30 min a 4 °C. Finalmente, el sedimento fue lavado con Etanol 70 %v/v, secado y resuspendido en un volumen de 100 - 150 µL de PBS 0,1 M.

5.1.4 Electroporación de músculo de ratón.

Músculos *Levator auris longus* (LAL) y *flexor digitorum brevis* (FDB) de ratones de 21 días postnatales o adultos de 3 meses fueron electroporados con los plásmidos indicados en el apartado 1.4. Previo a la electroporación, se inyectó de modo subcutáneo 10 μ L de hialuronidasa 2 mg/mL en PBS 0,1 M durante 1 h. Posteriormente y bajo anestesia inhalatoria se realizó una incisión en la piel de 5 - 10 mm sobre la sutura sagital del cráneo dejando los músculos LAL expuestos. A continuación se inyectó en la fascia que se distribuye sobre el músculo 10 μ L de ADN 8-10 μ g/ μ L en PBS 0,1 M formando una burbuja. Se aplicaron 5 pulsos cuadrados de 100 V/cm de 20 ms de duración cada uno a 1 Hz de frecuencia [230], utilizando el electroporador ECM 830 (BTX) y electrodos de oro tipo aguja (Genetrodes, BTX). Dado que la fluorescencia de la proteína mCherry disminuye con la post-fijación y procedimiento inmunohistoquímico y con el fin de maximizar la detección de fibras positivas electroporadas con el plásmido que codifica para Fzd9 o Wnt3a (ambos co-expresan la proteína mCherry) se co-electroporó con el plasmidio Tomato en proporción 1:5 (Tomato:Fzd9 ó Tomato:Wnt3a). Se ensayaron al menos tres animales para cada condición evaluada.



Esquema 5 Electroporación del músculo LAL

Localización anatómica del músculo *Levator auris longus* (A). Modificado de Anatomy of the Rat, Eunice Chace Greene (Braintree Scientific, MA, USA). Esquema de electroporación (B) Músculos LAL de ratones dispuestos como se indica en el esquema fueron electroporados utilizando 5 pulsos de 50 V/cm con una duración de 20 ms cada uno y a una frecuencia de 1 Hz. Posteriormente, los músculos fueron procesados acorde a los requerimientos experimentales.

5.1.5 Axotomía del nervio facial.

La denervación del músculo LAL fue realizada como se describe en Olmstead y cols., 2015 [231]. Brevemente, los ratones fueron anestesiados en mezcla de oxígeno/isoflurano 2,5 % y la sedación fue comprobada total mediante el reflejo de tacto en el pie. A continuación el ratón fue acostado sobre su lado izquierdo y su oreja derecha fue fijada hacia la nariz

exponiendo el área posterior del pabellón auricular donde se realizará la incisión. El área fue afeitada y desinfectada previa incisión. Completado lo anterior, se procedió a ubicar la vena auricular posterior a la protuberancia del pabellón auricular. Una incisión de 5 mm en la piel fue realizada para poder disecar a través de la grasa evitando el corte de vasos sanguíneos o tejido muscular. Se consideró la ubicación anatómica del nervio accesorio espinal, del conducto auditivo y del músculo digástrico anterior como referencias para localizar el nervio facial. Una vez visualizado, se realizó la remoción de aproximadamente 3-5 mm de nervio. Finalmente la piel fue suturada con hilo absorbible de poliglactina (Vicryl 6-0).



Esquema 6 Esquema anatómico del nervio facial

A la izquierda se muestra la localización, inervación y vascularización del músculo *Levator auris longus* en el ratón. A la derecha se observa la distribución del perfil nervioso. La Axotomía se realiza en la zona indicada en el cuadro verde. Modificado de Anatomy of the rat, Eunice Chace Greene (Braintree Scientific, MA, USA).

5.1.6 Tinción de músculo completo LAL con α -BTX conjugada a fluoróforos.

Los músculos LAL fueron fijados en PFA 2 % en 0,1 M de PBS a 4 °C durante toda la noche o bien en FA 1,5 % V/V en 0,1 M de PBS a temperatura ambiente durante 90 min. Se realizaron lavados con PBS 0,1 M y Tritón X-100 0,5 % V/V durante 2 h. A continuación, las muestras fueron incubadas por 30 min. en glicina 0,15 M en PBS 0,1 M. Posteriormente, los músculos fueron incubados en solución de bloqueo (PBS 0,1 M / Triton X-100 0,5 % / BSA 4 %) con α BTX-488 en dilución 1:500 durante 2 h a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS 0,1 M y Tritón X-100 0,5 % (el último de ellos sin detergente) antes de montar entre cubreobjetos, colocando medio para fluorescencia (DAKO) y adhiriendo los cubreobjetos en sus bordes con cianoacrilato.

5.1.7 Inmunohistoquímica.

Los músculos LAL silvestres y aquellos electroporados con vectores codificantes para proteínas control o para proteínas de interés, fueron disecados y fijados en PFA 2 %, en PBS 0,1 M pH 7,4 a 4° C durante toda la noche o FA 1,5 % durante 90 min a temperatura ambiente [232]. Los músculos fueron lavados en agitación y permeabilizados con PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,5 % cada 10 min durante 2 h. A continuación se trató con glicina 0,15 M en PBS 0,1 M durante 30 min para proceder a bloquear durante toda la noche con BSA al 4 %. Los anticuerpos primarios (Tabla 1) fueron incubados en solución de bloqueo

durante toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavó 10 veces por 10 min en PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,5 % para luego incubar el anticuerpo secundario (Tabla 2) contra la especie correspondiente durante toda la noche a 4° C. Finalmente se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS 0,1 M, Tritón X-100 0,5 % antes del montaje entre cubreobjetos con medio para fluorescencia (DAKO). Por otra parte, músculos LAL tratados como se indica en 10.1.4, fueron fijados en isopentano a -80 °C para cortes de crióstato de 20 µm en los cuales se ensayaron las tinciones WGA-DAPI donde se evaluaron cambios en el área de secciones transversales de fibras musculares electroporadas.

5.1.8 Adquisición de imágenes.

Para analizar la expresión de proteínas electroporadas y marcadores pre y post sinápticos de la UNM por medio de inmunofluorescencia, las imágenes fueron adquiridas utilizando los microscopios confocal Zeiss LSM 700 y confocal espectral Zeiss LSM 780, ambos con tres líneas de láser para la excitación de fluoróforos (488, 561 y 633). El objetivo de inmersión 25 X (LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27) fue utilizado para la obtención de exploración completa (Tilt-scan microscopy) mientras que los de 40 X (Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27) y 63 X (Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27) fueron utilizados para la adquisición de los aparatos postsinápticos y los tres componentes de la UNM. Se capturaron imágenes de planos confocales de 0,37-1 µm tanto en animales silvestres como electroporados en condiciones similares. En el estudio de la morfología

del componente postsináptico, se utilizó la opción de corrección de brillo “Auto x Brightness correction” ajustando la ganancia maestra de intensidad de fluorescencia en los planos z más profundos, sin variar la potencia del láser. Durante el procedimiento de exploración, los valores se interpolan en forma automática y lineal entre las posiciones vecinas dentro de la pila de planos z.

5.1.9 Análisis de la unión neuromuscular.

Para analizar la UNM, los músculos fueron procesados como se indica en 10.1.6 y 10.1.7, y las imágenes fueron adquiridas como se señala en 10.1.8. Los aparatos postsinápticos fueron identificados mediante la detección de agregados de AChRs teñidos con α BTX y se clasificaron según lo descrito por Bolliger y cols. (2010) [52] en base a su morfología en P: placa ovalada pequeña homogénea, SP: placas con una o más perforaciones pequeñas en su interior, LP: placas con una o más perforaciones grandes en su interior, IP: pretzel inmaduros (que generalmente tienen una abertura en la periferia de la placa inicial), MP: pretzel maduros que son altamente complejos y ramificados y poseen gran parte de su interior con baja densidad del AChR, y finalmente los FP: pretzel fragmentados, los cuales se forman por el desensamble de AChRs en segmentos de los pretzels [52, 59, 75].

Con el fin de resolver las estructuras postsinápticas con detalle, las fotos adquiridas con un objetivo de 40 X como se indica en 10.1.8 fueron reconstruidas en tres dimensiones utilizando ImageJ de tal forma de poder rotar las proyecciones obtenidas para su

cuantificación. Las categorías indicadas en el párrafo anterior fueron contadas en campos con alta eficiencia de fibras electroporadas con los plásmidos señalados en el apartado 10.1.4. Aproximadamente 40 - 50 aparatos postsinápticos de regiones electroporadas por cada animal fueron cuantificados en al menos tres animales por condición. Los resultados fueron expresados en porcentaje, como la razón del número de pretzels observados para cada categoría, en relación al número total de aparatos postsinápticos analizados.



Esquema 7 Estructura morfológicas del aparato postsináptico en la UNM.

Las estructuras complejas del AChR se clasificaron según su morfología en; P: placa, SP: placas con una o más perforaciones pequeñas, LP: placas con una o más perforaciones grandes en su interior, IP: Pretzel inmaduros, MP: pretzel maduros, FP: pretzel fraccionados. Barra: 25 μm.

5.1.10 Análisis de área y perímetro del aparato postsináptico.

Se realizaron análisis de área, perímetro y volumen fueron realizados para complementar los estudios morfológicos de la UNM. Los cambios de tamaño en el aparato postsináptico fueron cuantificados utilizando ImageJ. Para ello, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal con un objetivo de 40 X como se indica en el apartado 10.1.8, que fueron

procesados como proyecciones de máxima intensidad (MIPs) digitalizadas, en las cuales se seleccionó un región de interés (ROI) utilizando ROI manager. El mismo ROI fue utilizado para todos los aparatos postsinápticos. Utilizando la función “crop”, la región de interés fue cortada para posteriormente ajustar el umbral de acuerdo a los pixeles fluorescentes que componen el pretzel. A continuación, se seleccionaron los parámetros a medir incluyendo el área y el perímetro. Con el fin de cuantificar sólo los elementos de aparatos postsinápticos individuales, se seleccionó la exclusión de los objetos en los bordes de la región de interés. Los resultados fueron expresados como unidad en micras (μm). Tanto el volumen como la superficie de los aparatos postsinápticos fueron cuantificados utilizando el plugin 3D object counter [233, 234], ajustando el umbral de fluorescencia y excluyendo los objetos seleccionados en los bordes de la pila de planos z, ya que en dichas regiones los pretzels se encuentran cortados o incompletos. Aproximadamente 35 - 50 aparatos postsinápticos de regiones electroporadas fueron cuantificados para al menos tres animales por condición y los valores fueron expresados en la unidad de micras (μm), como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM) para cada parámetro analizado.

5.1.11 Cuantificación del número de fragmentos del aparato postsináptico.

Con el fin de analizar cambios en el aparato postsináptico, se realizaron reconstrucciones tridimensionales de imágenes de planos z utilizando el programa ImageJ y se

contabilizaron los fragmentos aislados que conforman cada pretzel, formados por el desensamble de AChRs que generan segmentos discontinuos de agregados de AChRs. En un mismo pretzel, las proyecciones que se generaron fueron rotadas en 360° para evidenciar la separación entre cada fragmento. El número de fragmentos por pretzel fue determinado en forma manual considerando la cantidad de disgregaciones de cada unidad postsináptica teñida con α BTX de al menos 35 – 50 aparatos postsinápticos de tres animales por condición.

5.1.12 Cuantificación de la aposición pre y post sináptica de la UNM de vertebrado.

Para analizar la aposición entre los componentes pre y postsinápticos de la UNM, los músculos LAL electroporados fueron teñidos como se describe en 10.1.7 y las imágenes fueron capturadas como se indica en 10.1.8 con un objetivo de 63 X. Utilizando el programa ImageJ, cada canal adquirido fue digitalizado como una proyección de máxima intensidad y se dibujó un ROI circunscribiendo el área del aparato postsináptico en el canal correspondiente, que fue ajustado mediante la función *fit spline*, la cual describe, en este caso, el ROI como una curva definida en trazos mediante polinomios, permitiendo aproximar formas complejas. Posteriormente se ajusta el umbral por simple inspección para, finalmente, obtener los valores de área. A continuación, el ROI utilizado es exportado y cargado automáticamente en la misma posición en la MIP del canal en el cual se adquirió el terminal presináptico y se repite el procedimiento. Las áreas pre y

postsinápticas así como la aposición (razón entre las áreas de ambos componentes) fueron expresadas en función de la señal de los pixeles que conforman ambos componentes. El área fue medida como el área marcada con α BTX y la UNM está referida al área total que cubre la región completa de AChRs, incluyendo las regiones internas donde hay espacios libres de AChRs [75, 221].

5.1.13 Proyecciones y videos en tres dimensiones de la UNM de vertebrado.

La captura de imágenes fue realizada mediante microscopio confocal Zeiss LSM 780, considerando la adquisición de los tres canales en forma simultánea y manteniendo el número y posición de los planos en el eje z. Mediante el programa Imaris (Bitplane), se utilizó la función Blend para que la señal de fluorescencia fuera proyectada en tres dimensiones para cada canal y luego fueron superpuestas y proyectadas como volúmenes de los componentes pre y postsinápticos así como de las proteínas de interés. Imágenes de videos representativos fueron utilizados para entender la distribución de las proteínas estudiadas (microscopio Zeiss LSM 780) procesados con Imaris (Bitplane).

5.2 Registro intracelular de fibras musculares electroporadas.

5.2.1 Preparación del músculo LAL.

Para proceder con los registros electrofisiológicos, los ratones fueron eutanasiados mediante saturación por CO₂ y exsanguinación. El animal fue fijado decúbito prono y rasurado con una hoja de afeitar. Luego se diseccionó todo el tejido muscular desde el pabellón auricular izquierdo cruzando la línea media sagital. Todos los músculos craneales disecados fueron traspasados a una placa Petri de 55 mm² donde fueron sujetos sobre una cubierta de silicona con alfileres de 0,2 mm, con los músculos LAL hacia la base de la placa. Se retiraron las diferentes capas musculares hasta llegar al músculo LAL. Finalmente se limpió de tejido adiposo y fascia. Posteriormente, el músculo LAL disecado con las ramas del nervio intacto (2 – 3 mm) se colocó en una cámara de registro de metacrilato que contiene una base de goma de silicona especialmente diseñada para ello, con un sistema de burbujeo de oxígeno. A su vez, en el interior de la solución de la cámara se ubicó un electrodo clorurado conectado con tierra del seguidor de voltaje. Para penetrar las fibras musculares, la pipeta se colocó cercana a la superficie del músculo, visualizándose bajo un microscopio de transmisión directa (Olympus BX50WI).

5.2.2 Estimulación presináptica.

En este procedimiento el nervio fue aislado y estimulado mediante un electrodo de succión compuesto por un tubo de polietileno de 2 mm de diámetro que aloja un hilo de

plata clorurado (Ag-AgCl, electrodo activo) y sobre el que se enrolla otro hilo conductor (Ag-AgCl) que corresponde al electrodo de referencia. Este dispositivo se conectó a un generador de pulsos aislado (Isolated Pulse Stimulator modelo 2100 A-M Systems) y a un sistema de succión mediante un tubo y una jeringa con solución salina extracelular. La estimulación del nervio se realizó aplicando una diferencia de potencial entre ambos terminales del electrodo de succión mediante pulsos cuadrados de 0,2 ms y de 2 - 15 V a frecuencias de 0,5 - 5 - 20 - 50 y 100 Hz.

5.2.3 Registro de potenciales postsinápticos.

Para el registro de los potenciales postsinápticos de las fibras musculares, se utilizaron micropipetas fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato (calibre: 1mm \emptyset exterior, 0,75mm \emptyset interior) mediante un estirador de vidrio horizontal (puller modelo P-97, Sutter Instrument Co.) calibrado bajo los siguientes parámetros: calor: 460, tirón: 200, velocidad: 80 y tiempo 200. Las micropipetas se llenaron con solución salina de 3 M de KCl en contacto con un alambre de plata clorurado unido al seguidor de voltaje y éste, a su vez, al el cuerpo principal del amplificador de registro intracelular (TEC-0,5) y sujeta a un micromanipulador (Narishige MHW-3). La salida del amplificador se conectó a un convertidor analógico digital o interfaz (PowerLab/4SP), que transformó la señal analógica en digital enviándola posteriormente al ordenador. Todo este dispositivo experimental se

colocó sobre una mesa anti vibratoria (Newport) aislado eléctricamente mediante una jaula de Faraday.

La resistencia de la micropipeta dentro de la solución varió entre 15 - 35 M Ω . Esta resistencia se compensó mediante el amplificador, igual que la capacidad de la pipeta y el potencial de unión líquido debido a las soluciones del baño y de la pipeta (Esquema 8.B).

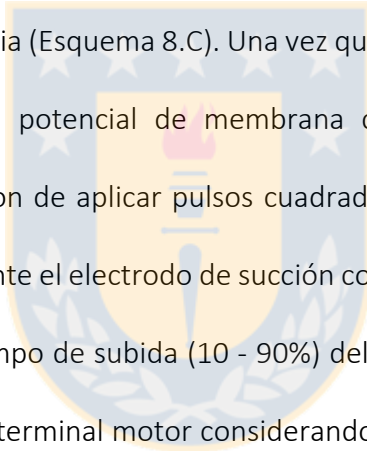
Mediante el micromanipulador se aproximó la micropipeta a una fibra muscular electroporada de manera que en la pantalla del ordenador se observó un aumento progresivo de la resistencia (Esquema 8.C). Una vez que la micropipeta penetra en la fibra

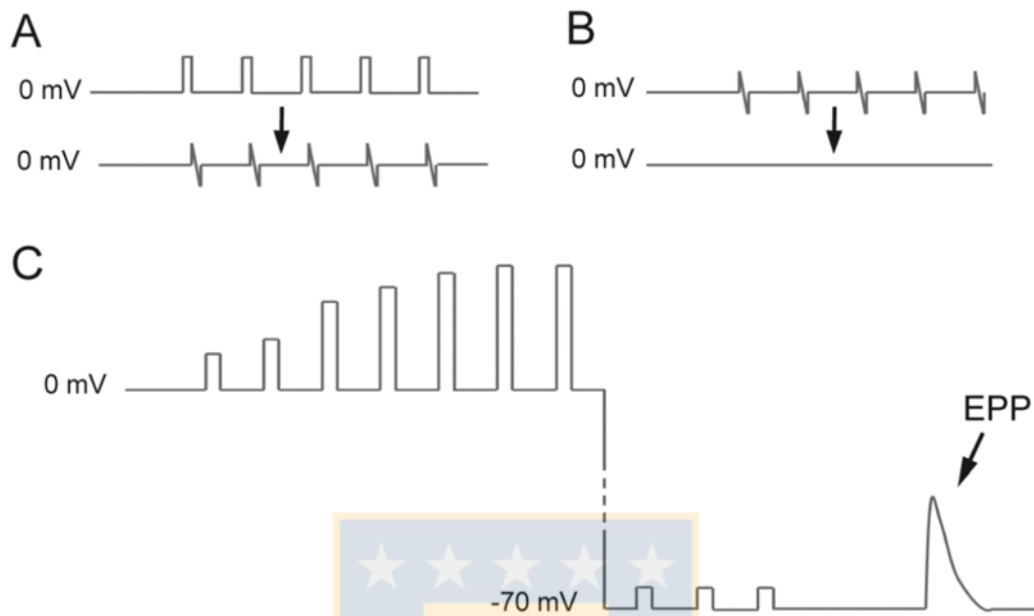
muscular, se registró el potencial de membrana como una deflexión hacia abajo.

Posteriormente se dejaron de aplicar pulsos cuadrados a través de la micropipeta y se estimuló el nervio mediante el electrodo de succión como se indica en 10.2.2. Tras dar un estímulo, se midió el tiempo de subida (10 - 90%) del potencial de placa evocado (EPP),

para saber la cercanía al terminal motor considerando aceptables valores menores a 1,2

ms.





Esquema 8 Cambios producidos en el registro durante el proceso de penetración de la micropipeta en una fibra muscular.

A. Aplicación de un pulso cuadrado con la micropipeta en el baño y compensación de la resistencia de ésta. B. Compensación de la capacidad. C. Aumento de la señal al aumentar la resistencia entre la pipeta y el electrodo de referencia. Finalmente, penetración en la fibra muscular y registro de Vm. Cese de aplicación del pulso cuadrado que pasa por la pipeta y aplicación de un estímulo a través del electrodo de succión para registrar los potenciales evocados de placa.

Tras comprobar la viabilidad del preparado, se bloqueó la contracción muscular adicionando al baño 3 mM de μ -Conotoxina GIIB, bloqueante específico de los canales de sodio dependientes de voltaje del músculo. Tras el bloqueo se cerró el sistema de intercambio de solución y el burbujeo de la solución se trasladó a la cámara de registro. Los experimentos se realizaron con una solución conteniendo la siguiente composición

(en mM): 135 NaCl, 5 KCl, 12 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 12 glucosa. Se registraron potenciales de placa en miniatura (mEPPs) de un registro continuado de 5 min y potenciales de placa evocados (EPPs) (protocolos de 150 estímulos a 0,5 Hz y 100 estímulos a 100 Hz) en diferentes fibras electroporadas de un mismo preparado. Los datos fueron adquiridos en el programa Chart5. Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente promedio de 22°C.

5.2.4 Análisis de registros electrofisiológicos.

Los registros intracelulares a 21-23 días postnatal se realizaron en el músculo LAL de ratones electroporados a P14 con el plasmidio que codifica para la proteína fluorescente Tomato como control, comparados con ratones electroporados con plásmidos que permiten la sobreexpresión o inhibición de Fzd9. Las amplitudes de los potenciales de placa evocados (EPPs) y miniatura (mEPPs) registrados en cada terminal fueron normalizados a -70 [mV] de potencial de membrana. Para ello se utilizó la siguiente fórmula donde EPP corresponde a la amplitud del EPP registrado, EPP_r, la amplitud del EPP corregido por el potencial de membrana y f el factor de conversión que se define de la siguiente forma:

$$f = \frac{V_s - E_r}{V_m - E_r}$$

En esta fórmula, V_s corresponde al potencial de membrana de corrección -70 mV, V_m corresponde al potencial de membrana de la fibra registrada y E_r corresponde al potencial de reversión que, para todos los casos se asume un valor de -5 mV.

Además, los EPPs registrados (EPPr) se corrigieron por la sumación no lineal mediante la ecuación de Boyd y Martin (1955) [235]:

$$EPP_c = EPP_r / (1 - \frac{EPP_r}{V_m - E_r})$$

Donde EPPc corresponde a la amplitud del potencial postsináptico corregido.

El registro simultáneo de los potenciales de placa evocado y espontáneo se llevó a cabo durante 5 min (estimulación del nervio a 0,5 Hz) y el contenido cuantal (QC) se estimó por el método directo que viene dado por la siguiente razón:

$$QC = \frac{\text{amplitud promedio de EPP}}{\text{amplitud promedio de mEPP}}$$

Todos los datos electrofisiológicos se presentan como media \pm error estándar siendo N y n el número de animales y el número de fibras musculares registradas, respectivamente.

5.2.5 Tiempo de subida 10 – 90.

El tiempo de subida T_{10-90} del potencial de placa evocado EPP, fue analizado con el programa Chart5, considerando desde el 10 % de la curva ascendente del estímulo hasta el 90 % de la amplitud máxima. Se cuantificó un promedio de 150 estímulos por cada una de las fibras musculares electroporadas a una frecuencia de 0,5 Hz.

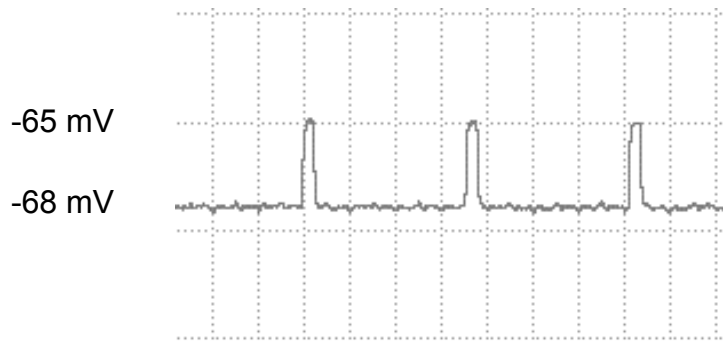
5.2.6 Tiempo de decaimiento (τ).

El tiempo de decaimiento τ , fue analizado mediante el programa Chart5 y corresponde al tiempo requerido para que el cambio de voltaje de membrana que se produjo con el estímulo, alcance el 63 % de su valor final en reposo. Un promedio de 150 estímulos de fibras musculares electroporadas con los plasmidios de interés se analizaron a una frecuencia de 0,5 Hz.

5.2.7 Resistencia de entrada.

Para medir la resistencia de entrada de cada una de las miofibras electroporadas registradas, se aplicaron pulsos cuadrados de 14 Hz de frecuencia, 5 ms de duración y 200 mV de amplitud, mediante micropipetas fabricadas a partir de capilares de vidrio de borosilicato rellenas de una solución conductora 3 M KCl. La solución de la micropipeta se conectó a un hilo de plata clorurado, a su vez conectado con el amplificador de registro,

el cual convierte cada voltio aplicado en 1 nA de intensidad. En la siguiente figura se puede observar un ejemplo de la aplicación de tres pulsos cuadrados a una fibra:



Esquema 9 Trazos representativos de la resistencia de entrada de membrana.

Los músculos fueron analizados a través de registro intracelular. Se estimuló durante 2 segundos con pulsos cuadrados de 200 mV y 5 ms de duración a 14 Hz a través de la membrana, lo que produjo un cambio en el potencial de membrana como se muestra en los trazos representativos.

La resistencia fue analizada a través de la ecuación que describe la ley de Ohm:

$$V = I \times R$$

Donde, V es la diferencia de voltaje entre el máximo del pulso cuadrado y su línea base, I es la intensidad aplicada en el pulso cuadrado y R es la resistencia de entrada de cada una de las fibras musculares, siendo las unidades de medida voltios (V), amperios (A) y megaOhmios ($M\Omega$), respectivamente.

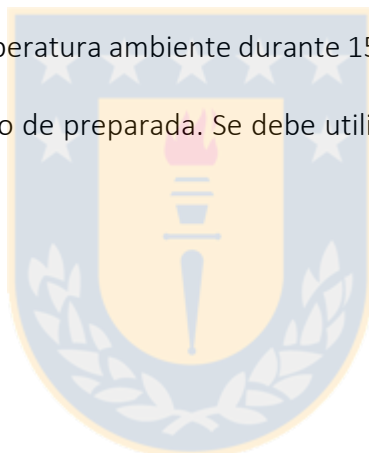
5.3 Extractos de proteínas totales.

Se extrajeron proteínas totales desde músculos LAL. Las muestras se homogenizaron con un sonicador a una amplitud de 70 % dando pulsos cortos de 10 s, en una solución Tris-base 50mM pH 7.4, Tritón X-100 0.5%, NaCl 0.15M que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas IP 1X (104 mM AEBSF; 80µM Aprotinina; 2mM Leupeptina; 4mM Bestatina; 1,5mM Pepstatina A; 1,4mM E-64) (Sigma). El homogenizado fue centrifugado a 6.000xg por 10min a 4°C. El sobrenadante obtenido corresponde al extracto de proteínas totales.

5.3.1 Cuantificación de proteínas.

Para determinar la concentración en cada extracto las proteínas fueron cuantificadas por el método espectrofotométrico de Bradford. Para realizar la curva de calibración, se prepararon seis diluciones de distintas concentraciones de BSA 100 µg/µL: 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL en volumen final de 1mL con igual volumen de reactivo de Bradford correspondiente a 200µL. Las muestras de proteínas fueron diluidas en un volumen final de 1 mL que contenía 200 µL de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro SmartSpec Plus de BioRad. La concentración de las muestras se determinó interpolando en la curva de calibración. Para determinar la concentración de proteínas a través de la utilización del fluorómetro Qubit®

2.0, se procedió a realizar una curva de calibración utilizando los estándares de 0, 200 y 400 ng de BSA en buffer TE con 2 mM de azida sódica y el fluoróforo del kit correspondiente. Esta curva puede ser guardada y utilizada para mediciones posteriores sin la necesidad de volver a calibrar el equipo. Para la preparación de tanto los estándares como de la muestra se mezcló vigorosamente 200 μ L de solución Qubit protein buffer con 1 μ L de Qubit protein reagent en vortex y a continuación, se tomó 199 μ L de la mezcla y se agregó 1 μ L de extracto de proteína a cuantificar; se mezcló nuevamente muy bien y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 min antes de medir. Dicha mezcla es estable hasta 3 h luego de preparada. Se debe utilizar tubos ultra-transparentes para no afectar la medición.



5.4 Western Blot.

5.4.1 Electroforesis de proteínas.

Para la separación de proteínas de cada una de las muestras colectadas, se cargó entre 50 μ g de proteínas totales que fueron diluidas en tampón de carga 1X (50mM Tris-HCl pH 6,8; 5%p/v β -mercaptoetanol; 2%p/v SDS; 10%v/v glicerol; 0,1%p/v azul de bromofenol) y denaturadas a 95°C por 5min. Estas muestras se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida (Sigma) al 30% (29%p/v acrilamida, 1%p/v bisacrilamida), compuesto por un gel separador de proteínas en la parte inferior

(acrilamida/bisacrilamida al 10%p/v; 375mM Tris-base pH 8,8; 0,1%p/v SDS; 0,1%p/v persulfato de amonio (Sigma) y 0,04%v/v TEMED (Sigma)) y en la parte superior un gel concentrador (acrilamida/bisacrilamida al 5%p/v; 125mM Tris-base pH 6,8; 0,1%p/v SDS; 0,125%p/v persulfato de amonio y 0,125%v/v TEMED). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara con tampón de electroforesis (25mM Tris-base; 250mM glicina; 0,1%p/v SDS; pH 8,3) aplicando un voltaje constante de 140-150v.

5.4.2 Transferencia a membrana de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para la transferencia, se superpuso el gel sobre la membrana de nitrocelulosa, ambos entre papel filtro, los cuales fueron fijados con una abrazadera y se introdujeron dentro de una cámara con tampón de transferencia 1X (25mM Tris base; 192mM glicina pH 8,8; 20%v/v metanol). Para generar el traspaso de las proteínas desde el gel a la membrana, se aplicó una corriente eléctrica constante de 350mA por 1,5h. Posteriormente, la eficiencia de transferencia se evaluó tiñendo la membrana de nitrocelulosa con Rojo Ponceau S (0,1%p/v rojo Ponceau S, 5%v/v ácido acético; Sigma), colorante que se une rápida y reversiblemente a las proteínas mientras que el gel se tiñó con el colorante orgánico azul de Coomassie.

5.4.3 Boqueo, incubación con anticuerpos y revelado.

La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con tampón Tris-base salino TBS-Tween 20 (72,3mM NaCl; 20,7mM Tris pH 7,4; 0,1%v/v Tween 20) y 5% leche descremada por 1h en agitación y posteriormente fue incubada con anticuerpo primario (Tabla N°5) diluido en solución de bloqueo por alrededor de 16h a 4°C. Después de lavar 5-8 veces por 5min con tampón TBS-Tween 20, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (Tabla N°5) diluido en solución de bloqueo por 2h a temperatura ambiente. La actividad de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) conjugada al anticuerpo secundario fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial “Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus” (PerkinElmer). A temperatura ambiente, el sustrato de la enzima, H₂O₂, se mezcló en igual proporción con el reactivo luminol, mezcla que fue esparcida en la membrana de nitrocelulosa para gatillar la reacción quimioluminiscente. La película autorradiográfica (Thermoscientific) fue expuesta por 3-10min a la reacción enzimática superponiéndola a la membrana. La señal en la película autorradiográfica fue revelada en solución de revelado y posteriormente fue fijada en solución fijadora. En algunos casos la membrana fue lavada e incubada a 60°C con solución de “stripping” (62,5mM Tris-HCl pH 6,8; 100mM β-mercaptoetanol; 2%p/v SDS) alrededor de 20min para la inmunodetección con un anticuerpo diferente.

5.5 Análisis estadístico.

En los datos que involucran microscopía confocal, el análisis estadístico fue realizado usando los programas GraphPad Prism 5.0 y Microsoft Excel 2013. Todos los datos son presentados como valor de la media \pm SEM de tres o más experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas entre los diferentes tratamientos de los grupos fueron realizados usando test-t de Student de datos no pareados, o mediante Anova seguido por el post-test Bonferroni, según se indique en la figura. Estadísticamente significativos fueron consideradas para un intervalo de confianza del 95 %, diferencias con un valor p bajo 0,05. A los valores $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$ se les asignó significancias estadísticas crecientes (*; ** y ***, respectivamente). Para el análisis estadístico de los registros electrofisiológicos, los datos se representaron como la media \pm el error estándar de la media. Todos los experimentos se realizaron en, al menos, tres ratones por condición. Las diferencias entre los diferentes grupos se evaluaron usando el t-test para dos colas, ya que los datos siguieron una distribución normal. Estadísticamente significativo fue considerado diferencias con un valor p de 0,05, donde $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: ** y $p < 0,001$: ***. La nomenclatura utilizada en las figuras describe como n al número de aparatos postsinápticos, uniones neuromusculares y fibras musculares registradas y como N el número de animales por cada condición.

6. Resultados

6.1 Estandarización de electroporación del músculo LAL.

6.1.1 La electroporación del músculo *Levator auris longus* es altamente eficiente.

Previamente ha sido reportado una gran variedad de protocolos de electroporación *in vivo* de tejido muscular, donde han sido ensayados distintos parámetros como el voltaje, así como el número y la duración de los pulsos [204]. Con el fin de determinar la eficiencia de electroporación del músculo LAL se utilizó un protocolo estándar de 5 pulsos con una duración de 20 ms cada uno a una frecuencia de 1 Hz y ajustando el campo eléctrico a 100 V / cm [226] (figura 1A). Utilizando una concentración de 8 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ del plasmidio que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato en un volumen total de 10 μL de PBS 0,1 M se evidencia una alta eficiencia de electroporación, como se muestra para un músculo LALr y en cortes transversales de músculo completo (figuras 1B - 1C). Bajo estas condiciones, la eficiencia promedio alcanzada es de un $66,7 \pm 5,94 \%$ (* $p < 0,0165$; test-t) de fibras electroporadas (figura 2B). Además, se observó una disposición de fibras musculares similar a lo documentado para este músculo, así como también la ausencia de zonas localizadas de daño que pueden producirse por la colocación del ADN, daño mecánico o la electroporación misma (figura 2A). Más aún, utilizando la cuantificación de núcleos centrales como parámetro de regeneración muscular ante daño, se observa un

porcentaje de $5,9 \pm 2,70$ % de fibras electroporadas que presentan núcleos centrales, que no es significativamente distinto en comparación al de fibras no electroporadas, cuyo promedio es de un $3,2 \pm 1,07$ % (figura 2C). Estos datos muestran que luego de 21 días después de la electroporación un alto porcentaje de fibras del músculo LAL continúan expresando la proteína fluorescente roja Tomato y no presentan alteraciones inducidas por el procedimiento.

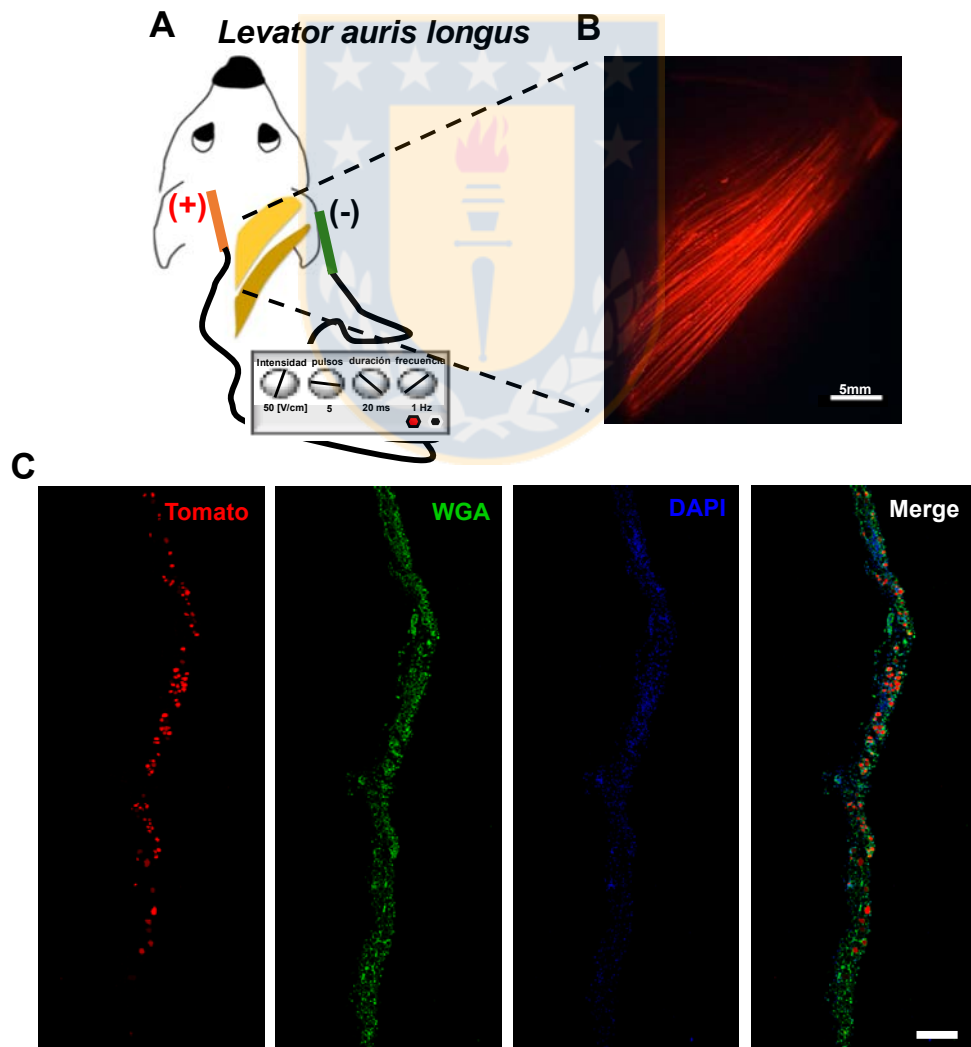


Figura 1 Electroporación de músculo *Levator auris longus* (LAL).

Músculos LAL fueron electroporados *in vivo* con 80 µg de plasmidio que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato utilizando un protocolo de 5 pulsos cuadrados de 100 V/cm y 20 ms de duración a una frecuencia de 1Hz (A). Luego de 21 días después de electroporación, músculos LAL fueron disecados para montaje completo y fijados durante 90 min en formaldehído 1,5 % para evaluar la detección de la proteína Tomato (B). Posteriormente los músculos fueron embebidos en OCT para la obtención de criosecciones transversales de 20 µm. Tinciones con WGA (verde) y DAPI (azul) fueron realizadas para evidenciar las fibras electroporadas (rojo) (C). Imágenes de planos z fueron adquiridas mediante exploración de inclinación con un objetivo de 25 X y son representativas de al menos seis músculos electroporados. (Barra panel superior: 5mm; Barra panel inferior: 200 mm).



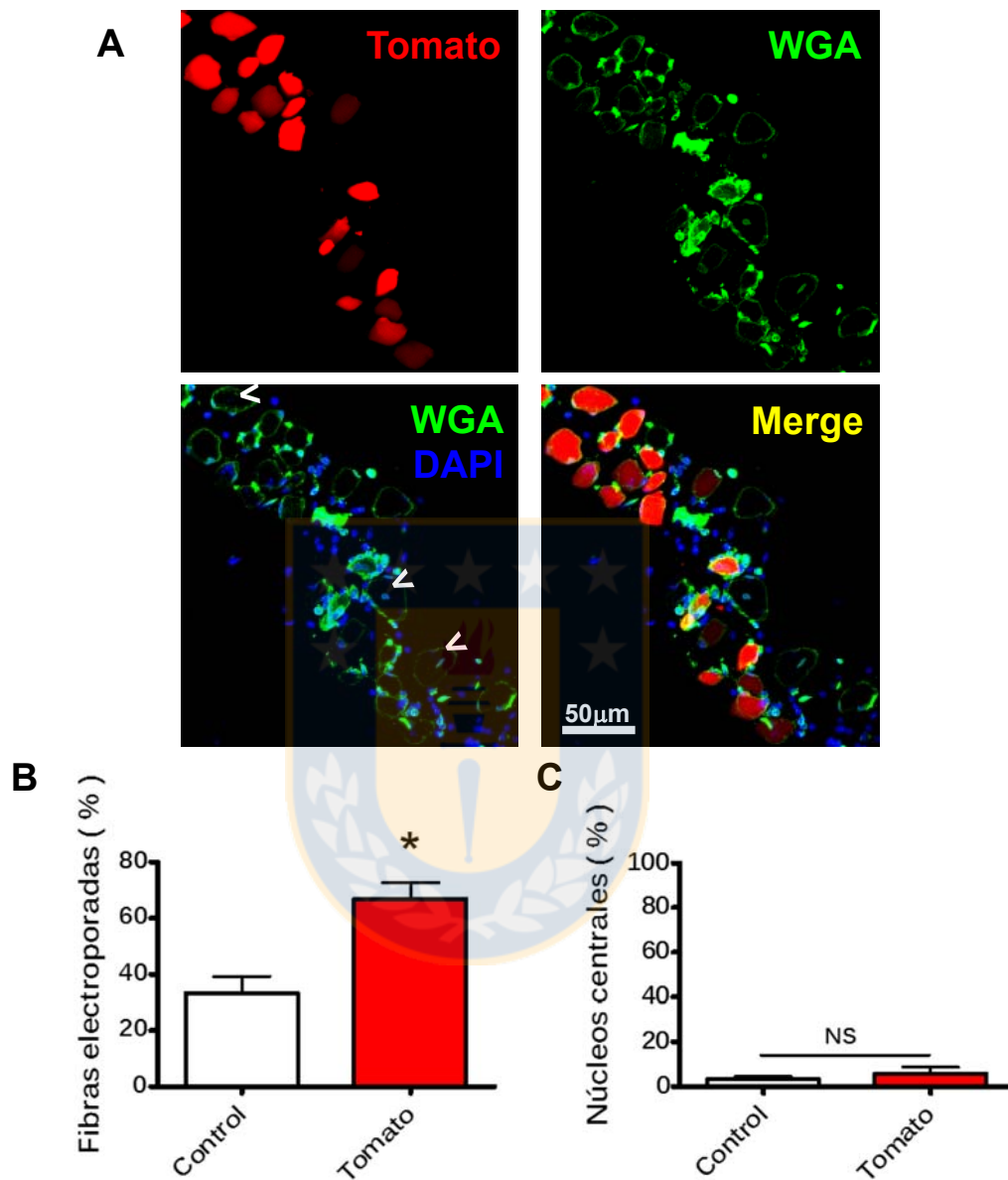


Figura 2 Eficiencia de electroporación del músculo *Levator auris longus* (LAL).

Músculos LAL fueron electroporados *in vivo* con el plasmidio que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato. Luego de 21 días después de electroporación, los músculos fueron procesados para obtener cortes transversales de 20 μ m en crióstato (A). WGA-488 (verde) y DAPI (azul) se utilizaron para marcar glicoproteínas de membrana y núcleos, respectivamente. La eficiencia de electroporación (B) se cuantificó como el porcentaje de miofibras positivas para la proteína Tomato comparado con fibras musculares, considerando el total de miofibras marcadas con WGA-488. Núcleos centrales (C)

(cabezas de flechas) mostrados en el panel inferior izquierdo de A, fueron cuantificados respecto a su distribución co-localizada con WGA. (Barra: 50 μ m), (*p< 0,05; test-t).

6.1.2 La electroporación del músculo LAL no modifica la morfología postsináptica en la UNM de vertebrado.

Se ha reportado que la electroporación permite el análisis de la distribución de proteínas en regiones específicas del músculo. Sin embargo, no se ha estudiado en detalle si la utilización de la electrotransferencia *in vivo* así como la sobreexpresión de una proteína fluorescente control podrían inducir cambios en la morfología del aparato postsináptico. Para estudiar esta posibilidad, músculos LAL de ratones adultos que sobre expresan la proteína fluorescente exógena Tomato a 10 y 21 días después del procedimiento, fueron comparados con animales control. La tinción para la subunidad α de AChR evidencia morfologías similares tipo pretzels del componente postsináptico, indicando que no se altera la distribución de los AChRs sobre la membrana postináptica de fibras musculares electroporadas respecto de animales control (figura 3A). Sin embargo, considerando los cambios morfológicos del aparato psotsináptico que subyacen al proceso de maduración de la UNM durante el desarrollo postnatal temprano (primeros tres meses) y que permiten alcanzar las formas tipo pretzels, observadas en etapas adultas [52], nosotros estudiamos si es que en esta etapa, la transgénesis transiente de la proteína exógena Tomato altera la transición placa a pretzel de los AChRs (figura 3B). Para ello, se electroporaron ratones en P21 y se analizó la morfología del aparato postsináptico a P42.

En este lapso de tiempo co-existe un importante porcentaje de pretzels con morfología de tipo inmaduro y es donde comienza una transición relevante a estructuras postsinápticas maduras [52]. Así, el estudio de la expresión o silenciamiento de proteínas en la transición morfológica de los pretzels, podría dar cuenta del requerimiento de estas moléculas en el mantenimiento del aparato postsináptico. Luego de 3 semanas, planos z de microscopía confocal fueron proyectados en tres dimensiones para cuantificar los aparatos postsinápticos en base a su morfología. Los resultados indican que en este estadio, se cuantificaron un porcentaje similar de estructuras postsinápticas tipo placas perforadas, pretzels inmaduros con forma tipo C, así como pretzels maduros en fibras electroporadas y en fibras de animales control (figura 3D). Se observó la total ausencia de estructuras tipo placa y un escaso porcentaje de pretzels fragmentados, característicos de la etapa neonatal y de envejecimiento o desórdenes neuromusculares, respectivamente. Considerando que los aparatos postsinápticos además de incrementar en complejidad morfológica lo hacen también incrementando el tamaño [59], proyecciones de máxima intensidad obtenidos de planos z de microscopía confocal fueron cuantificados según el área (figura 3E) y el perímetro (figura 3F) de los pretzels. Para ambos parámetros no se observaron diferencias significativas en relación a los animales control. Los resultados indican un área promedio de $328,0 \pm 11,13 \mu\text{m}^2$ y un perímetro de $141,7 \pm 10,37 \mu\text{m}$ en aparatos postsinápticos de fibras electroporadas en relación a animales control que presentaron valores de área y perímetro de $355,6 \pm 15,50 \mu\text{m}^2$ y $162,2 \pm 7,99 \mu\text{m}$, respectivamente. Estos resultados sugieren que la electroporación de

músculo LAL para sobre-expresar un plasmidio que codifica para una proteína fluorescente control, no afecta significativamente la estabilidad de los AChRs ni los cambios morfológicos relativos a la maduración del componente postsináptico en la UNM de vertebrado.



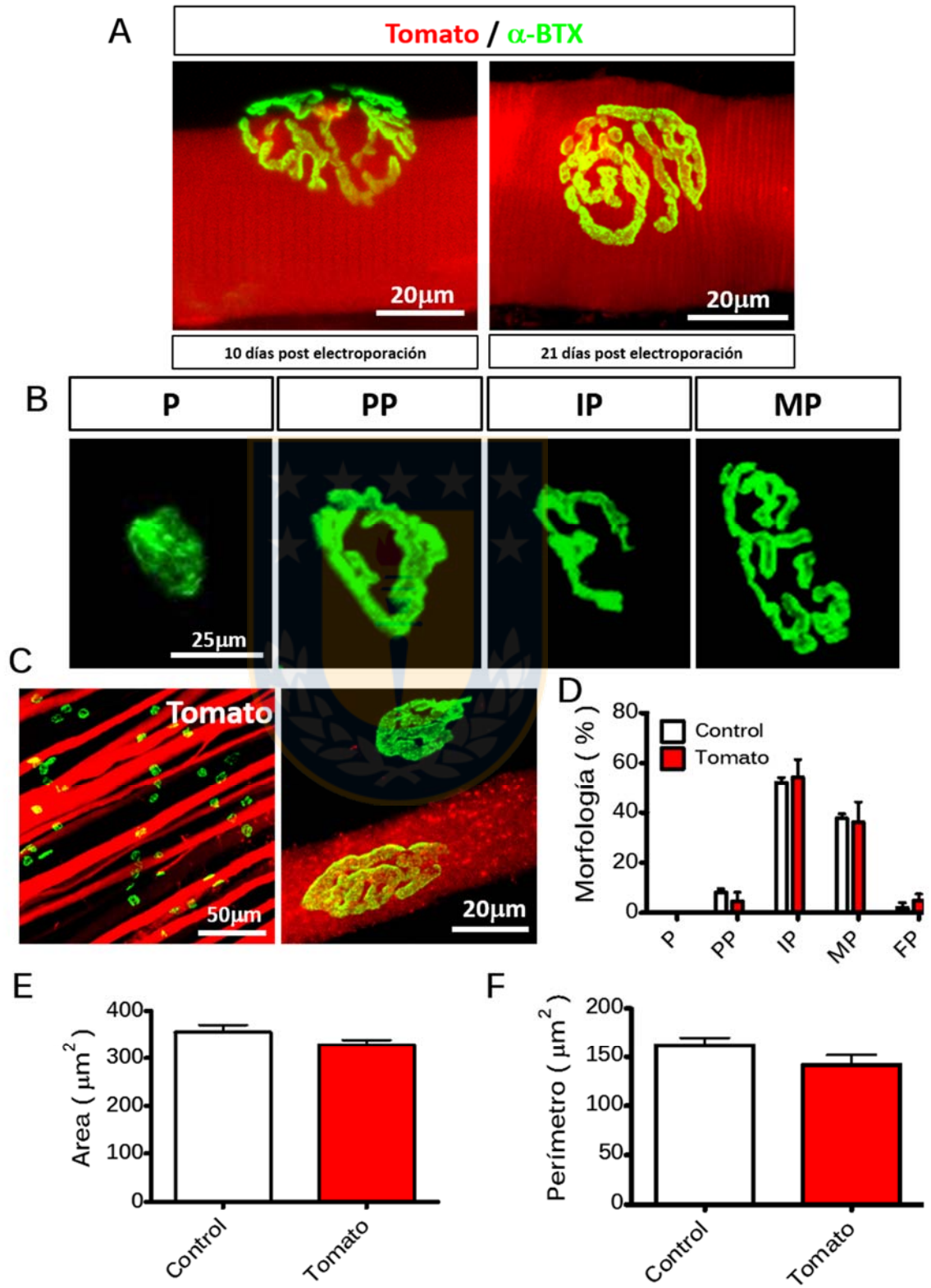


Figura 3 La sobreexpresión *in vivo* de Tomato no altera la maduración del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.

Durante el desarrollo postnatal, el proceso de maduración cursa con cambios morfológicos postsinápticos donde pequeñas placas de densidad uniforme del AChRs son transformadas en estructuras de mayor tamaño ramificadas con forma de pretzel. Las diferentes morfologías observadas en la transición son: placa (P), placa con perforación (PP), pretzel inmaduro (IP), pretzel maduro (MP) y pretzel fragmentado (FP). Músculos LAL fueron electroporados con el plasmidio Tomato (fibras rojas) en estadio postnatal P23. Animales sin electroporar del mismo estadio fueron usados como control. Los aparatos postsinápticos de músculos electroporados mostraron una distribución de morfologías normal a los tiempos evaluados (A). Mediante tinción con α BTX-488 (verde) se determinaron cambios en la transición morfológica placa a pretzel (B), área (C) y perímetro (D) a P44. (* $p < 0,02$, ANOVA). Se muestran imágenes representativas de al menos 3 animales por cada condición. Barras: 20 μ m en A, 25 μ m en B y 50 y 20 μ m en C, respectivamente.

6.1.3 La transgénesis transiente mediante la técnica de electroporación del músculo LAL permite *estudiar la estructura y función de la UNM de vertebrados.*

En la UNM de vertebrados, las motoneuronas liberan señales moleculares indispensables no sólo para producir la contracción muscular sino que también para la mantención estructural de la sinapsis [236]. Sin embargo, la distribución exacta de proteínas de andamiaje que se asocian a los AChRs en subdominios de la fibra muscular, sugieren que la localización y función de proteínas musculares puede afectar la correcta aposición y comunicación entre el axón motor y el músculo. Con la finalidad de analizar un posible efecto de la expresión muscular de la proteína Tomato por electroporación sobre la relación estructural entre los terminales sinápticos, músculos LAL fueron procesados a 10 y 21 días después de electroporados y luego inmunomarcados para los componentes pre y post sinápticos. Los resultados indican que en ambos tiempos las motoneuronas se

distribuyen en el músculo LAL contactando los terminales postsinápticos de fibras electroporadas y donde los terminales de axones motores se posicionan en la forma yuxtapuesta descrita para la UNM de vertebrado con el terminal postsináptico (figura 4). Por lo tanto, los resultados no muestran evidencia de que la aposición entre los aparatos pre y post sinápticos se encuentre afectada por la electroporación de la proteína fluorescente Tomato.



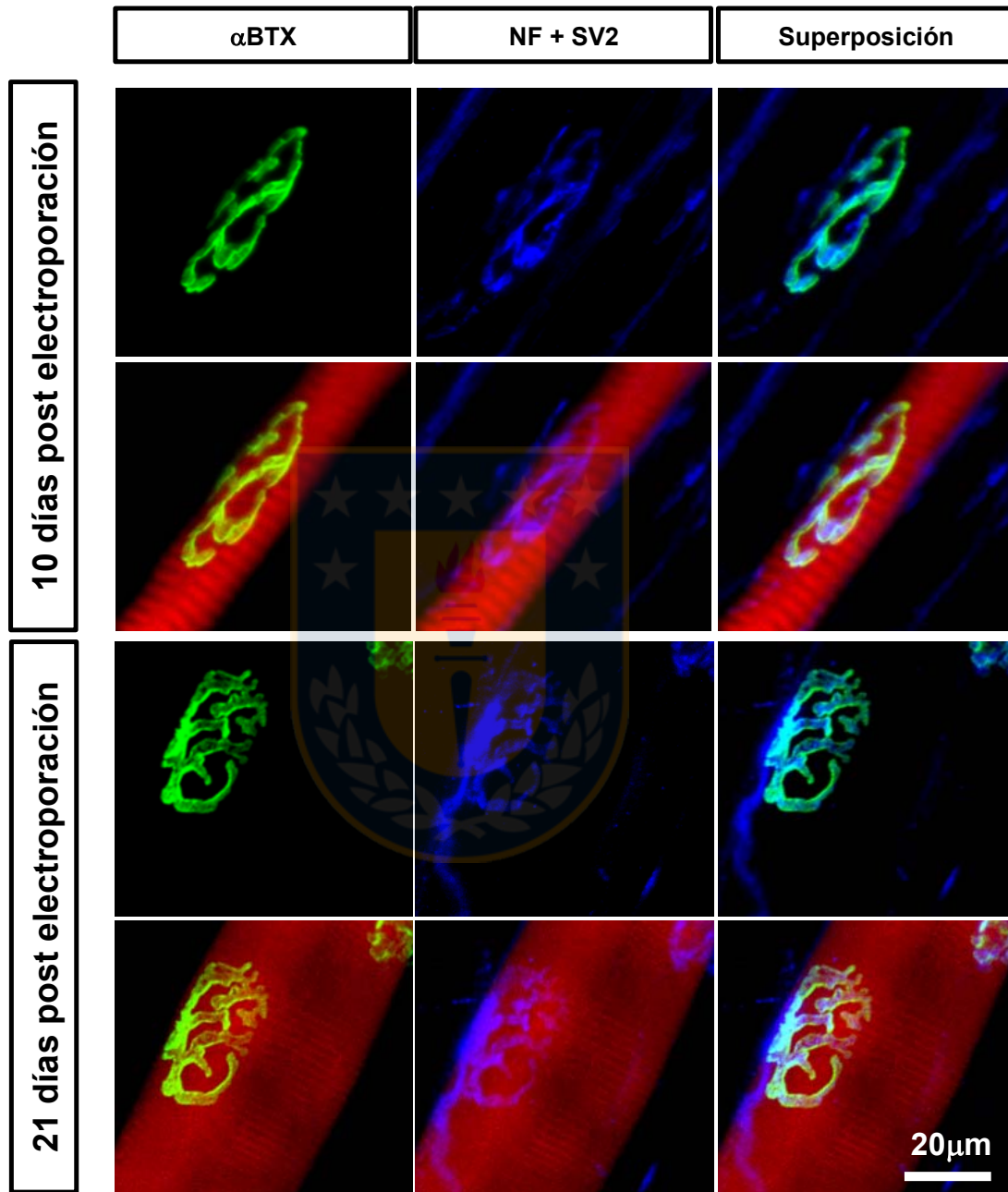


Figura 4 La electroporación de músculo LAL con la proteína fluorescente Tomato no altera la morfología de los componentes de la sinapsis neuromuscular.

Músculos LAL de ratones adultos fueron electroporados *in vivo* con 80 μ g del plasmidio que codifica para la proteína fluorescente Tomato. Después de 10 y 21 días, preparados de músculo completo de animales control y que sobreexpresan la proteína Tomato (rojo),

se inmunomarcaron para las proteínas SV2 y neurofilamento del terminal presináptico (azul), mientras que α BTX-488 se utilizó para marcar los AChRs post sinápticos (verde). Se observó una morfología postsináptica característica de pretzels adultos e inervados por terminales presinápticos que cubren los AChRs a ambos tiempos post electroporación. Se muestran fotos representativas de al menos seis animales por condición son mostradas. (Barra: 20 μ m).

Para examinar si la sobre-expresión de la proteína Tomato afecta la transmisión sináptica de la UNM, en colaboración con el Laboratorio de Neurotransmisión de la Universidad de Sevilla dirigido por la Dr. Lucía Tabares, estandarizamos el registro intracelular de fibras musculares en preparados *ex vivo* de músculo LAL previamente electroporados. Para ello, utilizamos el registro intracelular de fibras musculares con el fin de estudiar los potenciales de placa terminal (EPP) en preparados *ex vivo* de músculo LAL de ratones de 21 días postnatal, que expresaron la proteína Tomato durante siete días. Una baja frecuencia de estimulación (0,5 Hz) del nervio facial fue utilizada para generar respuestas evocadas cuyas amplitudes, normalizadas a -70 mV, fueron basados en el promedio de 150 estímulos de cada una de las fibras analizadas. Los resultados obtenidos indican valores similares en la amplitud de EPPs (figura 5A) para fibras musculares de animales electroporados cuyo valor de amplitud promedio corresponde a $46,12 \pm 5,60$ mV, comparados con los registros intracelulares de fibras musculares de animales control, donde la amplitud promedio fue de $39,41 \pm 3,41$ mV, los que resultaron no ser significativamente distintos (figura 5B). Del mismo modo, encontramos que la amplitud promedio de la liberación espontánea de neurotransmisor (mEPPs) para animales electroporados resultó ser de $1,545 \pm 0,12$ mV, valor estadísticamente similar al valor

promedio de animales control de $1,252 \pm 0,09$ mV (figura 5C). Considerando que la amplitud de los EPP no solo depende del número de vesículas sinápticas liberadas (o contenido cuantal, QC) desde el componente presináptico sino que también de factores postsinápticos [237], se analizó el tamaño de QC considerando el promedio de amplitudes de mEPPs durante un período de 5 min de registro continuado de cada terminal nervioso (figura 5D). Las observaciones indican que la electroporación de músculo LAL no afecta el número de vesículas liberadas por potencial de acción, donde se obtuvieron valores de $31,05 \pm 1,56$ y $28,62 \pm 2,58$, para fibras musculares control y electroporadas, respectivamente. Finalmente, examinamos las características de la facilitación y depresión sináptica a corto plazo mediante la estimulación del nervio facial a una alta frecuencia de 100 Hz durante un período de 1s, como se muestra en los trazos representativos (figura 6A). Bajo estas condiciones, un reciclaje eficiente así como también un recambio de las vesículas sinápticas de reserva son requeridos durante el tren de estimulación. Los resultados indican que, en las fibras musculares electroporadas con el plasmidio que codifica para la proteína Tomato, el grupo de vesículas listo para ser liberado (RRP) así como las vesículas que son reclutadas desde el grupo de vesículas de reserva son comparables en su comportamiento a los datos observados para animales control evaluado como índice de depresión (figura 6B) y facilitación por pulso pareado (figura 6C). En su conjunto, estos datos muestran que la electroporación de músculo LAL para sobreexpresar la proteína fluorescente roja Tomato no afecta la transmisión

sináptica de la UNM de vertebrados, manteniendo inalterados los mecanismos moleculares de liberación y respuesta al neurotransmisor ACh.

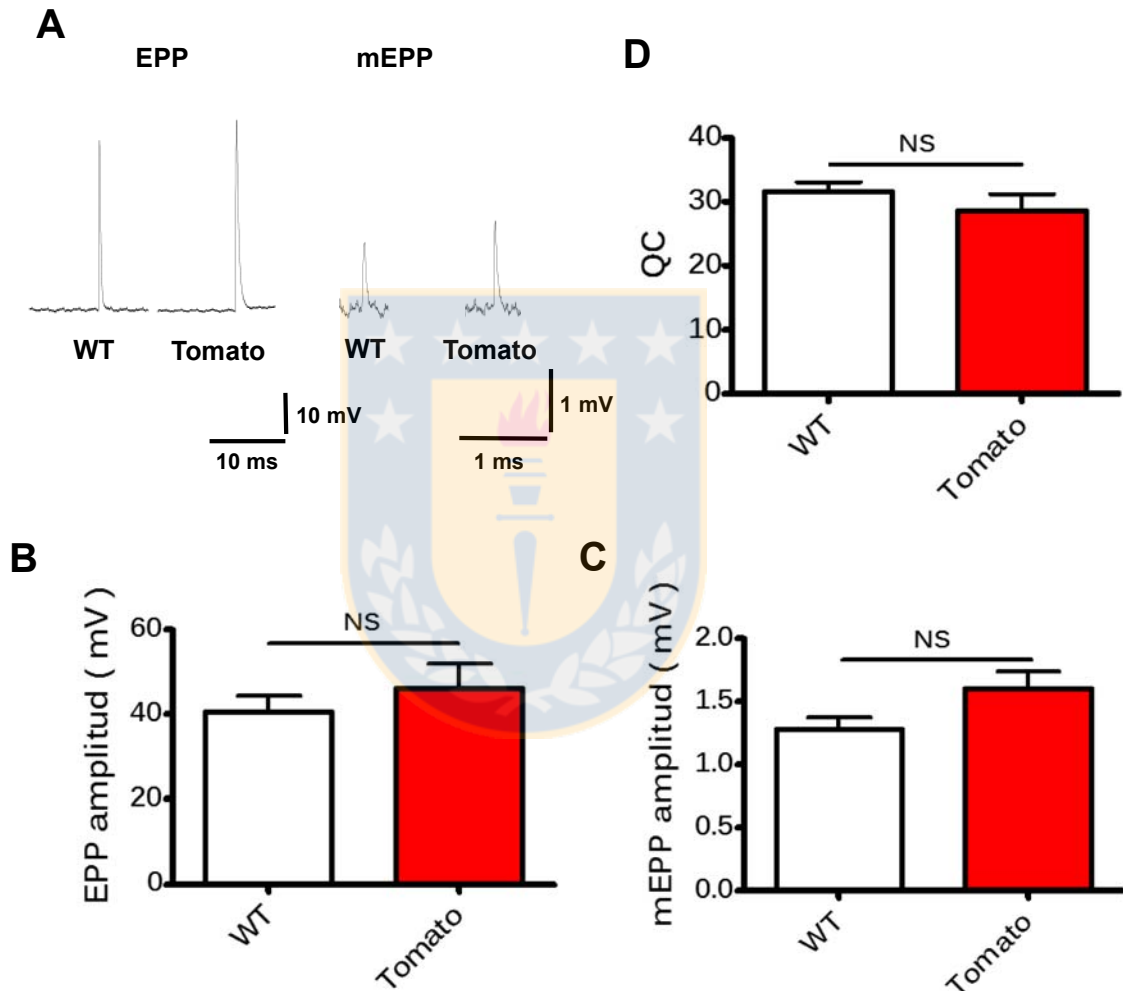


Figura 5 La sobreexpresión de la proteína fluorescente roja Tomato no afecta la liberación evocada y espontánea de neurotransmisor en fibras musculares de LAL a P21-P23.

Músculos LAL fueron electroporados a P14 con el plasmidio que codifica para la proteína fluorescente Tomato. Siete días después, los músculos fueron procesados con un segmento del nervio facial intacto para realizar registro intracelular *ex vivo* de miofibras. Animales no electroporados del mismo estadio fueron utilizados como control. Se

muestran trazos representativos de EPP y mEPP obtenidos a 0,5 Hz de estímulo (A) en presencia de μ -conotoxina para bloquear la contracción muscular. Se cuantificaron las amplitudes de EPP (B) de 150 estímulos, mientras que el contenido cuantal (D) fue el promedio de los primeros 100 estímulos evocados obtenidos mediante el método directo. Las mEPP (C) corresponden el promedio de un registro continuo durante 5 min para cada una de las fibras. Los resultados indican que la electroporación con la proteína Tomato no altera la transmisión neuromuscular comparado con el control (Control: N: 3, n: 23; Tomato N: 3, n: 24;. NS: $p > 0.05$, test-t no pareado).



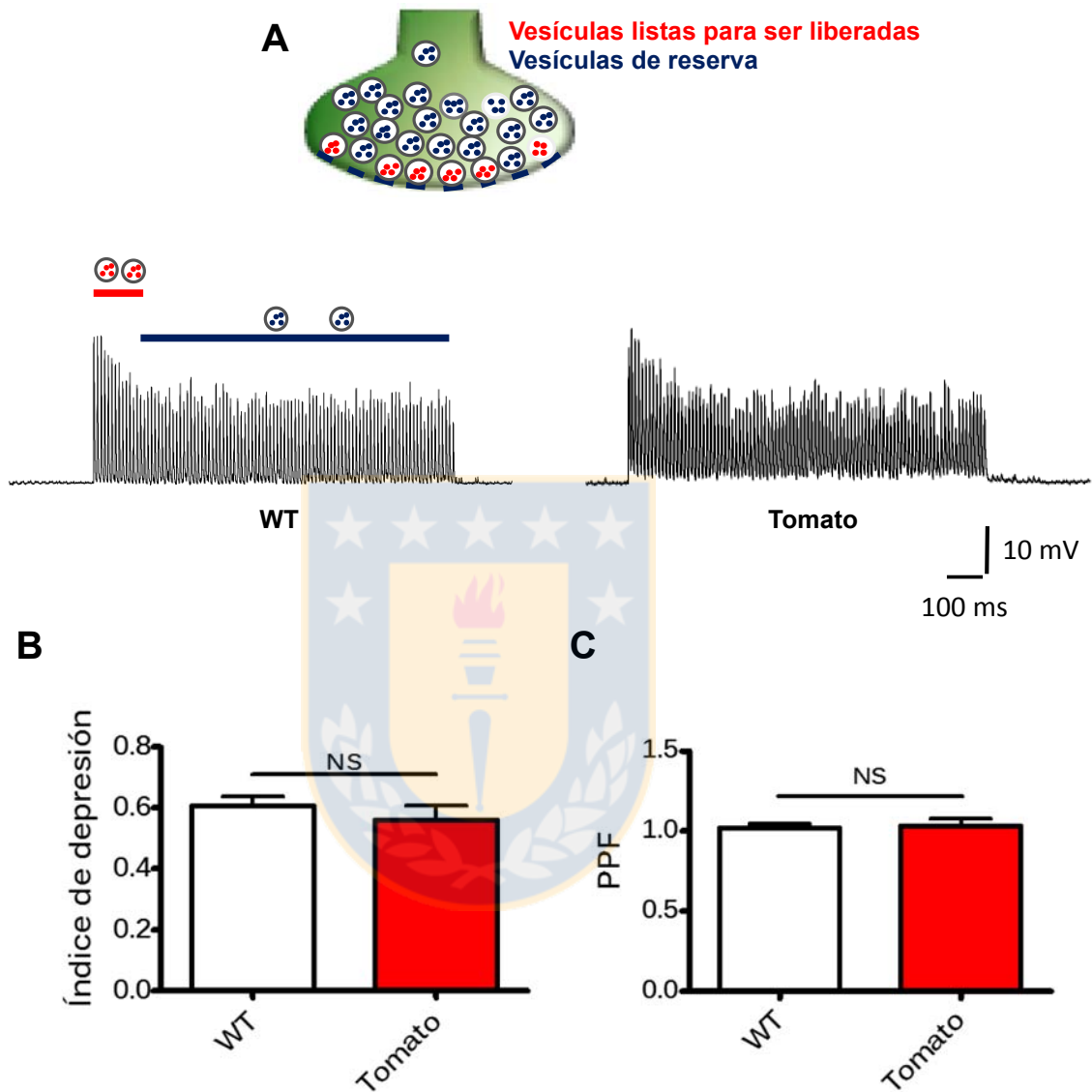


Figura 6 La sobreexpresión de la proteína Tomato no altera la dinámica de liberación del neurotransmisor ACh.

Músculos LAL fueron electroporados a P14 con el plasmidio que codifica para la proteína fluorescente roja Tomato. Siete días post electroporación, preparaciones *ex vivo* de músculos electroporado y control fueron analizadas a través de registro electrofisiológico intracelular. Se muestran trazos representativos de un tren de estimulación a 100 Hz durante 1 s (A). El índice de depresión y facilitación por pulso pareado indican un estado normal de depresión y facilitación en la plasticidad sináptica comparados con las miofibras

de animales control (Control: N: 3, n: 23; Tomato N: 3, n: 24; NS: $p > 0.05$, test-t no pareado).

6.2 La vía ACh/CDK5 regula la agregación de los AChR durante el estadio postnatal.

Durante el desarrollo embrionario de la UNM de vertebrados, los agregados de AChRs localizados en el sarcolema no se encuentran en completa aposición con los terminales nerviosos presinápticos [33]. Aun cuando los terminales motores estabilizan a los AChRs mediante la secreción de agrina en regiones postsinápticas [236], ha sido reportado que ACh activa a Cdk5 para dispersar los agregados de AChRs que no son estabilizados por agrina en regiones extrasinápticas. Cdk5 es un regulador clave en el desarrollo neuronal [33, 238], que ha sido asociado con componentes del citoesqueleto [203, 239]. Evidencia previa sugiere que Cdk5 cumple la función desagregante de los AChR a través de la proteína de filamentos intermedios nestina [240-242]. Sin embargo, se conocen escasos antecedentes *in vivo* en etapas postnatales acerca de la regulación de la función de nestina que se encuentren asociados a los cambios en la dinámica morfológica de las células o de subdominios de membrana específicos como el aparato postsináptico de la UNM [243, 244]

6.2.1 Nestina es distribuida en regiones de baja densidad de agregados del AChR en la UNM de vertebrados.

En la UNM madura, nestina se localiza en el componente postsináptico formando una red filamentosa bajo y entre los pliegues de distribución de los AChRs, rodeando los núcleos de fibras musculares y asociados con la línea Z, localizados en sarcómeros adyacentes a terminales sinápticos [245]. Sin embargo, se desconoce la distribución de nestina durante la maduración de la UNM. Utilizando proyecciones de máxima intensidad obtenidas a través de microscopía confocal, se analizó la localización endógena de nestina en etapas postnatales tempranas a P0, P10, P21 y P42. El dominio postsináptico fue marcado con α BTX. Los resultados muestran que a P0, nestina es distribuida en las cercanías del terminal postsináptico (figura 7, panel superior). Además, al igual que como ha sido previamente descrito en animales adultos [245], también es posible observar inmunorreactividad en la zona de las líneas Z del sarcómero en regiones conocidas como costámeros. En el curso de la maduración de la UNM de vertebrados podemos observar que a P10, nestina comienza a concentrarse en las zonas de los terminales postsinápticos mientras que a P21, se observa una mayor distribución de nestina en las regiones carentes de AChRs, principalmente circunscribiendo las zonas de agregados de AChR. Posteriormente, en P42 podemos observar una exclusión de nestina de las zonas de agregación del AChR, como ha sido previamente reportado para la UNM de ratas adultas, donde nestina se localiza en la zona sináptica de la UNM en regiones profundas y extendiéndose entre los pliegues secundarios del sarcolema [245]. Los resultados

muestran que la proteína de filamentos intermedios nestina tiene una distribución dinámica durante la maduración postsináptica de la UNM.



α BTX / nestina

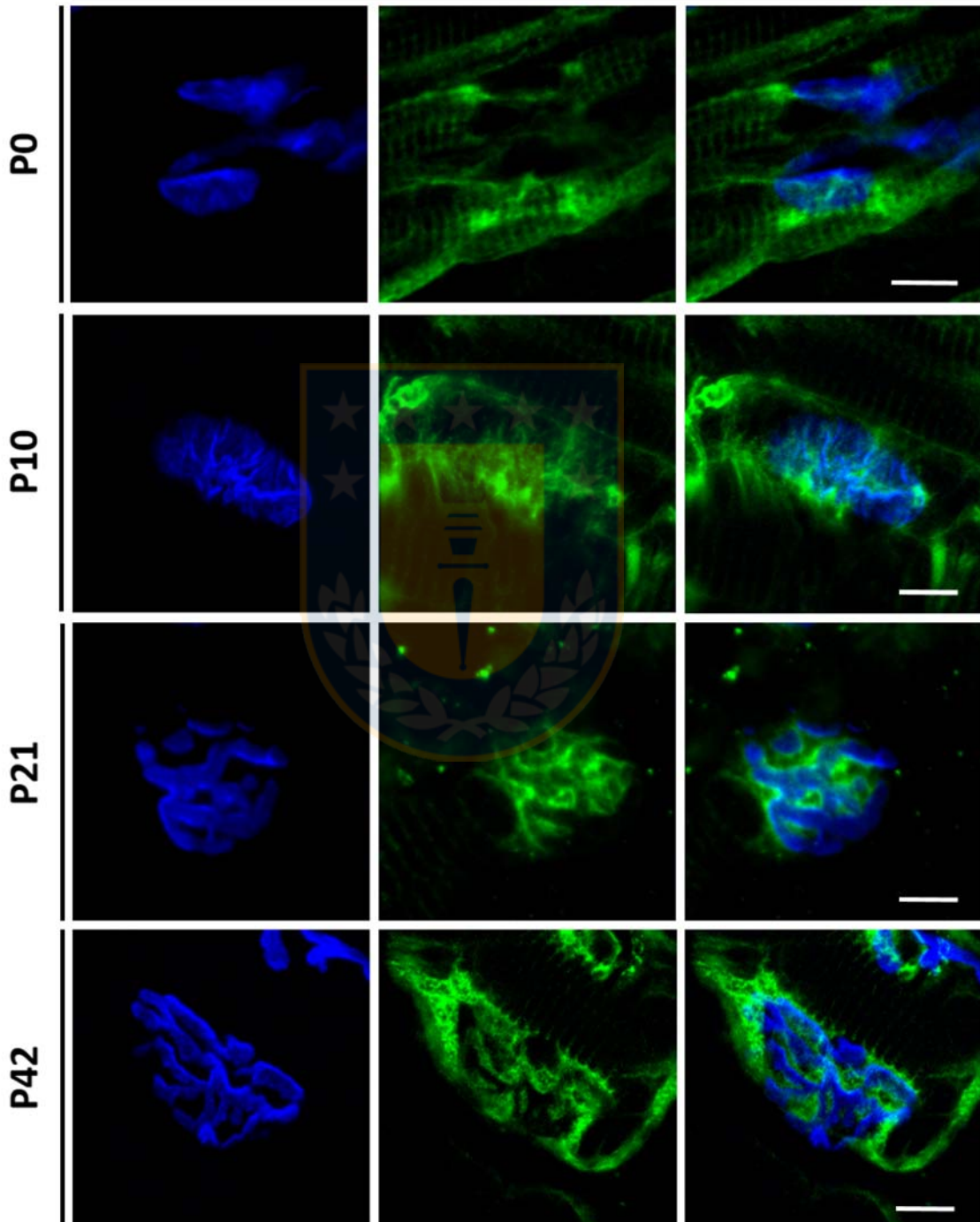


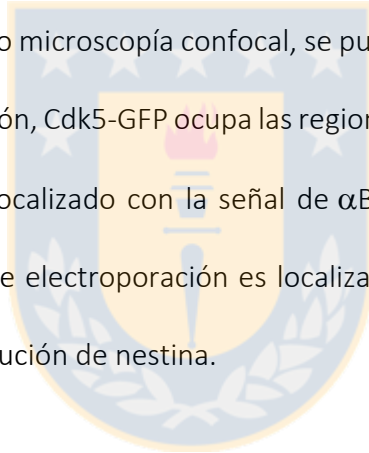
Figura 7 Distribución postnatal de la proteína de filamentos intermedios nestina en la UNM de vertebrado.

Músculos LAL de ratón fueron disecados a 0, 10, 21 y 42 días postnatales. Las muestras fueron previamente tratadas con péptidos anti fragmento Fab de ratón hecho en burro para aumentar la especificidad de la tinción con un anticuerpo IgG de ratón contra nestina, que posteriormente fue revelado con el anticuerpo anti IgG hecho en burro acoplado a cianina Cy2 (verde). La co-localización con α -BTX (azul) fue ensayada en diferentes tiempos para evidenciar la distribución de nestina en al menos tres animales por estadio. Barra: 10 μ m P0; 5 μ m P10, P21, P42.

6.2.2 Cdk5 es distribuido en regiones de baja densidad de AChRs en el componente postsináptico de la UNM cuando es sobreexpresada *in vivo* en el músculo LAL.

Cdk5 es crítico para el desarrollo neuronal [246] y la regulación de la diferenciación y organización de las células musculares [247-250] quedando evidenciado en la letalidad perinatal de ratones nulos para Cdk5. En cultivos de miotubos ha sido previamente reportado que Cdk5 junto a p35, regulan la activación de la señalización de neurregulina/ErbB [251], requerida para la transcripción de AChRs. A su vez, embriones de ratones nulos para Cdk5 muestran profundas anomalías en el patrón de ramificación nervioso intramuscular con ausencia de células de Schwann [224]. En forma adicional, cultivos primarios de miotubos provenientes de animales nulos para la expresión de Cdk5 tratados con agrina, evidencian un mayor número de agregados de AChR [224], indicando que Cdk5 es requerido para el desarrollo *in vivo* de sinapsis neuromusculares.

Sin embargo, dado el corto período de vida perinatal del ratón nulo para Cdk5 y la condicionalidad de que Cdk5 es necesario para el correcto desarrollo de las células musculares es que este modelo no es útil para estudiar la función de Cdk5 en etapas de maduración postnatal de la UNM *in vivo*. Una adecuada herramienta para profundizar en la comprensión de los mecanismos mediados por Cdk5 es la electroporación *in vivo* de tejido muscular. Utilizando esta estrategia, se estudió la localización de Cdk5 en fibras de músculo LAL mediante su sobreexpresión en fusión con la proteína fluorescente verde GFP (figura 8A). Utilizando microscopía confocal, se puede observar que, luego de 21 días después de electroporación, Cdk5-GFP ocupa las regiones postsinápticas de baja densidad de AChRs cuando es colocalizado con la señal de α BTX (figura 8B). Por lo tanto, Cdk5 sobreexpresado mediante electroporación es localizado en regiones excluyentes de los AChRs, similar a la distribución de nestina.



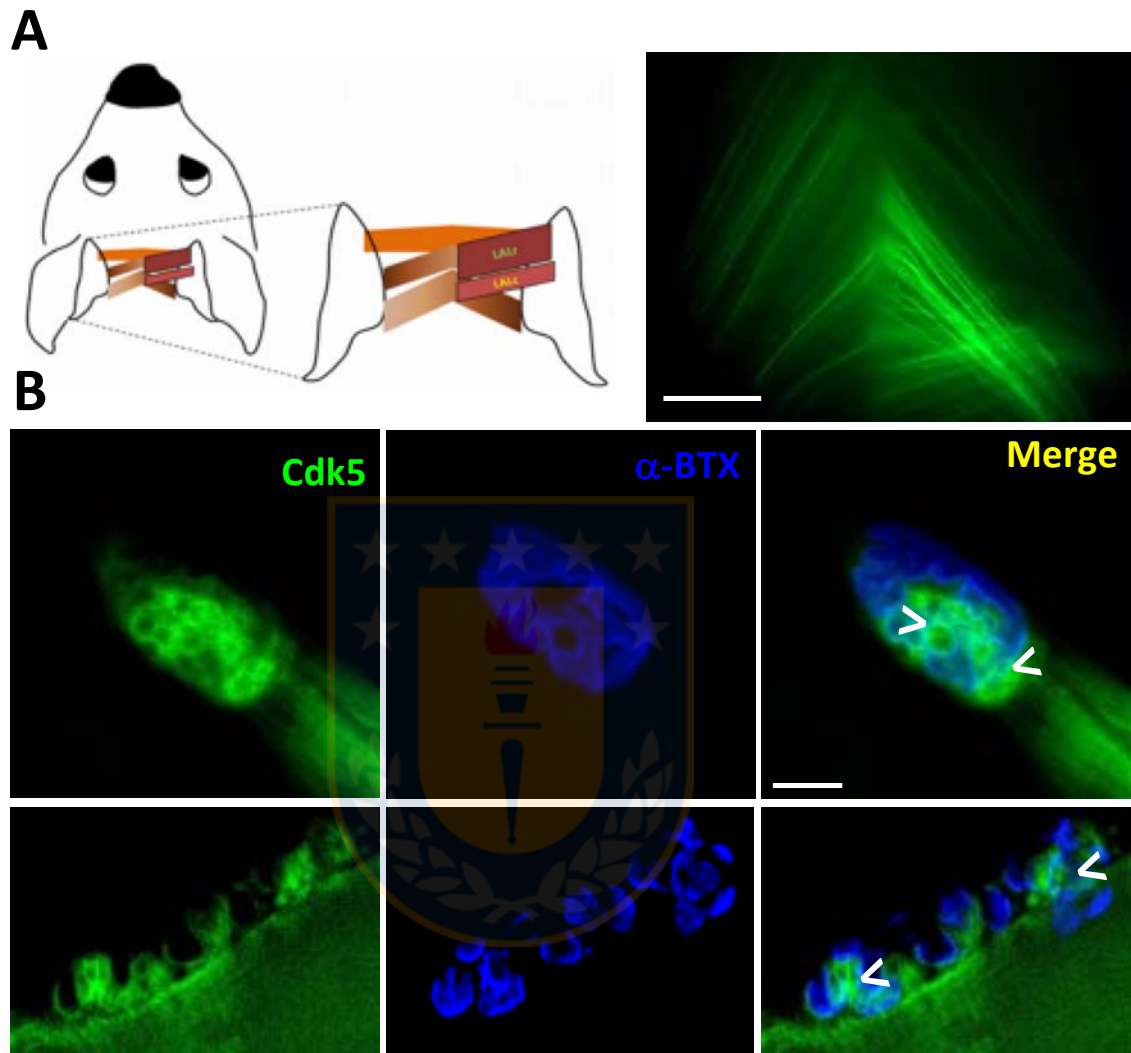


Figura 8 Localización *in vivo* de Cdk5-GFP sobreexpresado en fibras musculares.

Músculos LAL fueron electroporados usando el plásmido que codifica para Cdk5 en fusión con GFP (verde) en P23. Esquema de la localización anatómica de LAL (A). Posteriormente, los músculos electroporados fueron disecados en P44 y analizados en montaje completo, realizando tinciones con α BTX-647 para marcar los AChRs (azul) (B). En los paneles representativos superiores de B, se muestra una proyección de máxima intensidad de planos z de al menos tres animales donde la localización de Cdk5 ocupó las regiones de baja densidad de agregados de AChR (cabezas de flechas). Una vista lateral (paneles inferiores de B) de miofibras electroporadas con Cdk5 indica

6.2.3 La sobreexpresión de Cdk5 altera la maduración del componente postsináptico promoviendo la formación de estructuras fragmentadas.

Dado que Cdk5 sobreexpresado en etapa postnatal de la UNM se localiza en la región postsináptica al igual que nestina, estudiamos el efecto de activar la vía ACh/Cdk5 sobre la agregación de los AChR en etapas postnatales. Con esta finalidad, se sobre-expresó a través de electroporación *in vivo* de músculo LAL de estadio P23 el plasmidio que codifica para la proteína Cdk5-GFP, mientras que como control se sobre-expresó la proteína fluorescente roja Tomato. Luego de tres semanas se analizó la morfología de los aparatos postsinápticos observadas durante la transición placa a pretzel (figuras 9A - B). Los resultados indican que en una condición control existe una población promedio de $57,29 \pm 3,36$ % de pretzel inmaduros con forma tipo O y C, mientras que en las fibras musculares que sobreexpresan Cdk5-GFP este porcentaje es de un $34,36 \pm 5,84$ % (* $p < 0,05$; Anova). A su vez, la población de pretzels maduros en músculos que sobreexpresan Cdk5-GFP es de un $36,37 \pm 5,62$ %, similar al control ($37,22 \pm 0,33$ %). De manera interesante, los datos indican un significativo incremento en la población de pretzels fragmentados en músculos que sobreexpresan Cdk5-GFP cuyo promedio es de un $27,20 \pm 3,65$ % (* $p < 0,05$; Anova) comparado con el control, donde se cuantificó un $3,86 \pm 1,86$ % (figura 9C). Además, se analizó el número de fragmentos aislados que componen cada pretzel, considerando las categorías de 1, 2, 3, 4 y mayor a 4 fragmentos. Los datos indican que frente a la sobre-expresión de Cdk5-GFP se observa una tendencia a disminuir el porcentaje de pretzels compuestos sólo por un fragmento continuo mientras que existe un aumento significativo

de pretzels compuestos por más de 4 fragmentos de un $24,55 \pm 4,74 \%$ (* $p < 0,04$; test-t) en comparación con el control que corresponde a un $8,44 \pm 2,98 \%$ (figura 9D). Con el fin de analizar la distribución de los aparatos postsinápticos en el sarcolema, se estudiaron parámetros de volumen y superficie de los AChR (figura 9E). Los resultados indican que en comparación al control, existe un aumento significativo en el volumen de los pretzels analizados de $2454 \pm 404 \mu\text{m}^3$ (* $p < 0,02$; test-t) respecto de la sobreexpresión de la proteína control Tomato que corresponde a $1311 \pm 174 \mu\text{m}^3$. Además, se encontró una tendencia al incremento de la superficie de los pretzel cuando Cdk5-GFP es sobreexpresado, cuyo valor promedio corresponde a $3999 \pm 590 \mu\text{m}^2$, mientras que el control promedió $2580 \pm 145 \mu\text{m}^2$ (figura 9F). Esta tendencia, al igual que un aumento del volumen, se corresponde con la aparición de aparatos postsinápticos fragmentados. Estos datos permiten sugerir que en etapas postnatales, los efectores de la vía ACh/Cdk5 continúan asociados al aparato postsináptico de la UNM, donde su activación intracelular puede promover la desagregación de los AChRs.

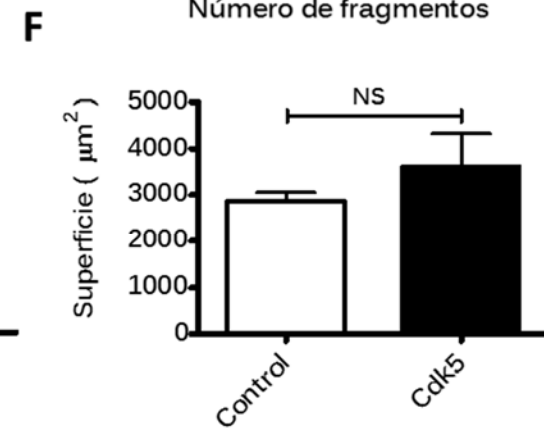
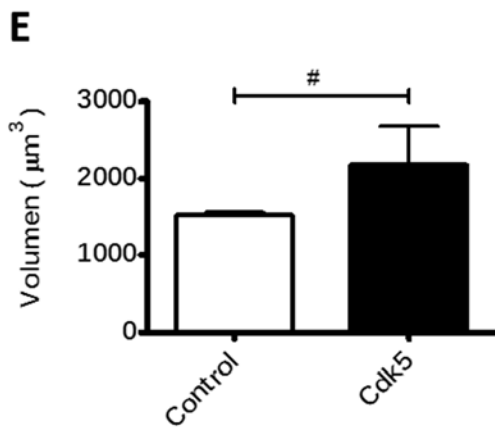
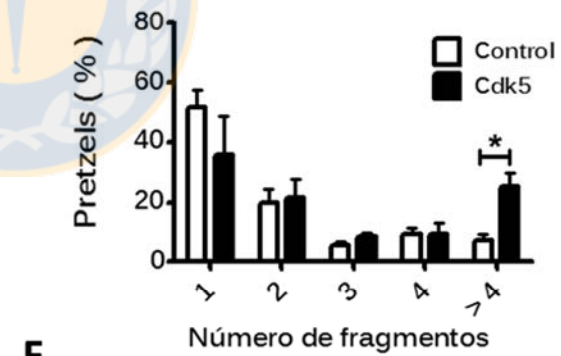
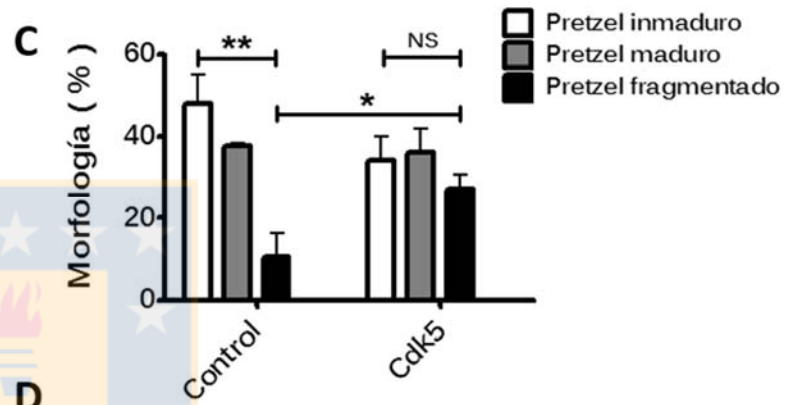
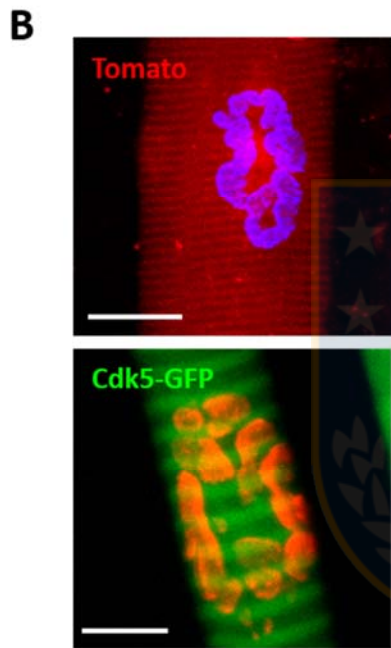
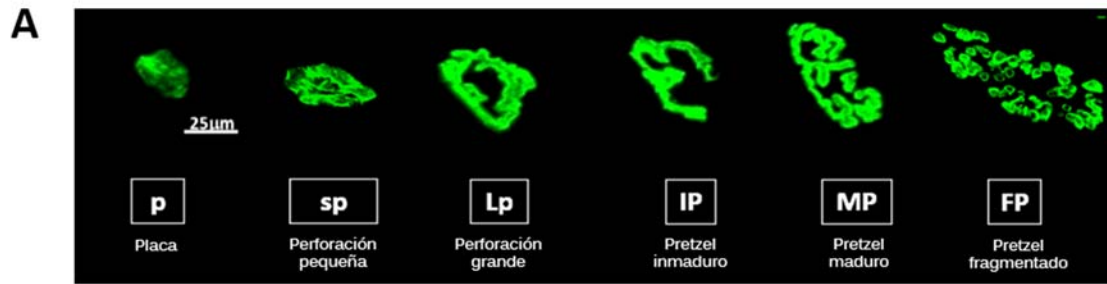
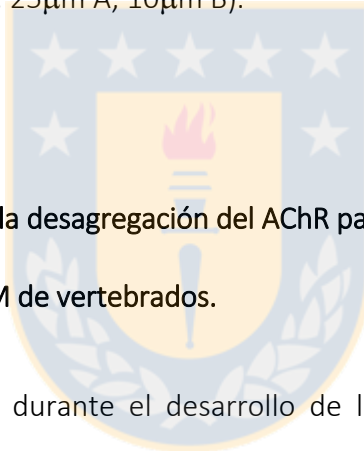


Figura 9 La sobreexpresión *in vivo* de Cdk5-GFP afecta la maduración de la UNM de vertebrado.

En la maduración del aparato postsináptico, cambios morfológicos que van desde una placa a un pretzel (A) permiten identificar estructuras tipo: placa (P), placa con pequeña perforación (SP), placa con perforación grande (LP), pretzel inmaduro (IP), pretzel maduro (MP) y pretzel fragmentado (FP). Músculos LAL fueron electroporados con los plasmidios que codifican para Cdk5-GFP y Tomato (control) en P23 (B). Luego de 21 días, los músculos LAL fueron disecados y teñidos con α BTX para determinar los cambios en la transición morfológica placa a pretzel (C), el número de fragmentos que componen cada pretzel (D) así como el Volumen (E) y Superficie (F) promedio de los aparatos postsinápticos. (Morfología y fragmentos: Control: N:3, n:149; Cdk5: N:3, n:148; Volumen y superficie: Control: N:3, n:105; Cdk5: N:3, n:117) (* $p < 0,02$; ANOVA y # $p < 0,05$; test-t; NS: $p > 0,05$, test-t no pareado) (Barra: 25 μ m A; 10 μ m B).



6.3 Wnt3a promueve la desagregación del AChR para producir un fenotipo de envejecimiento de la UNM de vertebrados.

Se ha sido descrito que durante el desarrollo de la UNM las señales mediadas por proteínas Wnt cumplen funciones sinaptogénicas y antisinaptogénicas [69]. Por una parte, Wnt3 colabora con agrina para la formación de los agregados del AChR [252]. Por otra parte, la función inhibitoria de proteínas Wnt en el desarrollo de la UNM ha sido apoyada por el efecto desagregante de Wnt3a sobre los AChR inducidos por agrina [253]. De manera adicional, estudios de lesión traumática del nervio ciático en animales adultos indican que Wnt3a incrementa su expresión en músculos denervados [254]. Sin embargo, se desconoce si el incremento de Wnt3a impacta a la UNM. Considerando estos antecedentes se evaluó si la sobreexpresión de Wnt3a muscular induce cambios en la

mantención estructural y funcional de UNMs inervadas.

6.3.1 La sobreexpresión *in vivo* de Wnt3a modifica la morfología del componente postsináptico de la UNM de vertebrados.

Ha sido descrito que en cultivos de células musculares Wnt3a inhibe la formación de agregados de AChR, mientras que *in vivo* Wnt3a promueve el desensamble del aparato postsináptico [253]. Para evaluar la función *in vivo* de Wnt3a en la UNM, se expresó el plasmidio que codifica para la proteína Wnt3a en el músculo LAL de 12 semanas postnatales a través de electroporación. Luego de 21 días de expresión de Wnt3a o la proteína fluorescente Tomato como control, los músculos fueron procesados y teñidos con α BTX para marcar los AChR (figura 10A). Dada la morfología de las estructuras observadas, los terminales postsinápticos adquiridos mediante microscopía confocal fueron reconstruidos en tres dimensiones y clasificados en dos categorías: maduro y fragmentado. Los resultados indican que en comparación a la sobreexpresión de la proteína control Tomato, la sobreexpresión de Wnt3a muestra una disminución en la proporción de pretzels maduros hasta un porcentaje de $46,76 \pm 2,95$ % (**p < 0,0001; Anova) en comparación al control que presenta un promedio de $96,73 \pm 2,21$ % de pretzels maduros (figura 10B). Esta significativa disminución de los pretzels que se observan en etapas adultas se relaciona con el aumento en el número de aparatos postsinápticos fragmentados que alcanzan un promedio de $53,24 \pm 2,94$ % (**p < 0,0001;

Anova), mientras que en condiciones control, el promedio observado fue de un $3,26 \pm 2,22$ %. Estos resultados se asocian al número de fragmentos que forman parte de cada terminal postsináptico (figura 10C), donde se encontró que en las miofibras que sobreexpresan Wnt3a un $51,89 \pm 2,93$ % (**p < 0,0001; Anova) de los pretzels están conformados por más de 4 fragmentos, lo que es significativamente mayor a la proporción de terminales postsinápticos del control, cuyo valor promedio es de un $4,78 \pm 1,27$ %. Este incremento en la población de aparatos postsinápticos fragmentados por la sobreexpresión de Wnt3a se correlaciona con una disminución de la población de terminales constituidos por 1 y 2 fragmentos, donde un $37,62 \pm 8,00$ % (**p < 0,001; Anova) y un $22,63 \pm 7,65$ % se ven reducidos a un $16,34 \pm 2,76$ y un $8,31 \pm 1,18$ %, respectivamente, para cada una de las categorías mencionadas (figura 10C). Estos datos indican que Wnt3a promueve la generación de estructuras postsinápticas fragmentadas en uniones neuromusculares de animales adultos mostrando un alto patrón de desorganización de los agregados de AChR.

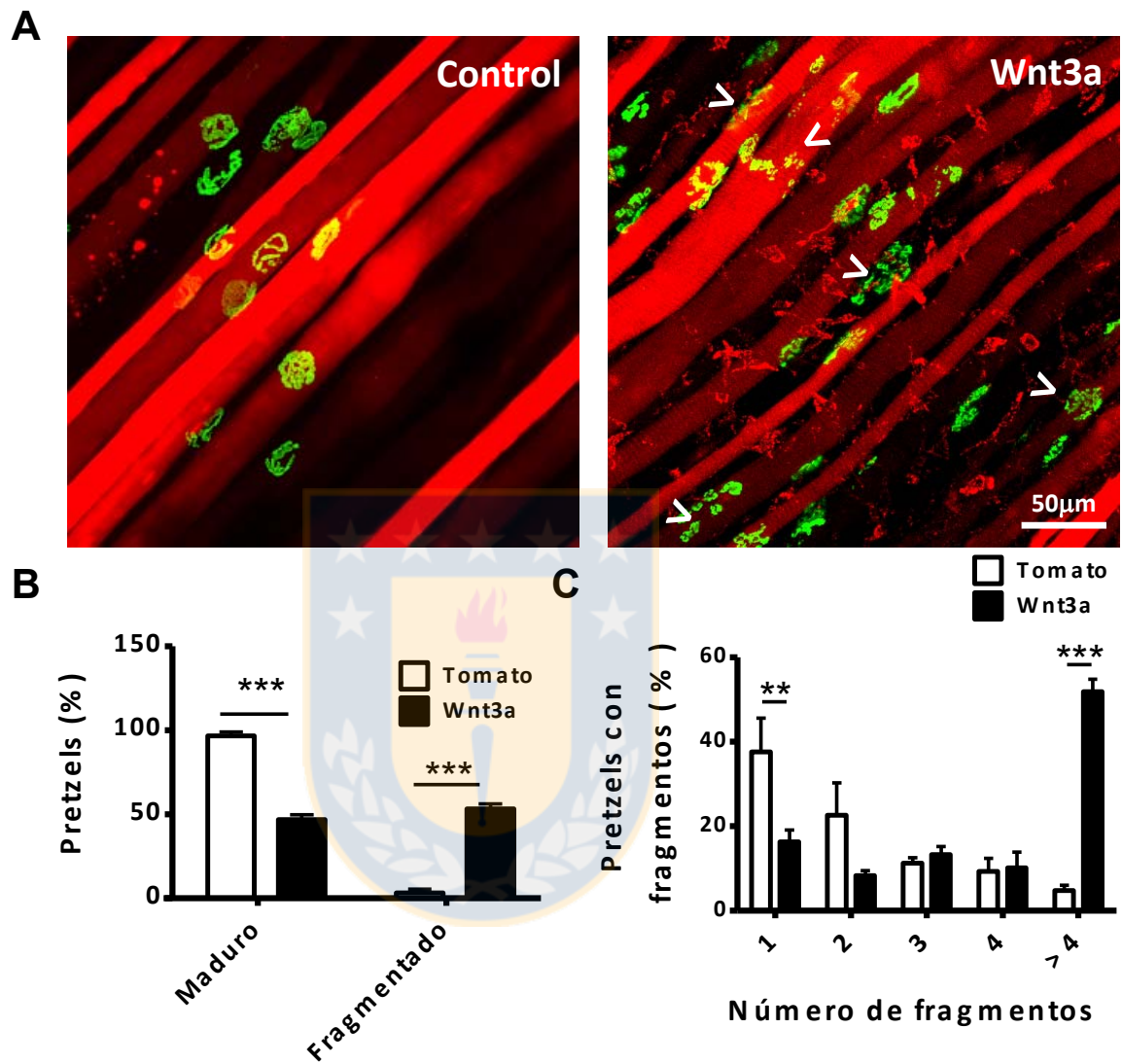


Figura 10 La sobreexpresión *in vivo* del ligando secretado Wnt3a modifica la morfología del componente postsináptico de la UNM de vertebrado.

Músculos LAL de ratones adultos de 3 meses fueron electroporados con 80 µg los vectores que codifican para las proteínas Tomato (control) y Wnt3a (Wnt3a 80 µg : Tomato 20 µg) como se muestra en campos representativos de tres animales por condición (A). Luego de 21 días de sobre-expresión, los músculos fueron disecados para montaje completo y teñidos con αBTX-488 (verde). Las imágenes de planos z fueron adquiridas con objetivo de 40 X mediante microscopía confocal, para su proyección en 3-dimensiones con el programa ImageJ y analizar los cambios morfológicos (B) así como el número de fragmentos promedio por pretzel (C). Dado que Wnt3a es secretado, las cabezas de flecha

indican el fenotipo fragmentado de los aparatos postsinápticos tanto de fibras electroporadas como las que no lo fueron. Los datos son representativos de 3 animales por condición y 40 – 60 aparatos postsinápticos (**p<0,01, ANOVA) (Barra: 50mm).

6.3.2 La sobreexpresión de Wnt3a afecta negativamente el perfil de innervación de la UNM de vertebrado.

Estudios anteriores junto a los resultados de esta tesis [253] revelan que Wnt3a podría estar involucrado en los cambios morfológicos de la UNM de vertebrados, induciendo una reestructuración del aparato postsináptico. Sin embargo, las posibles alteraciones del componente presináptico mediadas por Wnt3a no han sido hasta ahora estudiadas. Con la finalidad de detectar alteraciones en el terminal de la motoneurona, se realizaron electroporaciones *in vivo* de músculo LAL para sobre-expresar durante 21 días las proteínas Wnt3a y Tomato como control. Posteriormente los animales fueron analizados mediante microscopía confocal a través del marcaje de los AChRs con α BTX, mientras que la combinación de anticuerpos contra las proteínas SV2 y neurofilamento fue utilizada para marcar el aparato presináptico. Cuando se observaron los terminales presinápticos en músculos que sobreexpresan Wnt3a, se detectaron distintos grados de innervación de los aparatos postsinápticos fragmentados encontrándose terminales parcialmente innervados (figura 11, panel medio) y, aparentemente terminales denervados (figura 11, panel inferior), respecto al control Tomato (figura 11, panel superior). Estos resultados sugieren que cuando Wnt3a es sobreexpresado en fibras musculares a través de

electroporación existe una pérdida de organización y precisión en la yuxtaposición del terminal nervioso presináptico y el terminal motor postsináptico.

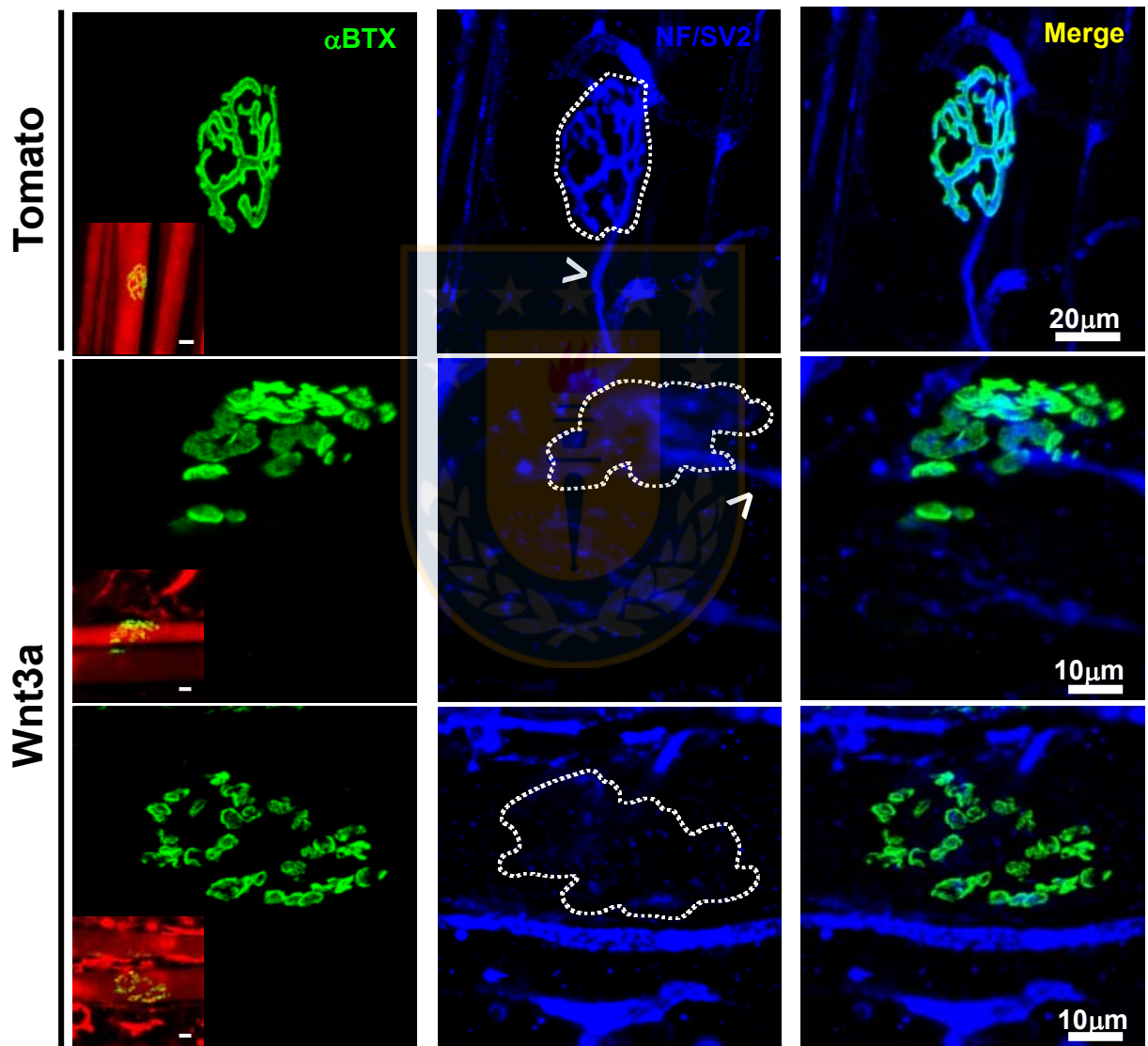
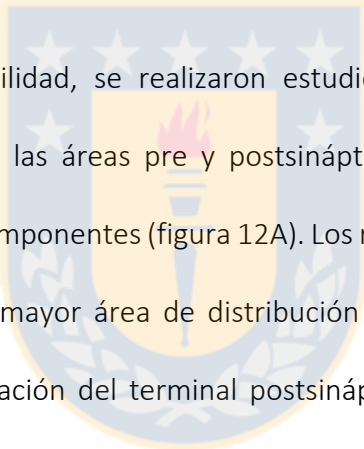


Figura 11 La sobreexpresión de Wnt3a modifica el componente presináptico de la sinapsis neuromuscular.

Músculos LAL provenientes de ratones adultos (3 meses) fueron electroporados para sobreexpresar los plasmidios codificantes para Wnt3a (Wnt3a 80 μg : Tomato 20 μg) y Tomato (80 μg) (miofibras rojas positivas para ambas condiciones indicadas en el inserto de las imágenes de la columna izquierda). Luego de 21 días, los animales fueron procesados para marcaje de miofibras electroporadas (rojas) con tinciones para aAChR (verde) e inmunomarcaje de las proteínas neurofilamento y SV2 (ambas mostradas en azul) (A). Una denervación parcial (áreas delimitadas con una línea punteada y cabezas de flecha en el panel central) se correlaciona con el grado de fragmentación del aparato postsináptico observado, en comparación al control (panel superior). Las imágenes mostradas son representativas de al menos 6 animales por cada condición. (Escala: 20 μm Tomato y 10 μm Wnt3a).



Para abordar esta posibilidad, se realizaron estudios de microscopía confocal para cuantificar el tamaño de las áreas pre y postsinápticas y establecer una relación de aposición entre ambos componentes (figura 12A). Los resultados indican que, aun cuando es posible observar una mayor área de distribución de los AChRs sobre el sarcolema producto de la fragmentación del terminal postsináptico inducido por Wnt3a, el área exclusivamente ocupada por los AChRs ($417,7 \pm 25,97 \mu\text{m}^2$) es similar al área postsináptica de los animales controles ($395,7 \pm 32,36 \mu\text{m}^2$) (figura 12B). Sin embargo, ante la expresión de Wnt3a, el terminal presináptico experimenta un severo remodelamiento donde se observa un terminal nervioso expandido comparado con el control (figura 12A, panel inferior). Además, un adelgazamiento del preterminal o porción del axón terminal quedó manifestado en una reducción del área presináptica total, cuyo valor promedio resultó en $252,4 \pm 17 \mu\text{m}^2$ (***) $p < 0,001$; Anova) y que fue significativamente menor al área presináptica de los terminales nerviosos de $373,1 \pm 34,3 \mu\text{m}^2$ que cubren al terminal

postsináptico en músculos control (figura 12C). Esta reorganización del componente presináptico y la consecuente disminución en su área puede ser interpretada como un fenotipo de denervación [94, 95, 98, 108]. Para abordar esta posibilidad, se utilizaron proyecciones de máxima intensidad de planos z de microscopía confocal para comparar la ocupancia del componente presináptico sobre la superficie total de AChRs (figura 12D). Se encontró que UNMs de animales cuyas miofibras sobre-expresan Wnt3a muestran una significativa disminución en el índice de ocupancia de $0,62 \pm 0,03$ (***) $p < 0,001$; Anova) del área de los aparatos postsinápticos cubiertos por el terminal presináptico, sugiriendo una fenotipo de denervación parcial de las UNM cuando se compara con el control, cuyo índice fue de $0,96 \pm 0,05$. Consistente con los análisis previamente publicados acerca de una posible función de Wnt3a en la UNM, los resultados de los estudios morfológicos realizados sugieren que Wnt3a, como señal proveniente del músculo, conduce las alteraciones presentadas por el terminal motor postsináptico y que están acompañadas de una reorganización del terminal presináptico.

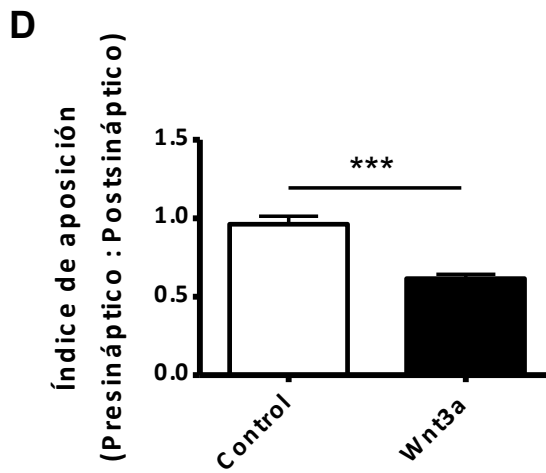
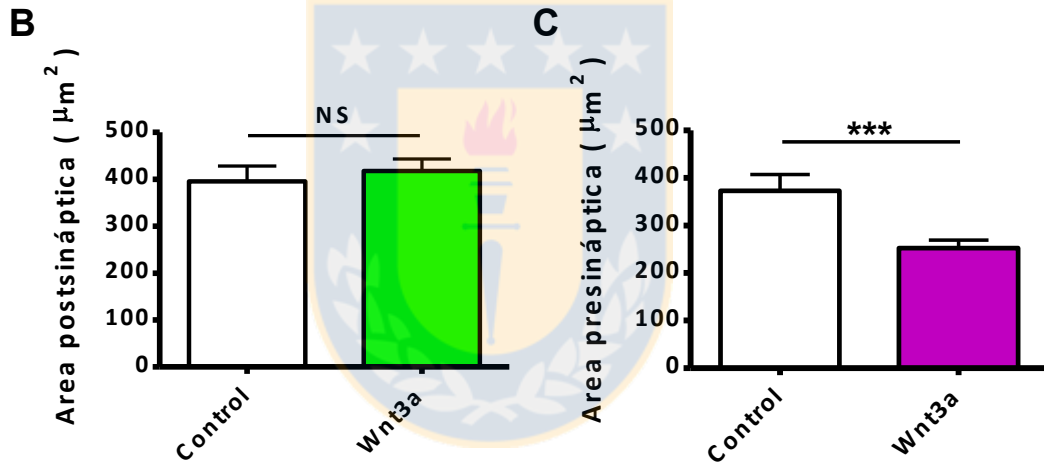
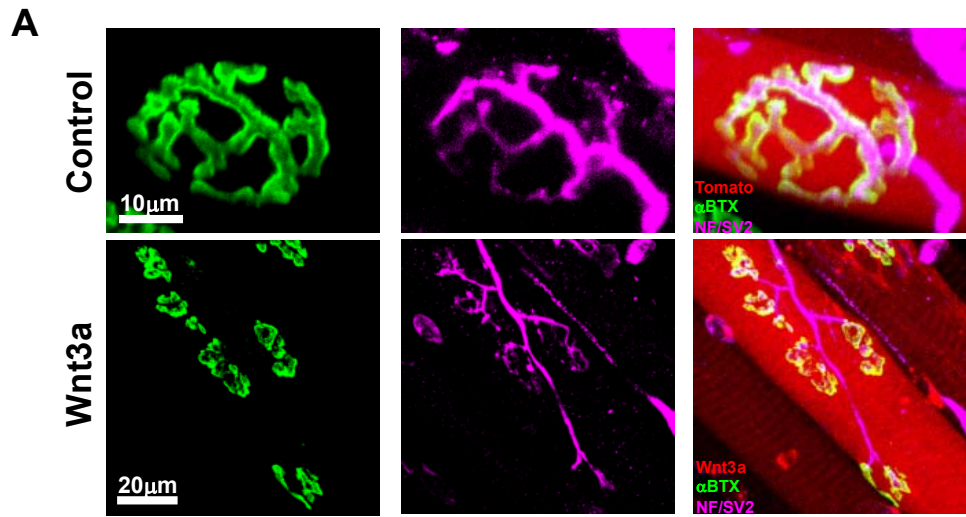


Figura 12 Los cambios estructurales de la UNM de vertebrado inducidos por Wnt3a alteran la aposición de los terminales pre y post sinápticos.

Wnt3a y Tomato fueron expresados mediante electroporación en músculo LAL de animales adultos. Luego de 21 días, los músculos fueron fijados e inmunomarcados contra las proteínas presinápticas SV2 y neurofilamento (magenta), mientras que los AChRs fueron teñidos con α BTX-488 (verde) (A). Proyecciones de máxima intensidad de planos z adquiridos con un objetivo de 63X fueron analizadas en ImageJ. Se cuantificaron las áreas post (B) y pre-sinápticas (C) así como la razón entre sus áreas (D) para cada terminal. (Tomato: N:3, n:24; Wnt3a: N:3, 39); *** $p < 0.001$, t-test). Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos para cada condición. (Barra: 10 μ m, panel superior y 20 μ m, panel inferior).

6.3.3 La sobreexpresión de Wnt3a en músculo LAL postnatal incrementa la liberación de neurotransmisor evocada, sin alterar su liberación espontánea.

La función de Wnt3a como regulador negativo de la agregación postsináptica del AChR y de la distribución del componente presináptico podría manifestarse en una alteración de la transmisión sináptica. Con el fin de explorar la relación entre los cambios estructurales pre y postsinápticos con la función neuromuscular, utilizamos registros intracelulares de preparados *ex vivo* de músculo LAL de animales de seis meses de adultez que fueron electroporados con los plasmidios que codifican para la proteína control Tomato y Wnt3a. Luego de 15 días de expresión se analizaron, en ausencia de contracción muscular, las amplitudes de EPP y mEPP, así como también el contenido cuantal. Utilizando una frecuencia de estimulación del nervio facial de 0,5 Hz se obtuvieron respuestas evocadas durante un período de 300 segundos que fueron normalizadas a -70 mV. Se muestran trazos representativos en la figura 13A. Los resultados muestran que el valor promedio

de EPP de fibras musculares que sobre-expresan Wnt3a corresponde a $71,71 \pm 8,6$ mV ($*p < 0,02$; test-t), significativamente mayor a la amplitud de respuestas evocadas en músculos de animales control, donde el promedio es de $47,07 \pm 5,40$ mV (figura 13B). Adicionalmente, el análisis de la amplitud promedio de liberación espontánea de neurotransmisor mEPP fue de $1,06 \pm 0,11$ mV, valor que no es estadísticamente distinto del promedio de amplitud de mEPP control de $0,88 \pm 0,09$ mV (figura 13C). Considerando los resultados de EPP y mEPP para Wnt3a y en la condición control, analizamos el tamaño del contenido cuantal considerando el promedio de los 100 primeros EPP para cada fibra registrada y el valor promedio de amplitud de mEPP durante un período de 5 minutos de registro continuado de cada terminal nervioso. Los resultados indican que cuando se sobre-expresa Wnt3a existe un aumento significativo del contenido cuantal (figura 13D), donde el valor promedio encontrado para una condición control corresponde a $57,31 \pm 5,27$ mV, mientras que para Wnt3a fue de $85,18 \pm 8,00$ mV ($**p < 0,007$; test-t). En conclusión, estos datos sugieren que la electroporación de Wnt3a en músculo LAL modifica la transmisión sináptica de la UNM de vertebrados y la respuesta a la liberación del neurotransmisor ACh mediante una alteración en la organización de los componentes pre y postsinápticos.

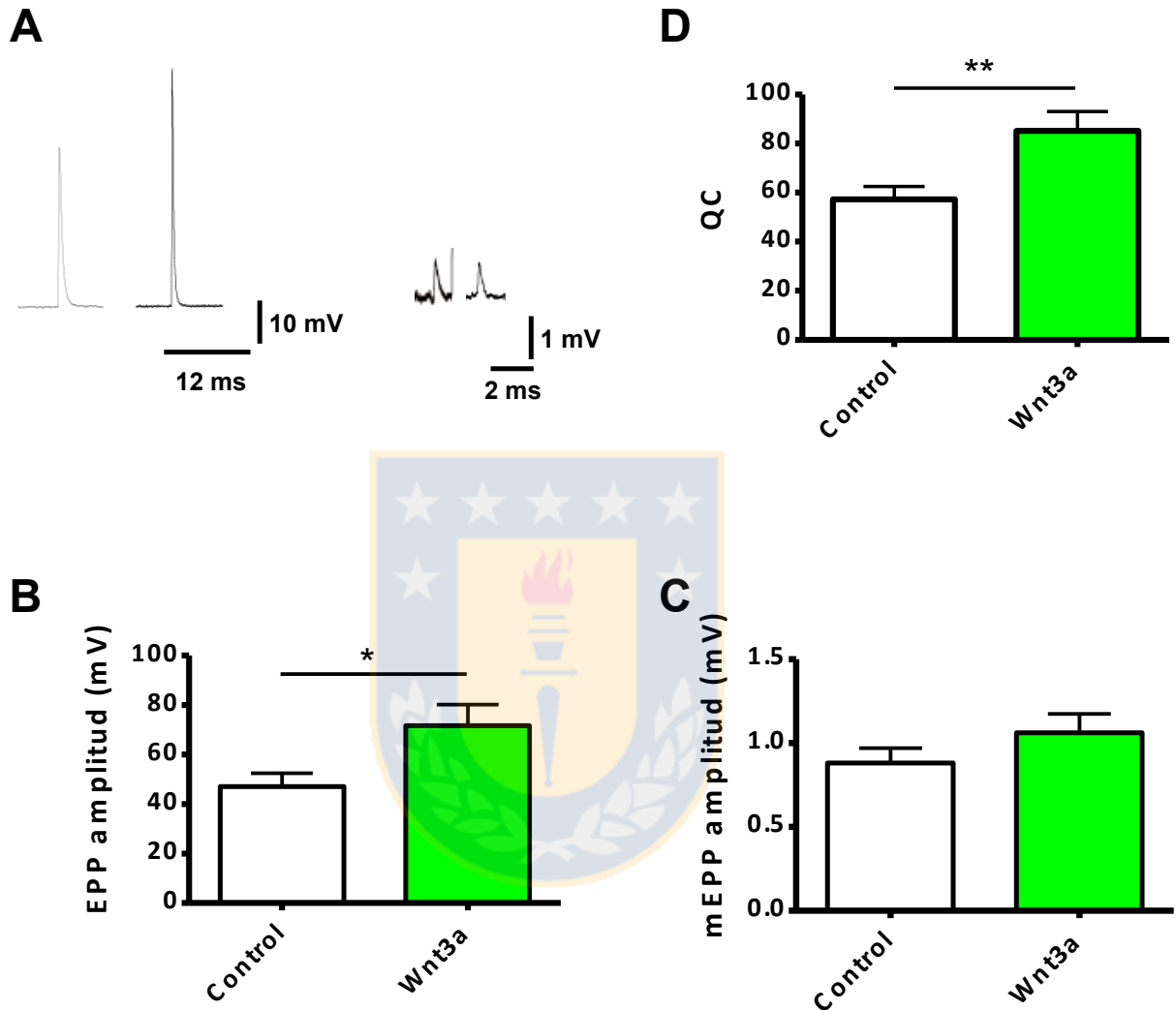


Figura 13 La sobreexpresión de Wnt3a en fibras musculares de LAL adulto incrementa la liberación evocada sin alterar la liberación espontánea de neurotransmisor.

Músculos LAL de animales adultos (6 meses) fueron electroporados con los plasmidios que codifican para Tomato (control) y Wnt3a (co-transfectado con Tomato 1:5). Luego de 21 días se obtuvieron preparados *ex vivo* de los músculos electroporados para análisis electrofisiológico de registro intracelular de fibras musculares. Se muestran trazos que representan los EPP y mEPP a 0,5 Hz de frecuencia de estímulo para animales control y que sobre-expresan Wnt3a (A). Se cuantificaron las amplitudes promedio de 150 EPPs (B) y el promedio de mEPP de un registro continuado durante 5 min (C). El contenido cuantal

(D) se determinó por el método directo considerando los 100 primeros estímulos de EPP. Los resultados muestran un aumento de las amplitudes de EPP sin modificación de la amplitud de mEPP, con el consecuente incremento del contenido cuantal (Control: N:3, n:22; Wnt3a N:3, n:26), (* $p < 0.05$, ** $p < 0.07$ t-test no pareado).

6.4 El receptor Wnt Fzd9 altera la morfología y transmisión sináptica en la UNM de vertebrado.

6.4.1 Fzd9 altera la maduración morfológica y funcional de la sinapsis neuromuscular de vertebrado.

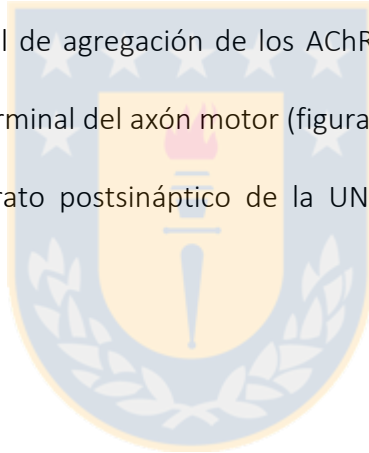
Previamente ha sido descrito que en etapas embrionarias los ligandos Wnt controlan la agregación postsináptica del AChR en la UNM de vertebrado participando de la inducción de la agregación aneural de los AChRs en la membrana muscular [30], estabilizando los AChRs [252] y promoviendo la dispersión de los agregados de AChRs [186]. Dado que distintas funciones deben involucrar diferentes mecanismos de señalización, hemos explorado en la posibilidad de que estas respuestas celulares sean también mediadas a través de receptores Fzd de la vía Wnt. A este respecto, en una búsqueda inicial utilizando cortes transversales de músculo *Tibialis anterior* de ratón adulto, se encontró que Fzd4, Fzd6 y Fzd9 (verde) se localizan en regiones sinápticas de la UNM de vertebrados colocalizando con los AChRs (rojo) (Anexo 1). Evidencias de la literatura muestran que en un análisis no sesgado de microarreglos de ARN mensajero, luego de 6 días de

denervación la expresión de Fzd9 en músculo disminuye [255]. Por otra parte, en etapas presintomáticas de ALS, una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la denervación y muerte de motoneuronas, la expresión de Fzd9 muscular aumenta [256]. Considerando este conjunto de antecedentes y que hemos reportado que Fzd9 disminuye la agregación *in vitro* del AChR en células musculares [199], hemos estudiado *in vivo* la posible participación de Fzd9 en la comunicación neuromuscular postnatal.

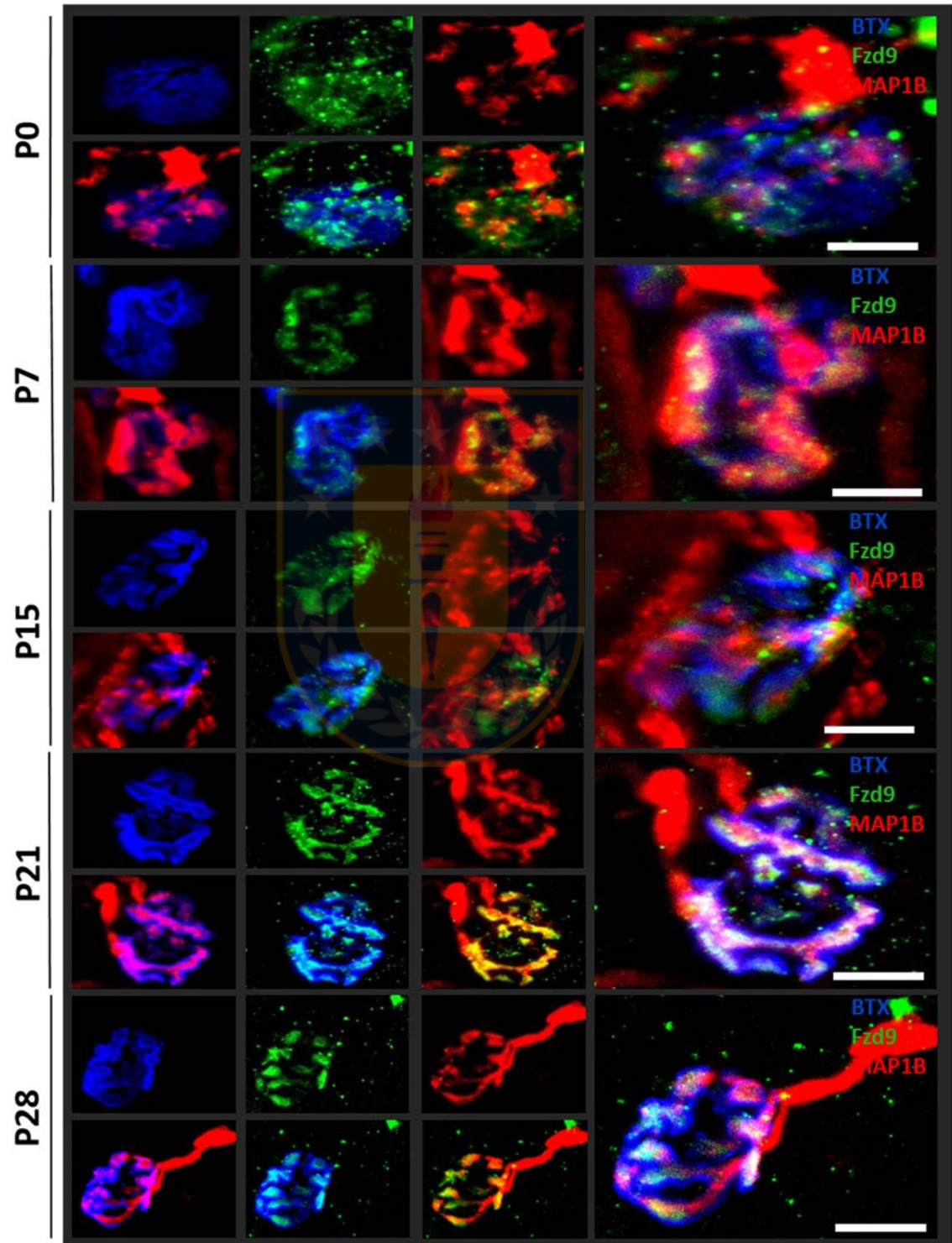
6.4.2 Fzd9 es distribuido tempranamente en regiones sinápticas de la UNM de vertebrado durante la maduración postnatal.

Para analizar en detalle la localización endógena de Fzd9 en la UNM de ratón, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y Western blot utilizando el montaje completo de músculo LAL y extractos de proteínas totales, respectivamente. Las muestras de tejido muscular fueron fijadas a tiempos postnatales 0, 7, 15, 21 y 28 días con y posteriormente se realizó una triple tinción con anticuerpos para detectar Fzd9, la proteína presináptica MAP1B y los AChR marcados con α BTX. Para la adquisición de imágenes se utilizaron proyecciones de la sumatoria de los planos z obtenidos por microscopía confocal. La extracción de proteínas totales fue realizada en los mismos tiempos donde detectaron las bandas inmunorreactivas para Fzd9 que fueron cotejadas con GAPDH como control de carga de proteína. Los resultados indican que en etapas neonatales Fzd9 es localizado dentro de las zonas sinápticas junto con los agregados del AChR (figura 14A). Esta

distribución es refinada a medida que transcurre el desarrollo postnatal pudiendo observarse que a P21 y posterior, Fzd9 co-localiza con los componentes pre y postsinápticos del terminal neuromuscular (figura 14A), lo que correlaciona con la detección de la banda inmunorreactiva de 65 kDa de Fzd9, en todos los tiempos considerados (figura 14B). Para discriminar si Fzd9 es un receptor pre o post sináptico de la UNM, se utilizó el programa Imaris para procesar las imágenes y generar una proyección en tres dimensiones de los planos z. Se observó que Fzd9 se encuentra localizado en la cima de la región central de agregación de los AChRs donde se forma la canaleta por donde se distribuye el terminal del axón motor (figura 14C). Por lo tanto, Fzd9 endógeno se distribuye en el aparato postsináptico de la UNM de vertebrado durante etapas postnatales.



A



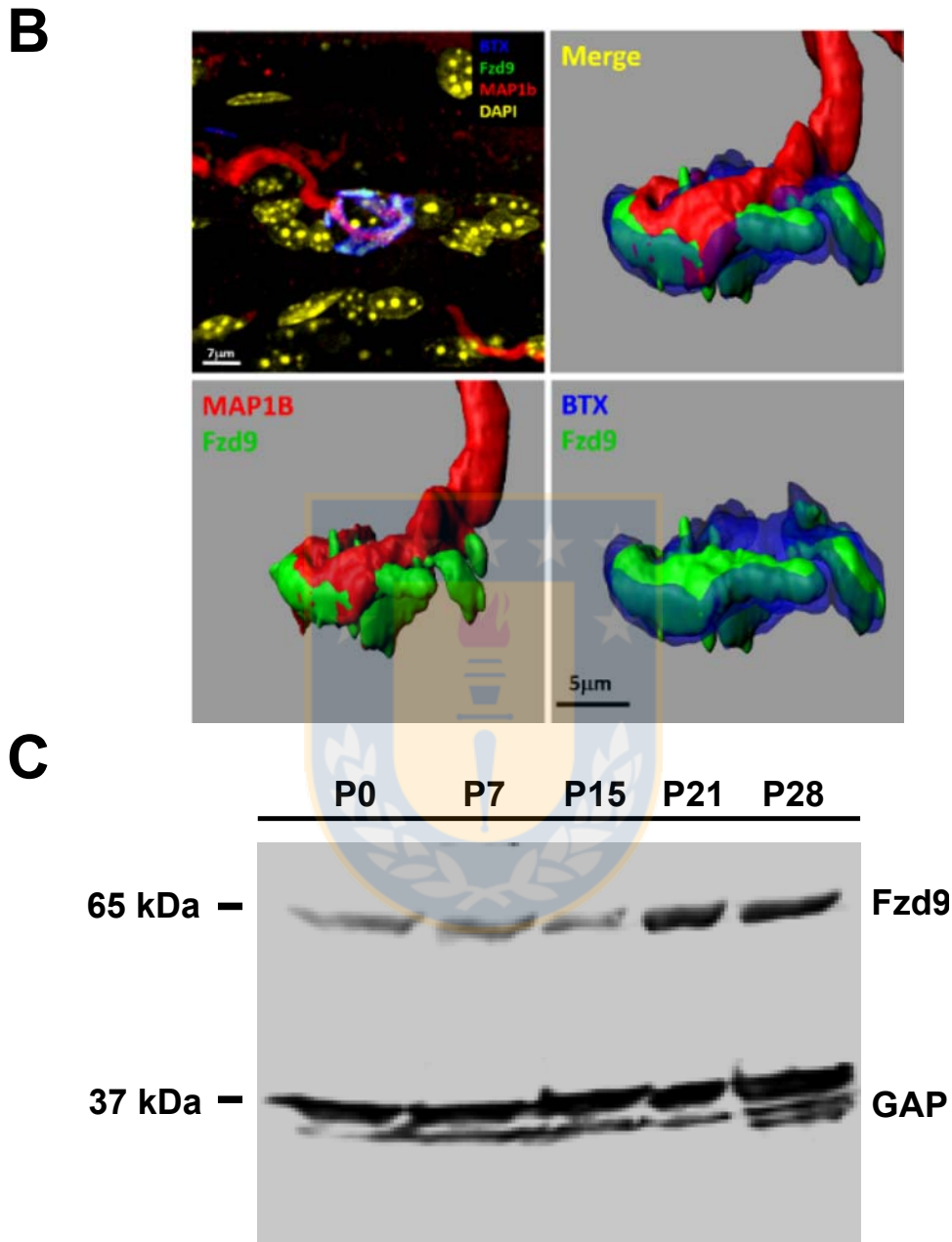


Figura 14 Distribución postnatal de Fzd9 en la UNM de vertebrado.

Músculos LAL fueron disecados a P de 0, 7, 14, 21 y 28, fijados en PFA 4% e inmunomarcados contra Fzd9 (verde) y MAP1B (rojo). Los AChRs fueron marcados con α BTX-647 (azul) (A). La distribución de Fzd9 fue analizada mediante la colocalización con los AChRs y MAP1B utilizando proyecciones de planos confocales en el eje z. (B). Se observó que Fzd9 se localiza inserto en el terminal postsináptico. A los mismos tiempos,

extractos de proteína fueron colectados desde músculo LAL y ensayados a través de Western blot para la detección de bandas inmunoreactivas contra las proteínas Fzd9 y GAPDH (C). Imágenes de microscopía y Western blot son representativas de al menos dos animales por estadio. (Barra: 20 μm en A y 5 μm en B).

6.4.3 El mantenimiento de Fzd9 en el componente postsináptico es afectado por la pérdida de inervación.

Considerando que el receptor Fzd9 podría ser una proteína postsináptica y que en denervación disminuye la expresión del mRNA de Fzd9 [255], se estudió la posible contribución del terminal presináptico a la localización y distribución de Fzd9 en subdominios postsinápticos de la membrana muscular en un modelo de denervación (figura 15). Para ello, se estandarizó el procedimiento de denervación del músculo LAL realizando la axotomía del nervio facial en animales adultos anestesiados, removiendo aproximadamente un segmento de 5 mm del nervio craneal VII que controla la contracción del músculo hemi-LAL derecho. Luego de 21 días, los animales fueron eutanasiados y los músculos LAL fueron disecados desde ambos hemisferios, de tal forma de estudiar el hemi-LAL denervado y el control (figura 15A), asegurando un procedimiento idéntico para ambas condiciones. Posteriormente se realizó inmunohistoquímica para marcar los tres componentes de la UNM con anticuerpos contra las proteínas presinápticas MAP1B y ChAT y para las células de Schwann utilizando un anticuerpo contra la proteína S-100, mientras que los AChR fueron marcados con αBTX (figura 15A). Con la finalidad de evidenciar los cambios que conlleva la axotomía, se utilizó microscopía

confocal para obtener imágenes por exploración de inclinación donde los resultados mostrados evidencian que en la condición control se observa que el perfil de inervación de los axones de motoneuronas recorren el músculo LAL, contactando los terminales postsinápticos en todas las regiones del LAL rostral (R1-R5) y caudal (C1-C2), como ha sido previamente descrito para este músculo [257]. En una condición de denervación eficiente se observa la pérdida del perfil nervioso con ausencia de ramificaciones primarias y secundarias, lo que resulta en atrofia de las fibras musculares y la aparición de agregados del AChR ectópicos junto con pretzels pequeños a lo largo de las fibras musculares (figura 15A). Estos cambios son notorios a mayor aumento, donde podemos evidenciar además que en el hemi-LAL control, las células de Schwann colocalizan con los axones motores al mismo tiempo que también se observan posicionadas sobre los terminales de placa motora, mientras que en denervación se encuentran completamente ausentes de los aparatos postsinápticos (figura 15B).

En este modelo, mediante inmunofluorescencia estudiamos la localización de Fzd9 teñiendo el componente presináptico contra las proteínas MAP1B y ChAT, mientras que los AChRs fueron teñidos con α BTX. Los resultados muestran que luego de 21 días de denervación, comparado con el control, Fzd9 no fue detectado en el aparato postsináptico (figura 16), sugiriendo que en etapas adultas, la expresión y localización de Fzd9 requiere del terminal presináptico.

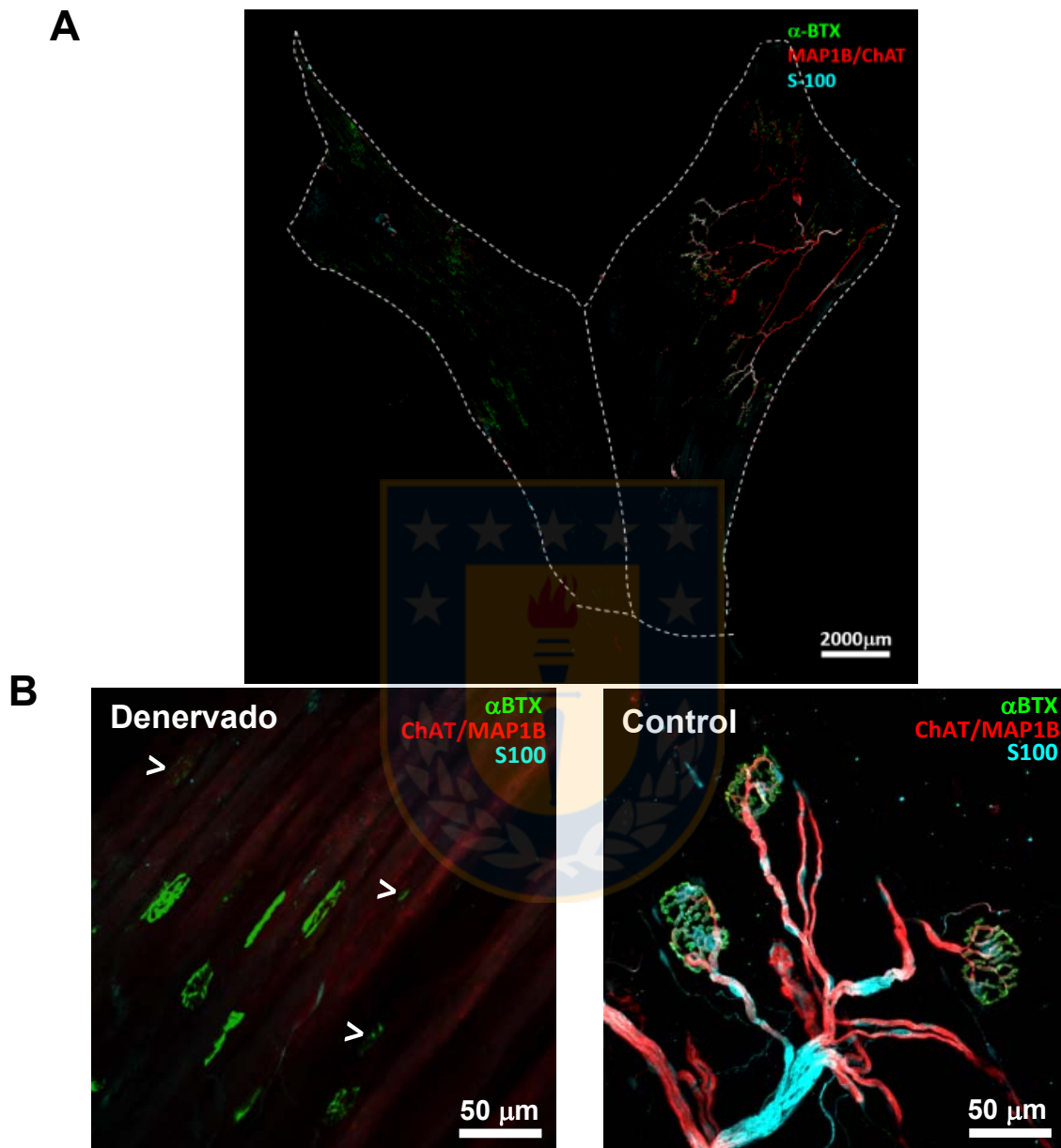


Figura 15 Axotomía del nervio facial.

Músculos LAL de animales adultos fueron denervados de modo ipsilateral removiendo un segmento de aproximadamente 5 mm del nervio facial. Luego de 21 días de denervación, los animales fueron eutanasiados y los músculos fueron disecados de ambos lados del cráneo para su fijación en FA 1,5 %. Posteriormente se realizaron tinciones para los tres componentes de la UNM: AChRs (verde), ChAT / MAP1B (axones motores) (rojo) y S100 (células de Schwann) (cian) los cuales evidencian la pérdida de ramificaciones de

motoneuronas (lado izquierdo de A), la atrofia muscular (área de línea punteada del lado izquierdo) y la aparición de agregados de AChR ectópicos (cabezas de flecha en B), comparado con el lado contralateral control (lado derecho de la imagen A). (B) Imágenes representativas a mayor aumento de al menos 2 animales por condición evidencian los cambios en injuria de la sinapsis neuromuscular donde los axones motores y el posicionamiento de terminales presinápticos, así como de células de Schwann, sobre los AChRs se encuentran ausentes. (Barra: 2000 μm para A y 50 μm para B).



Control

Axotomizado

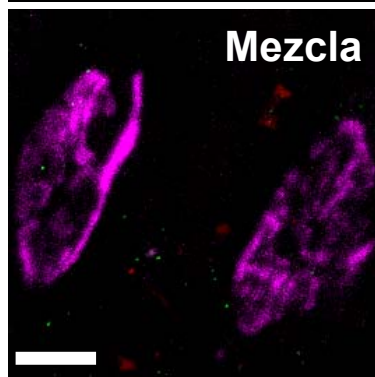
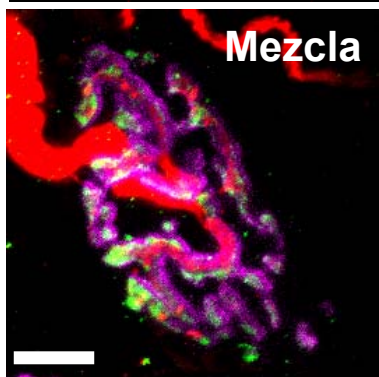
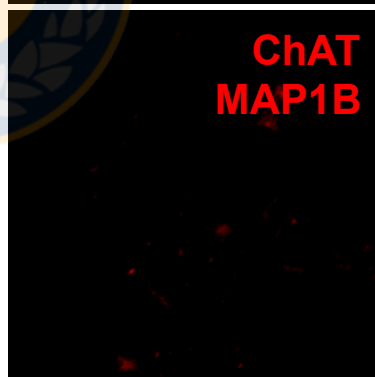
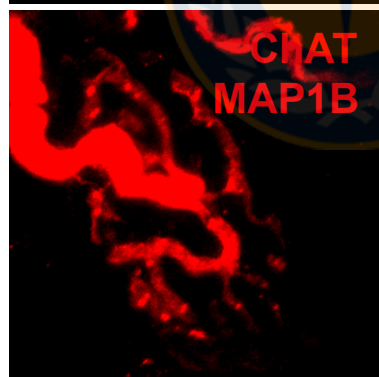
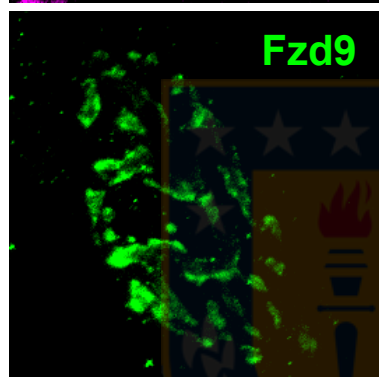
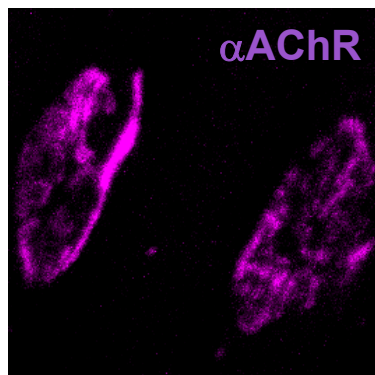
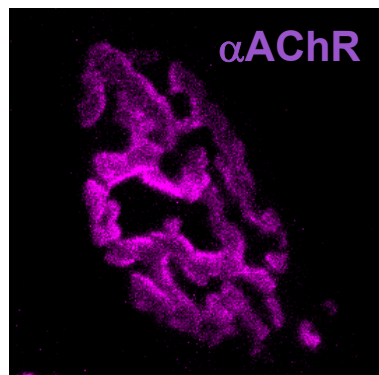


Figura 16 La Axotomía del nervio facial altera la distribución postsináptica de Fzd9 endógeno en el músculo LAL.

Músculos LAL de ratones adultos fueron denervados durante 21 días. Se realizaron tinciones para los AChRs (magenta) y ChAT / MAP1B (axones motores) (rojo) para observar la localización de Fzd9 (verde). Comparado con el control, no se detecta Fzd9 en condiciones de denervación. Imágenes representativas de al menos dos animales por condición. Barra 10 μm .

6.4.4 Fzd9 afecta la maduración morfológica de la UNM de vertebrado.

La localización y distribución del receptor Fzd9 en el aparato postsináptico de la UNM durante el desarrollo postnatal es dependiente del terminal presináptico. Sin embargo, una posible función *in vivo* de Fzd9 en la maduración postnatal de la UNM no ha sido explorada. En primer lugar se analizó si Fzd9 sobre-expresado mediante electroporación de músculo LAL se distribuye en la UNM. Para ello, músculos LAL que expresaron durante 10 días Fzd9 en fusión con el epítipo HA, fueron disecados para realizar tinciones inmunohistoquímicas contra la etiqueta HA y realizar la co-localización con los AChR teñidos con αBTX . Los resultados muestran que Fzd9-HA se localiza en subdominios del sarcolema en las regiones de agregación de los AChRs y que su distribución postsináptica es similar a Fzd9 endógeno como es mostrado en la colocalización con los AChRs (figura 17). Por lo tanto, Fzd9 sobre-expresado se distribuye en forma similar a la proteína endógena en la UNM de vertebrado.

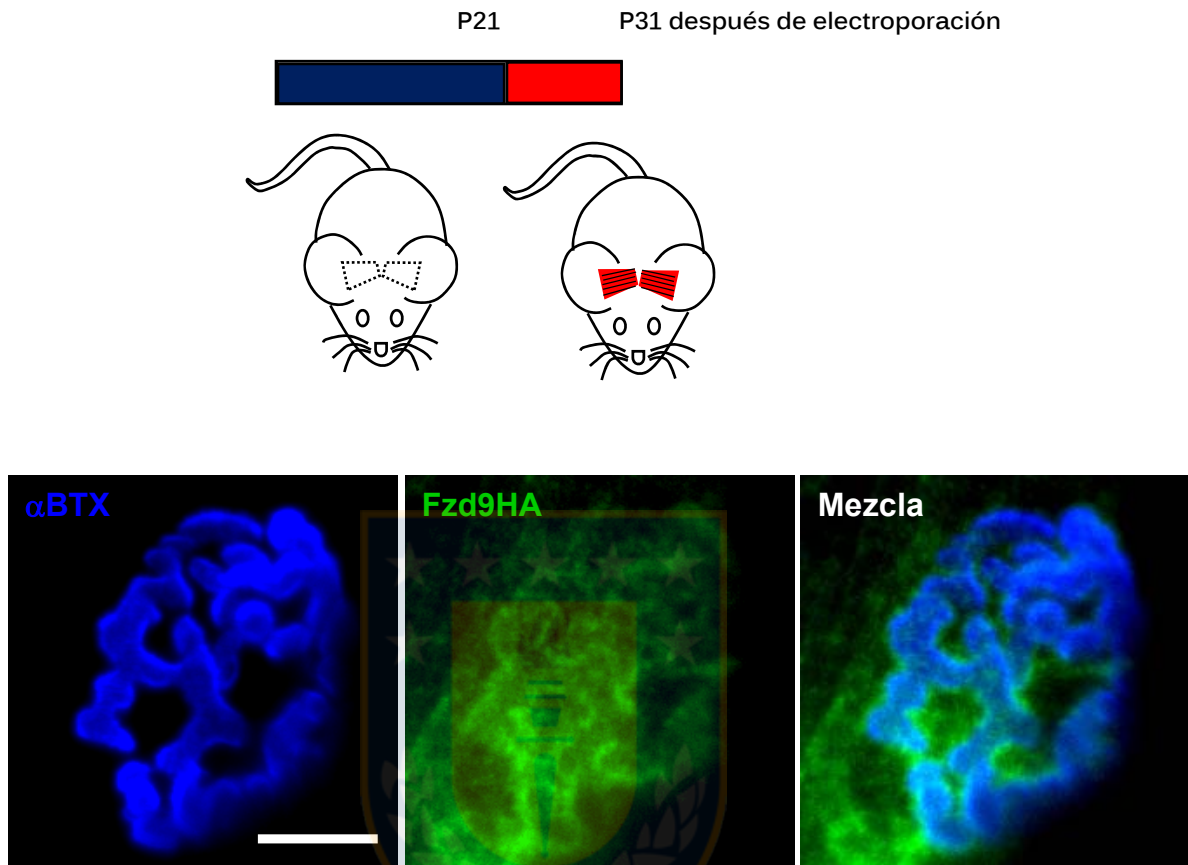


Figura 17 Fzd9 es distribuido en regiones sinápticas de la UNM de vertebrado.

Músculos LAL fueron electroporados en estadio P21 con un plasmidio que codifica para Fzd9 en fusión con el epítipo de hemaglutinina HA y que además co-expresa la proteína fluorescente roja de membrana mCherry, separados por una secuencia de autoclivaje 2A. Transcurridos 10 días de expresión, los músculos se disecaron y fijaron con PFA 2% para ser sometidos a inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti epítipo HA hecho en rata, que fue revelado con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 (verde). Los AChRs fueron reconocidos con α BTX-647 (azul). En fibras que expresan mCherry (panel superior de menor aumento), se analizó la distribución de Fzd9HA en el terminal neuromuscular, observándose que cuando Fzd9 se colocaliza con los AChRs, éste se distribuye en las regiones sinápticas. (Barra: 10 μ m).

Considerando los antecedentes previamente reportados en la literatura y nuestros datos, se estudió la posible función de Fzd9 en la sinapsis neuromuscular durante la etapa de maduración postnatal. Mediante la electroporación de músculo LAL en P21, se analizó la sobre-expresión de Fzd9 mediante un plasmidio que codifica para Fzd9 y la proteína fluorescente mCherry, separados por una secuencia que codifica para un oligopéptido de 19 aminoácidos de autoclivaje proveniente del virus de la fiebre aftosa (FMDV) [258], permitiendo la expresión independiente de ambas proteínas y la detección de las miofibras electroporadas en rojo. El silenciamiento de Fzd9 se realizó mediante la electroporación de un ARN interferente de doble hebra contra Fzd9 de ratón (shFzd9) y que además codifica para la proteína fluorescente GFP, lo que permitió el análisis de miofibras verdes. Ambas condiciones fueron comparadas con la proteína fluorescente Tomato como control. Posterior a tres semanas de expresión de los constructos, los animales fueron procesados y las preparaciones de músculos LAL completos fueron teñidos para marcar los aparatos postsinápticos con α BTX. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal, mientras que los análisis de morfología fueron realizados desde proyecciones en tres dimensiones de los planos z utilizando el programa ImageJ, considerando las categorías de pretzels tipo placa (P), placa perforada (PF), pretzel inmaduro (IP), pretzel maduro (MP) y pretzel fragmentado (FP) (figura 18A). Los datos obtenidos indican que, en comparación con animales control, la sobreexpresión de Fzd9 o su silenciamiento con shFzd9, disminuyen significativamente la población de pretzels que fueron clasificados en la categoría de inmaduros (IP) en un $26,33 \pm 6,70 \%$

(*p< 0,05; Anova) y un $31,75 \pm 0,35$ % (**p< 0,01; Anova), respectivamente, mientras que en el control se observó un $54,11 \pm 6,07$. La disminución de pretzels inmaduros observada por la sobreexpresión de Fzd9, fue concomitante a un incremento en la población de pretzels maduros (MP) en un $74,61 \pm 8,21$ % (**p< 0,0001; Anova) comparado con el control ($41,55 \pm 12,73$ %). Por otra parte, la caída en el porcentaje de pretzels inmaduros producida por la inhibición de la expresión de Fzd9, se correlacionó con la aparición de estructuras postsinápticas fragmentadas (FP) en un $23,31 \pm 1,32$ % (*p< 0,05; Anova) comparado con el control de un $0,9 \pm 0,47$ %. Estos datos sugieren que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de Fzd9 alteran los cambios morfológicos del aparato postsináptico que ocurren en el desarrollo postnatal. Considerando que los cambios morfológicos postnatales del aparato postsináptico están acompañados de modificaciones en el tamaño de los pretzels, analizamos el área y perímetro desde proyecciones de máxima intensidad de planos z obtenidos de músculos electroporados con los vectores codificantes para Tomato, Fzd9 y shFzd9. En comparación al control, Fzd9 incrementa significativamente el área (figura 18D) y el perímetro (figura 18E) de los pretzels en un $1204 \pm 35,73 \mu\text{m}^2$ (**p< 0,0001; Anova) y un $292,9 \pm 9,63 \mu\text{m}$ (*p< 0,05; Anova), respectivamente, comparado con el control cuyos valores de área y perímetro resultaron en un $973,3 \pm 34,94 \mu\text{m}^2$ y un $254,4 \pm 7,77 \mu\text{m}$, respectivamente, lo que es concordante con la observación hacia la transición de estructuras maduras de mayor complejidad. En cambio, la inhibición de Fzd9 muestra una disminución del área de los pretzels (figura 18D) en un $824,1 \pm 36,06 \mu\text{m}^2$ (**p< 0,01; Anova) y un incremento en el

perímetro (figura 18E) de un $356,1 \pm 12,99 \mu\text{m}$ (** $p < 0,0001$; Anova) comparado con el control. Los valores encontrados de área y perímetro de los pretzels sujetos a la inhibición de Fzd9 se correlacionan con la aparición de una morfología fragmentada del aparato postsináptico. En su conjunto, estos datos sugieren que Fzd9 muscular afecta la maduración morfológica del dominio postsináptico en la UNM de vertebrado.

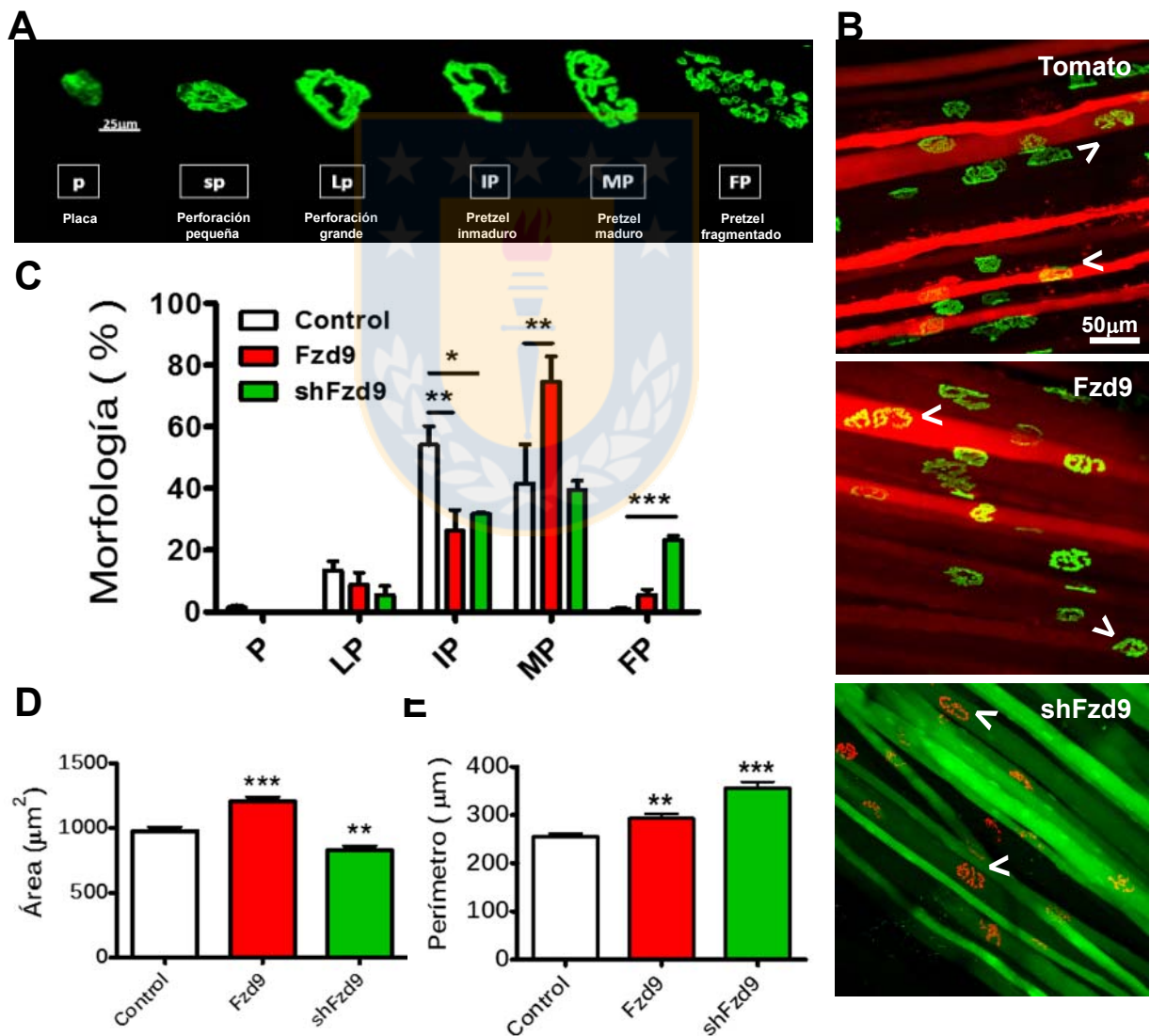


Figura 18 La ganancia y pérdida de función del receptor Fzd9 altera la transición morfológica del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.

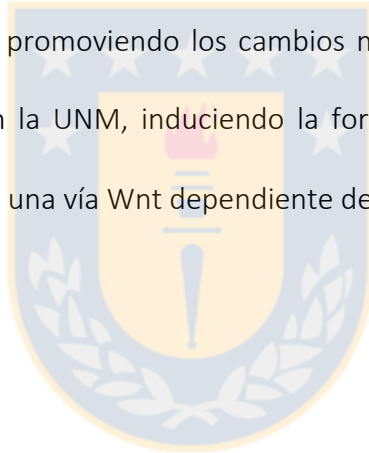
Músculos LAL fueron electroporados en estadio P21 con los vectores que codifican para Tomato (control), Fzd9, y con un ARN de interferencia de doble hebra. Los cambios morfológicos del aparato postsináptico fueron analizados considerando las categorías de Placa, Perforación pequeña, Perforación grande, Pretzel inmaduro, Pretzel maduro y Pretzel fragmentado (A). Posterior a 21 días, los músculos fueron disecados y teñidos para el AChR con α BTX. La expresión de las proteínas mCherry (rojo) o GFP (verde) indican las miofibras electroporadas (B). El efecto de Fzd9 o su inhibición fueron evaluados sobre el aparato postsináptico de la UNM considerando los parámetros de morfología (cabezas de flecha) (C), área (D) y perímetro (E). Microscopía confocal de planos z y el programa ImageJ fueron utilizados para la cuantificación en tres dimensiones de la forma de los pretzels, mientras que proyecciones de máxima intensidad se utilizaron para el recuento de área y perímetro. (Para Control, Fzd9 y shFzd9 se consideró un N: 3-4; n: 40-50; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ANOVA). (Barra: 25 μ m panel A y 50 μ m panel B).

6.4.5 Efectores de la vía Wnt dependiente de β -catenina alteran la maduración del aparato postsináptico en la UNM de vertebrado.

Previamente ha sido reportada la participación de los efectores intracelulares APC, Dvl y β -catenina de la vía Wnt/ β -catenina en la agregación del AChRs en la UNM de vertebrado [182, 188, 259]. Por otra parte, hemos reportado que en cultivos de células musculares, Fzd9 incrementa los niveles de β -catenina citosólica [199]. Para abordar la posibilidad de que Fzd9 pueda actuar a través de una vía Wnt, se sobre-expresaron en músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) de animales P21 los constructos que codifican para el co-receptor de Fzd Lrp6, la forma Lrp6 Δ C que carece del dominio citosólico que permite la activación de la vía Wnt dependiente de β -catenina y el plasmidio que codifica para el antagonista de Lrp5/6, Dkk1. Para ello, se aplicó un protocolo de electroporación de 20 pulsos

cuadrados de 100 V / cm, con una duración de 20 ms a intervalos de 980 ms para cada animal en P21. Al igual que en los casos anteriores, como control se expresó la proteína Tomato bajo los mismos parámetros. Posteriormente, en P42, los músculos fueron disecados y procesados para tinción de los aparatos postsinápticos con α BTX. Los resultados indican que la sobre-expresión de Lrp6 disminuye significativamente la proporción de pretzels inmaduros (IP) en un $15,98 \pm 1,97$ % (**p < 0,0001; Anova) comparado con el control cuyo valor es $49,39 \pm 3,01$ %. Esto se correlaciona con la aparición de pretzels con una morfología madura (MP) en un $56,69 \pm 4,59$ % (**p < 0,0001; Anova) y fragmentada (FP) en $18,94 \pm 2,38$ % (**p < 0,0001; Anova), en comparación con las mismas categorías en animales control que resultaron en un $30,67 \pm 1,73$ % y de $1,34 \pm 1,34$ %, respectivamente (figura 19A). A su vez, los datos encontrados cuando se sobre-expresó Lrp6 Δ C muestran una disminución en la categoría de aparatos postsinápticos inmaduros (IP) en un $20,14 \pm 3,48$ % (**p < 0,0001; Anova) cuando el control indica un porcentaje de $43,95 \pm 2,68$ % para la misma categoría de pretzels. En un modo destacable, se observa un aumento significativo de pretzels fragmentados (FP) de $34,58 \pm 3,35$ % (**p < 0,0001; Anova) en relación con el control de un $2,43 \pm 0,96$ % (figura 19C). Por otra parte, cuando analizamos la morfología de los aparatos postsinápticos en miofibras que sobreexpresaron Dkk1, se encontró una reducción del número de pretzels inmaduros (IP) en un $32,85 \pm 0,62$ % (**p < 0,001; Anova), mientras que los animales control arrojaron un valor promedio de $42,28 \pm 1,02$ %. Esto generó un desplazamiento hacia la izquierda en la curva de maduración involucrando un retraso en

el desarrollo de las estructuras postsinápticas y observándose un incremento de un $25,31 \pm 1,70 \%$ (***) $p < 0,001$; Anova) y un $6,45 \pm 2,91 \%$ en el porcentaje de estructuras con perforación grande (LP) y pequeña (SP), respectivamente, mientras que los valores control para las mismas categorías fueron de $17,90 \pm 1,80 \%$ y $1,070 \pm 0,678 \%$ (figura 19B). Estos datos indican que la activación de la vía Wnt promueve la formación de estructuras postsinápticas complejas con un fenotipo maduro, mientras que la inhibición de la vía podría mantener las estructuras postsinápticas de menor complejidad. Por lo tanto, Fzd9 podría estar promoviendo los cambios morfológicos de la maduración del aparato postsináptico en la UNM, induciendo la formación de estructuras complejas, posiblemente a través de una vía Wnt dependiente de β -catenina.



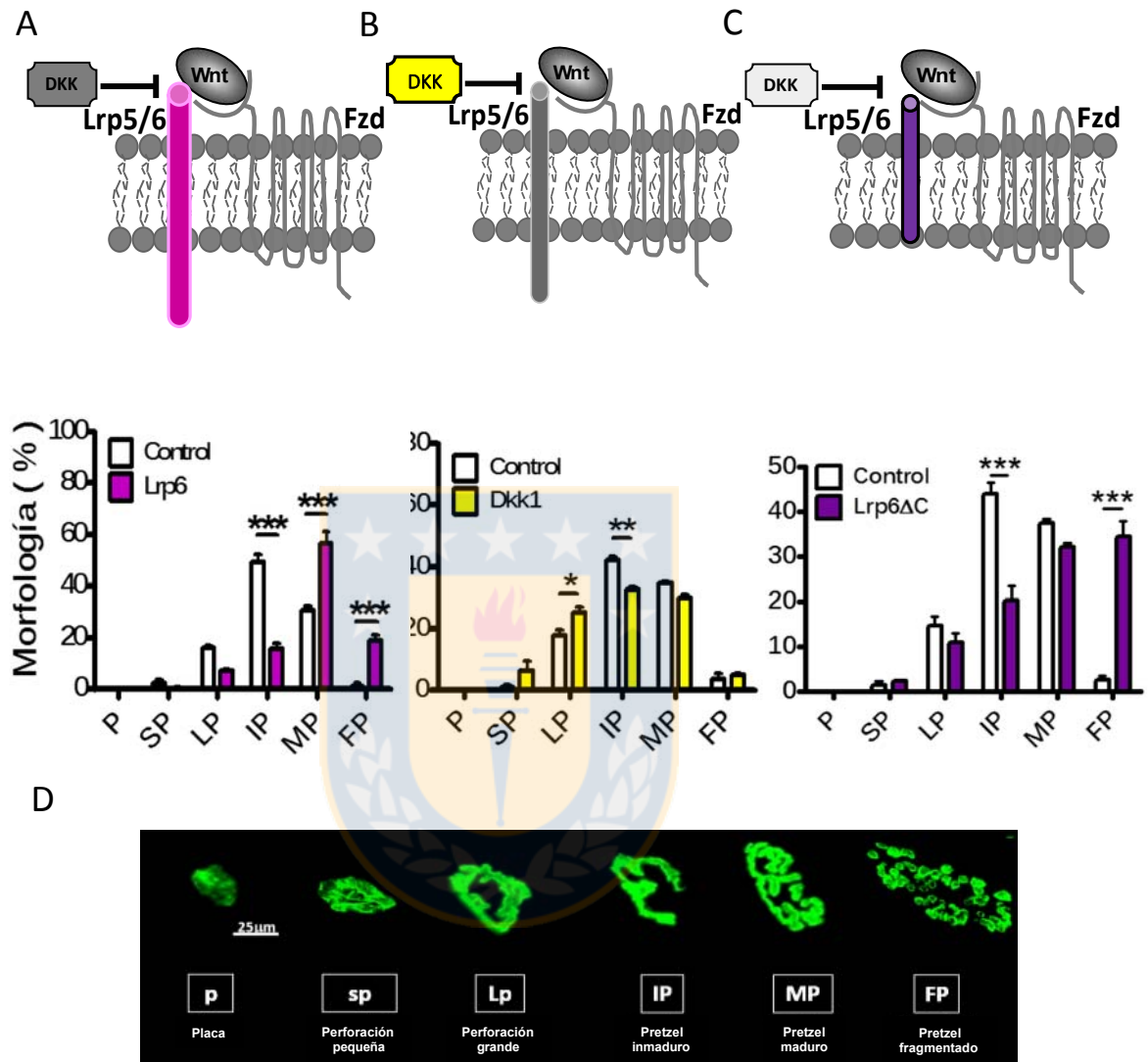


Figura 19 La sobre-expresión de los componentes de la vía de señalización Wnt/ β -catenina Lrp6, Lrp6 Δ C y Dkk1 afectan la transición placa a pretzel del aparato postsináptico en la UNM.

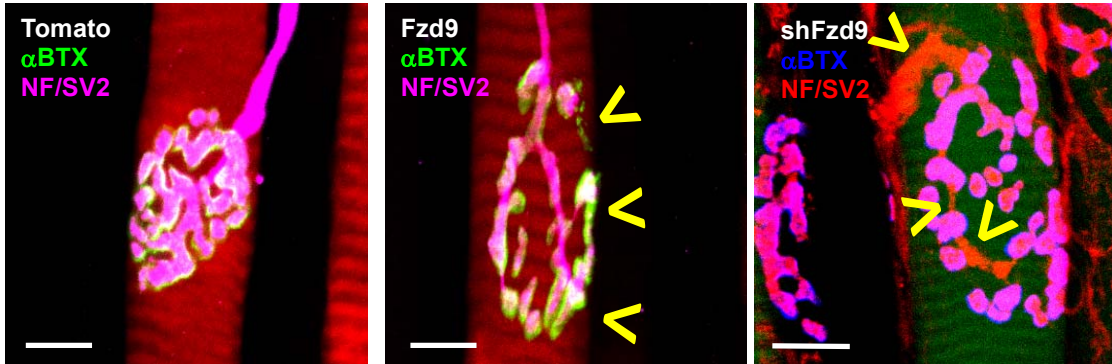
Músculos FDB (*flexor digitorum brevis*) fueron electroporados con plasmidios que codifican para el co-receptor Lrp6 (rosa) (A), Dkk1 (amarillo) (B) y la forma trunca en C-terminal del co-receptor Lrp6 (Lrp6 Δ C) (violeta) (C) para ser analizados a P42, 21 días después de la electroporación. Los músculos completos fueron teñidos con α BTX-488 para la cuantificación de morfologías características de la maduración placa a pretzel (D). Los resultados son presentados como media \pm S.E.M. de 3 experimentos (* p <0,05, ** p <0,01; ANOVA).

6.4.6 La sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9 altera la aposición de los componentes pre y post-sinápticos de la UNM de vertebrado.

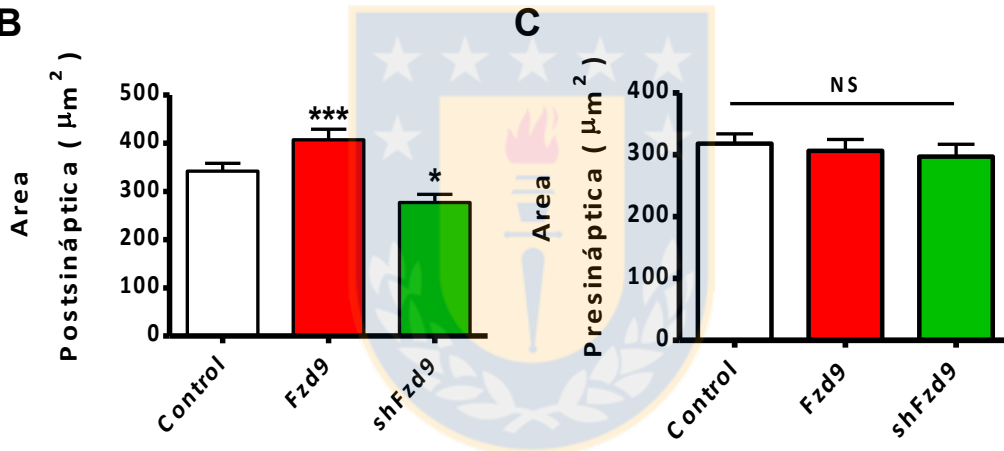
La sobre-expresión de Fzd9 en fibras musculares altera la organización del componente postsináptico de la UNM incrementando su complejidad morfológica y tamaño. Con la finalidad de estudiar si el terminal presináptico está sujeto a las alteraciones que promueve Fzd9 en la UNM, músculos LAL de animales en estadio P21 fueron electroporados para sobre-expresar Fzd9, un ARN de interferencia contra Fzd9 (shFzd9) y Tomato. Luego de tres semanas, los animales fueron eutanasiados y los músculos LAL inmuno-teñidos con los anticuerpos contra neurofilamento y SV2 para marcar el terminal presináptico (figura 20A). Los AChRs fueron marcados con α BTX al mismo tiempo en que se incubaron los anticuerpos secundarios contra los anticuerpos primarios de las proteínas presinápticas antes mencionadas. Los archivos de imágenes de los componentes pre y post-sinápticos obtenidos mediante microscopía confocal fueron analizados como proyecciones de máxima intensidad de planos z. Los resultados muestran que en comparación con el control, la sobreexpresión de Fzd9 incrementa el área postsináptica promedio de la UNM cuyo valor de $407,3 \pm 21,52 \mu\text{m}^2$ (* $p < 0,05$; Anova) es significativamente mayor que el valor control de $342,1 \pm 16,44 \mu\text{m}^2$, mientras que la inhibición de la expresión de Fzd9 indica que el área del aparato postsináptico es de $277,2 \pm 16,87 \mu\text{m}^2$ (* $p < 0,05$; Anova), significativamente menor que el control (figura 20B). Por otra parte, cuando analizamos el tamaño de área del terminal motor, los resultados indican que, ya sea en sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9, el área

presináptica es similar al control, donde el valor promedio fue $317,90 \pm 15,86 \mu\text{m}^2$, mientras que valores promedio de $306,5 \pm 17,98 \mu\text{m}^2$ y un $297,10 \pm 19,70 \mu\text{m}^2$ fueron cuantificados para Fzd9 y shFzd9, respectivamente (figura 20C). Para dilucidar si la estructuración pre y postsináptica de la UNM de vertebrado se encontraba afectada por Fzd9, se analizó la aposición de ambos componentes en función de sus áreas (relación de los terminales presináptico : postsináptico). Los resultados indican que en comparación al control, cuya razón de colocación es de $0,86 \pm 0,02$, la sobre-expresión de Fzd9 disminuye la razón del área de aposición a $0,72 \pm 0,02$ (**p < 0,001; Anova), encontrándose regiones del componente postsináptico descubiertas del terminal motor (figura 20A). Contrario a lo anterior, la inhibición de Fzd9 aumentó la razón entre el componente pre y postsináptico, alcanzando a un $0,96 \pm 0,30$ (**p < 0,01; Anova) (figura 20A, y 20D), donde además se puede observar una mayor región del pre-terminal de la motoneurona posicionado sobre el aparato postsináptico que se encuentra carente de AChRs. Estos antecedentes indican que Fzd9 regula la organización del aparato postsináptico y altera la aposición pre y postsináptica de la UNM de vertebrado.

A



B



D

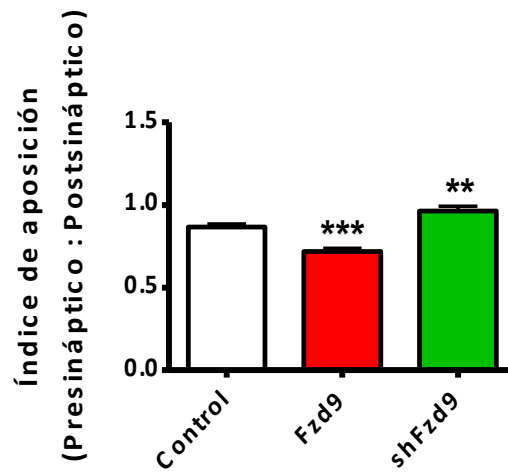


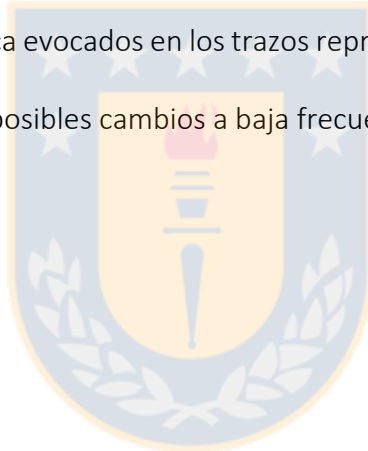
Figura 20 La sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9 muscular afecta la aposición de los componentes prey post-sinápticos de la UNM.

Para analizar los componentes de la UNM de vertebrado, músculos LAL fueron electroporados a P14 con los plasmidios Tomato, Fzd9 y el ARN de interferencia shFzd9. En P21, los músculos electroporados fueron fijados en FA 1,5% y procesados para inmunofluorescencia tiñendo contra α AChR (en verde: control y Fzd9; en azul: shFzd9) y con anticuerpos contra neurofilamento y SV2 para el terminal presináptico (en magenta: control y Fzd9; en rojo: shFzd9) (A). Se cuantificaron las áreas post (B) y pre-sinápticas tanto como la razón entre sus áreas (D). Las cabezas de flecha indican pérdida de colocalización entre los aparatos pre y postsinápticos (N:3, n:30 Control; N:3, n:33 Fzd9; N:3, n:35 shFzd9; * $p < 0,05$, test-t no pareado). (Barra: 5 μ m)

6.4.7 Fzd9 es un regulador del ensamblaje funcional de la UNM de vertebrado.

Para saber si los cambios en la estructuración de la sinapsis neuromuscular promovidos por Fzd9 se encuentran relacionados a modificaciones en la función sináptica, músculos LAL de animales de 14 días postnatales fueron electroporados con los plasmidios que codifican para las proteínas Tomato, Fzd9 y shFzd9. Luego de 7 días, los músculos fueron disecados con el nervio facial (3 mm aproximadamente) intacto para el registro intracelular de miofibras electroporadas. En el análisis se ensayaron distintos protocolos de estimulación. A alta frecuencia de estimulación, como se observa en los trazos representativos de un tren a 100 Hz durante 1s (figura 21A), los resultados muestran que la sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9, en comparación con el control, no evidencia diferencias significativas en los parámetros de plasticidad sináptica evaluada como facilitación por pulso pareado (PPF) e índice de depresión (ID) sináptica (figura 21A-C), evidenciando una normal dinámica de liberación del neurotransmisor ACh. Considerando

que durante la maduración de la UNM el recambio de subunidades de AChRs favorece la transmisión sináptica, se evaluó el tiempo de subida y el tiempo de decaimiento (τ) de los potenciales postsinápticos a una frecuencia de estimulación de 0,5 Hz durante 300 s (figura 22). Se muestran trazos de representativos de potenciales de placa terminal (figura 22A). Los resultados muestran que la ganancia o pérdida de función de Fzd9 no afecta las propiedades cinéticas de los potenciales evocados de placa terminal de las miofibras electroporadas (figura 22B-C). Sin embargo, dado que se observan cambios en la amplitud de los potenciales de placa evocados en los trazos representativos a alta o baja frecuencia se analizó en detalle los posibles cambios a baja frecuencia de estimulación.



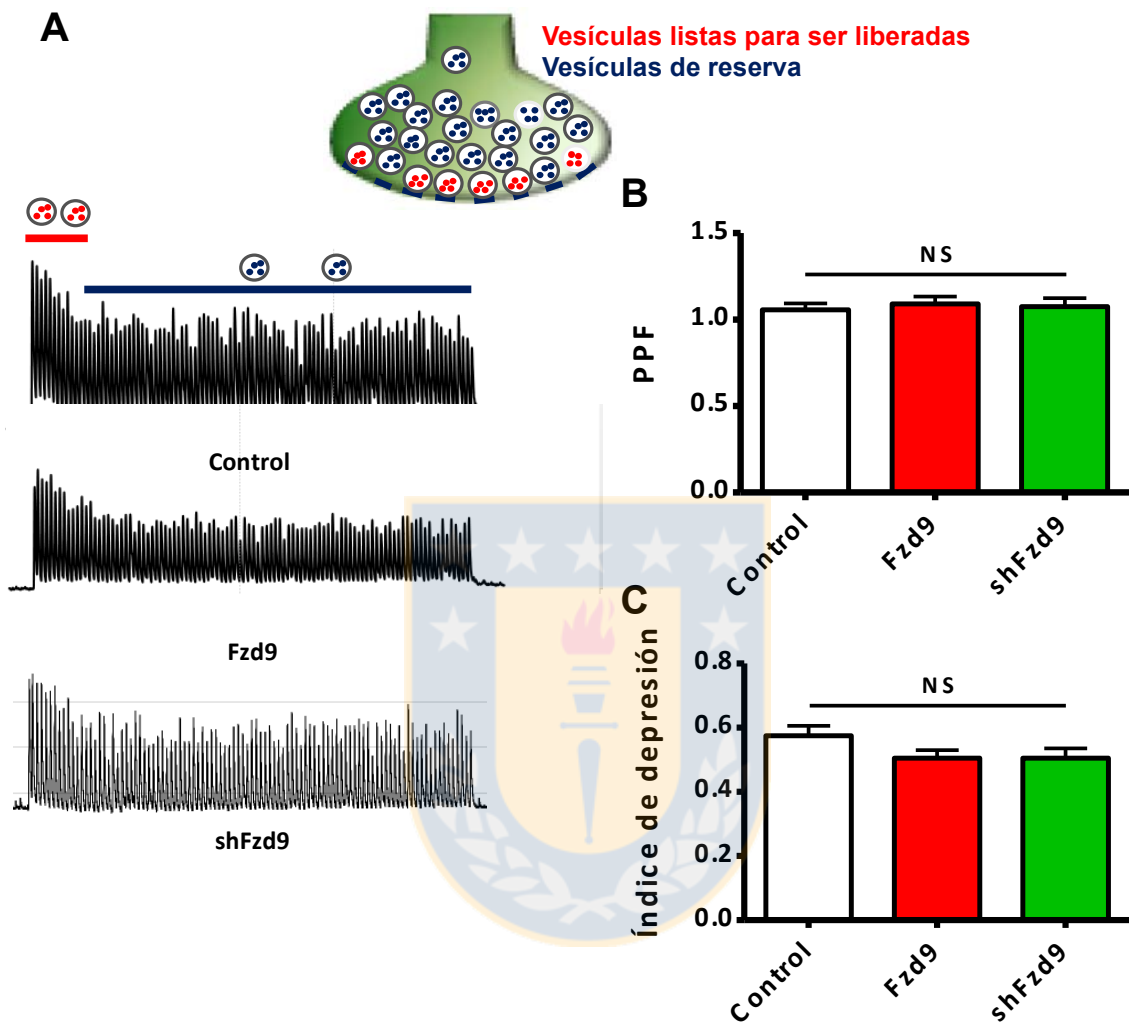


Figura 21 La sobre-expresión o silenciamiento de la expresión del receptor Fzd9 muscular no altera la dinámica de liberación del neurotransmisor ACh.

Se electroporaron músculos LAL en estadio P14 con plasmidios que codifican para Tomato (control), Fzd9 y un ARN de interferencia shFzd9. Luego de siete días, preparaciones *ex vivo* de los músculos electroporados fueron analizadas a través de registro electrofisiológico intracelular. La estimulación presináptica con 4 - 15 V fue realizada mediante un electrodo de succión que mantenía capturado el nervio facial, mientras que el electrodo de registro fue insertado cercano al terminal sináptico de la miofibra. La plasticidad sináptica muestra trazos representativos de un tren de estímulo a 100 Hz durante 1s (A). Los parámetros de Facilitación por pulso pareado (PPF) (B) e Índice de depresión (C) dan cuenta de la dinámica de liberación del grupo de vesículas listo para ser

liberado y del grupo de vesículas de reserva (indicados con las líneas rojo y azul, respectivamente). Bajo la sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9, se observó un comportamiento de la maquinaria presináptica liberadora del neurotransmisor ACh similar al control. (N:3, n:22 Control; N:3, n:28 Fzd9; N:3, n:32 shFzd9).



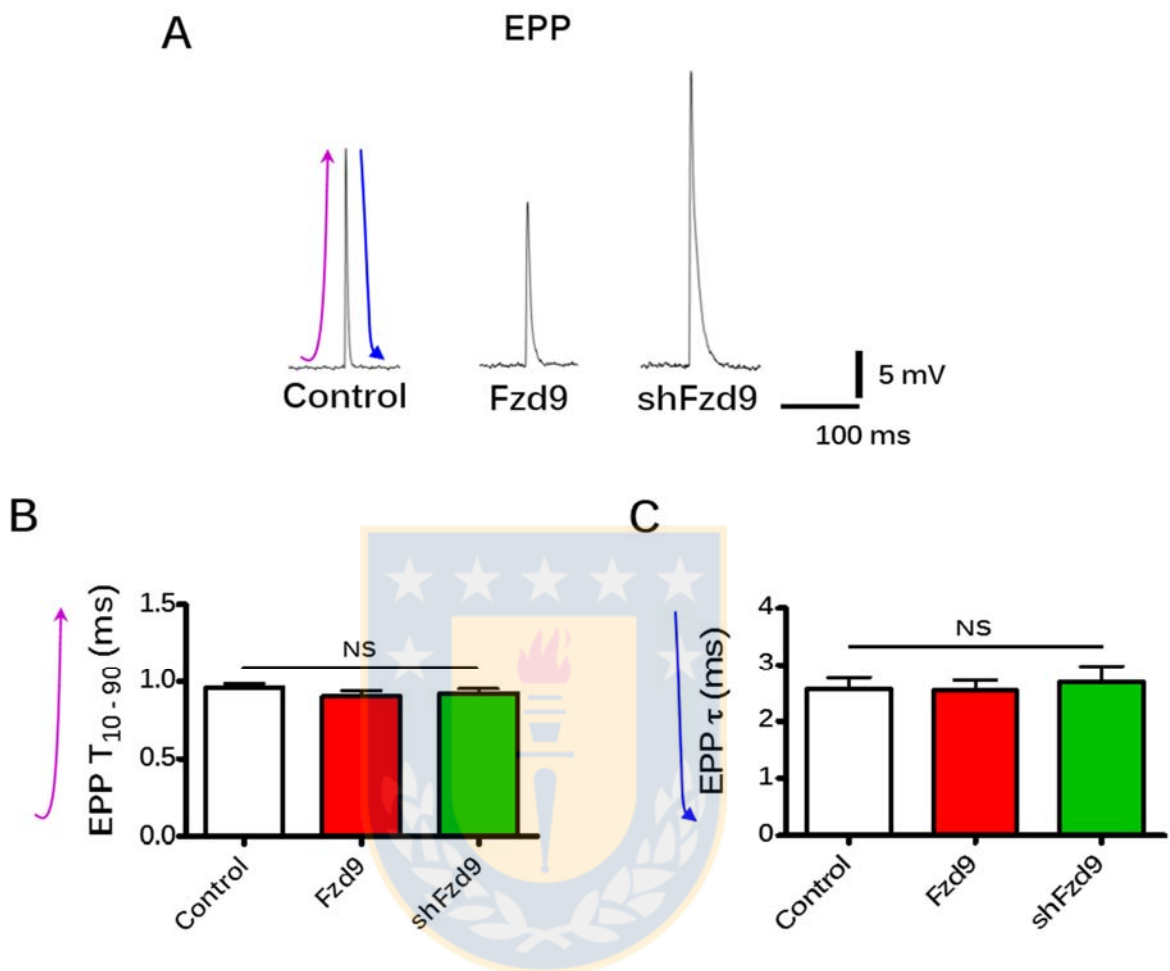


Figura 22 La sobre-expresión y silenciamiento de Fzd9 muscular indican un curso no alterado en la transición de las subunidades de los AChR postsinápticos en la UNM de vertebrado.

Músculos LAL fueron electroporados en P14 con los plasmidios control (Tomato), Fzd9 y el ARN de interferencia shFzd9. Preparados *ex vivo* fueron montados para registro intracelular y estudio de los parámetros cinéticos de los potenciales de placa terminal a estímulos de baja frecuencia (0,5 Hz). Se muestran trazos representativos de cada una de las condiciones (A). En el estudio se promediaron un número de 150 estímulos evocados por miofibra en presencia de μ -conotoxina para inhibir la contracción muscular. El tiempo de incremento T_{10-90} (flecha rosada) y Decaimiento (τ) (flecha azul) fueron analizados bajo las mismas condiciones. (N:3, n:23 Control; N:3, n:29 Fzd9; N:3, n:31 shFzd9).

6.4.8 Fzd9 afecta la liberación evocada y espontánea del neurotransmisor ACh.

Utilizando un protocolo de 0,5 Hz de estimulación de miofibras durante 5 minutos, encontramos que en comparación con el control, la sobre-expresión de Fzd9 induce una disminución significativa de las amplitudes de potenciales de placa motora evocados y espontáneos en $27,30 \pm 3,55$ mV (**p< 0,018; Anova) y $1,02 \pm 0,10$ mV (**p< 0,01; Anova), respectivamente, mientras que los valores control para los mismos parámetros fueron de $50,72 \pm 7,14$ mV y $1,68 \pm 0,15$ mV (figura 23B-C). Por otra parte, cuando se silenció Fzd9 con un ARN de interferencia, se observó que en comparación al control, el promedio de la amplitud de los EPPs, cuyo valor corresponde a $50,63 \pm 4,82$ mV, no fue estadísticamente diferente (figura 23B). Sin embargo, el silenciamiento de Fzd9 produjo una mayor amplitud promedio de potenciales de placa en miniatura de $2,24 \pm 0,15$ mV (**p< 0,01; Anova) (figura 23C). Teniendo en cuenta estos resultados, se calculó el contenido cuantal por el método directo. Para este análisis se consideró la sumatoria de un promedio de las amplitudes de los 100 primeros estímulos evocados y el promedio de los potenciales espontáneos de un registro continuo de 5 min. Los resultados indican que tanto el aumento como la disminución de expresión de Fzd9 redujeron el contenido cuantal en valores de $2585 \pm 169,1$ (*p< 0,05; Anova) y de $2306 \pm 160,1$ (**p< 0,01; Anova), respectivamente; mientras que el valor control fue de $3236 \pm 342,3$ (figura 23D). Estos valores se explican dada la disminución de amplitud promedio de EPPs cuando se sobreexpresa Fzd9 y por el incremento en amplitud de mEPPs cuando Fzd9 es inhibido.

En su conjunto, estos datos sugieren que Fzd9 muscular altera la transmisión sináptica de la UNM.

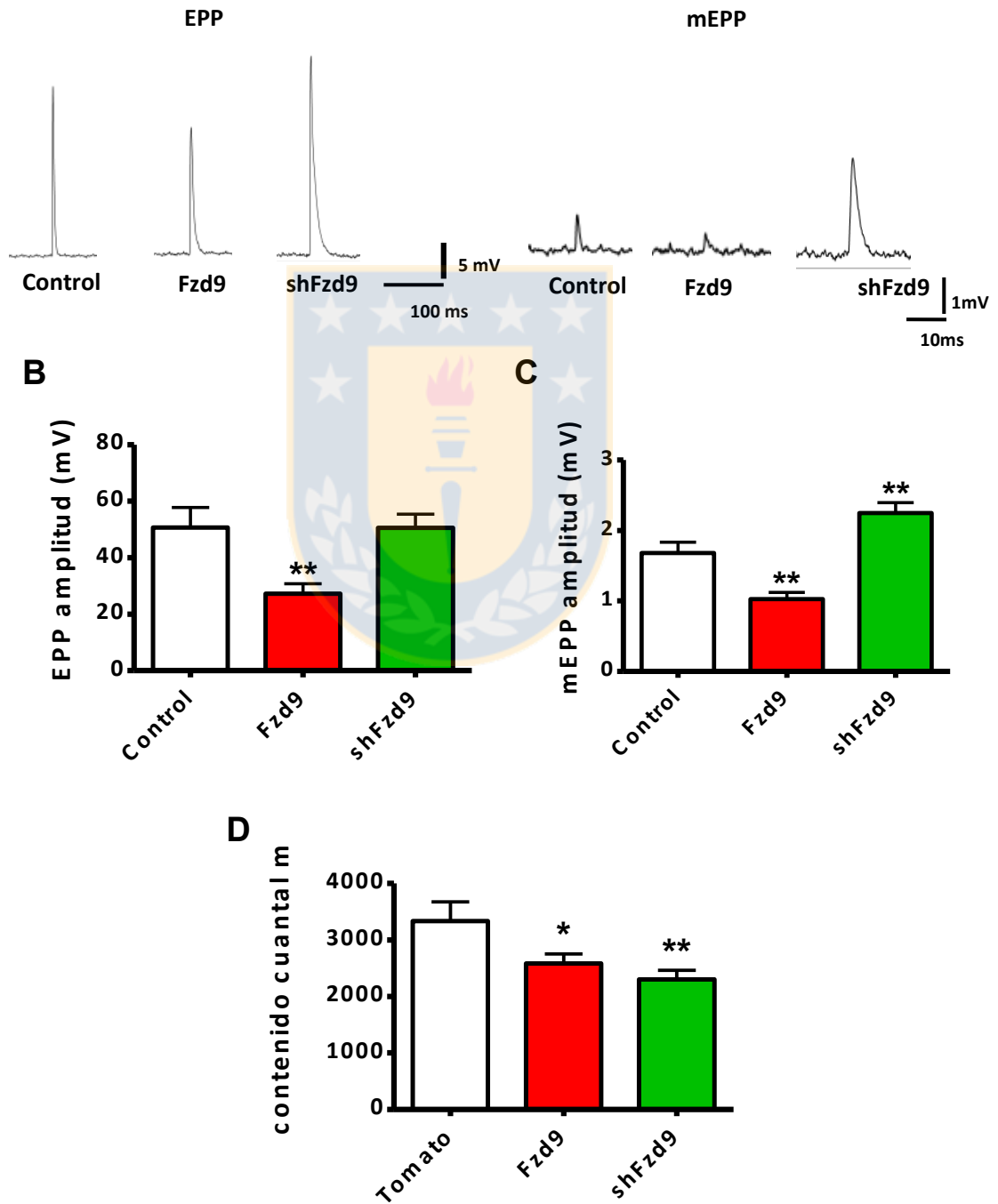


Figura 23 La sobreexpresión o silenciamiento de Fzd9 afectan la liberación evocada y espontánea de neurotransmisor en miofibras de músculo LAL.

Músculos LAL fueron electroporados a P14 con los plasmidios Tomato (control), Fzd9 y shFzd9. En P21, los músculos electroporados fueron procesados para registro intracelular de miofibras. Se muestran trazos representativos de EPP y mEPP a 0,5 Hz de frecuencia (A). Se cuantificaron amplitudes de EPP de 150 estímulos evocados (B), mEPP de un registro continuado de 300 segundos (C) y el contenido cuantitativo de 100 estímulos (D). (Control: N: 3, n: 25; Fzd9 N: 3, n: 29; shFzd9: N:3, n:28). *p<0.05, **p<0.01; test-t no pareado.

6.4.9 La sobre-expresión o silenciamiento de Fzd9 reduce la resistencia de entrada de la membrana.

Las alteraciones encontradas en la amplitud de los potenciales de placa motora así como un menor contenido cuantitativo cuando Fzd9 es sobre-expresado o inhibido, podrían ser consecuencia de cambios en el tamaño de la fibra muscular así como en el número y distribución de los canales en reposo. Para estudiar esta posibilidad, se analizó la resistencia de entrada de la membrana (R_{in}) a través de la Ley de Ohm, donde $V = I * R$. Para ello, los preparados *ex vivo* de músculo LAL fueron montados para registro intracelular de miofibras y estimulados con pulsos cuadrados a 14 Hz de frecuencia durante 5 ms de duración y 200 mV de amplitud, durante aproximadamente 2 - 5 s de registro (figura 24A). Los resultados muestran que, en comparación con el control, donde se observa una resistencia de entrada de $6,25 \pm 0,89 \text{ M}\Omega$, la expresión exógena de Fzd9 o su silenciamiento con un ARN de interferencia reducen significativamente la resistencia de entrada a $3,83 \pm 0,22 \text{ M}\Omega$ (**p< 0,01; Anova) y $4,62 \pm 0,32 \text{ M}\Omega$ (*p< 0,05; Anova),

respectivamente (figura 24B). Estos resultados se correlacionan con los cambios morfológicos evidenciados en el aparato postsináptico de la UNM cuando se modificó la expresión del receptor Fzd9.

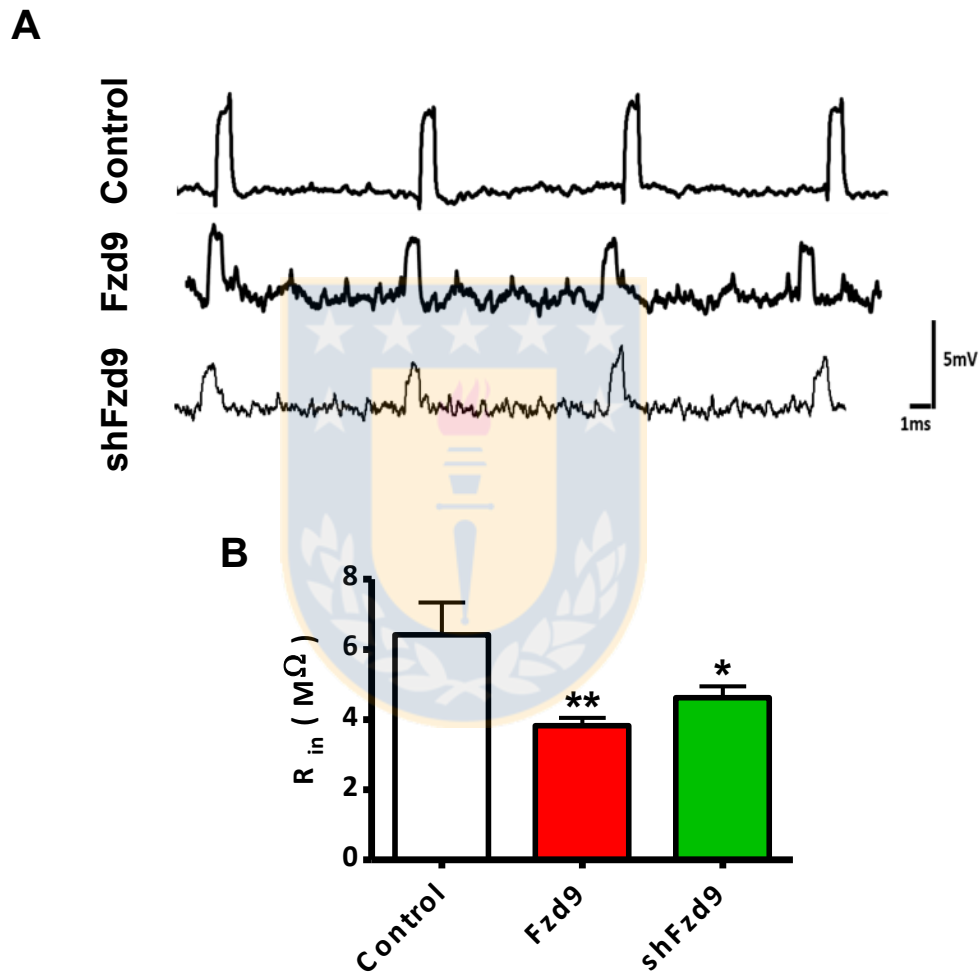


Figura 24 La sobre-expresión y silenciamiento de Fzd9 reducen la resistencia de entrada de la membrana (R_{in}) de fibras musculares.

Músculos LAL se electroporaron en P14 con los plasmidios que codifican para las proteínas Tomato, Fzd9 y el ARN de interferencia shFzd9. Luego de 7 días, los músculos fueron analizados a través de registro intracelular. Se estimuló durante 2 segundos con pulsos cuadrados de 200 mV y 5 ms de duración a 14 Hz a través de la membrana, para producir un cambio en el potencial de membrana como se muestra en los trazos representativos

(A). La sobre-expresión y silenciamiento de Fzd9 reducen la resistencia de entrada de membrana en comparación al control (B) (Tomato N3: n23; Fzd9 N:3, n:29; shFzd9 N:3, n:28). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; test-t no pareado).

6.4.10 La ganancia y disminución de Fzd9 muscular no modifican el área de la sección transversal de miofibras electroporadas.

Para discriminar si la resistencia de entrada de la membrana disminuyó a expensas de un cambio en el tamaño de la fibra muscular, se realizaron electroporaciones de músculo LAL de animales P21 con los plasmidios codificantes para Tomato, Fzd9 y el ARN interferente shFzd9. Luego de 21 días, los músculos fueron procesados mediante cortes en crióstato para la obtención de secciones transversales de 20 μm , las que fueron teñidas con WGA para evidenciar la membrana de las fibras musculares (figura 25A). Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal para generar proyecciones de máxima intensidad de planos z las que fueron digitalizadas. Los resultados muestran que en relación con el control, los parámetros de área de sección transversal (figura 25B), perímetro (figura 25C) y diámetro (figura 25D), no presentan diferencias significativas tanto en las condiciones de sobre-expresión e inhibición de Fzd9. Estos resultados sugieren que los cambios en la resistencia de entrada de la membrana se deben a la reorganización de los AChRs en el aparato postsináptico de la UNM de vertebrado, que es inducido tanto por la sobre-expresión como por la disminución de Fzd9.

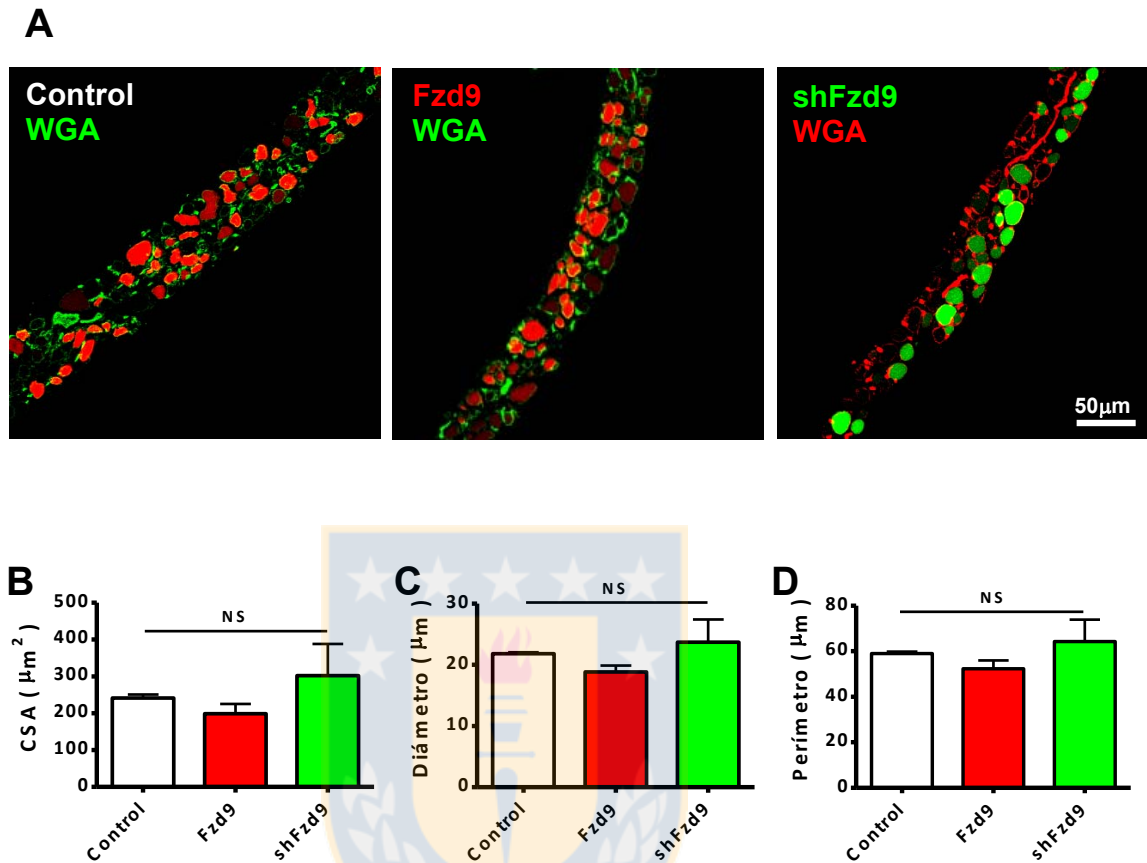


Figura 25 La ganancia o pérdida de expresión del receptor Wnt Fzd9 mediante electroporación de músculo LAL, no altera el tamaño de las miofibras.

Músculos LAL fueron electroporados *in vivo* con 80 μg de plasmidio que codifica para las proteínas Tomato, Fzd9 y el ARN de interferencia shFzd9. Luego de 21 días después de electroporación, los músculos LAL fueron disecados para montaje completo y fijados en formaldehído 1,5 % durante 90 min. Posteriormente las muestras fueron crio-preservadas por inmersión en OCT a -80° C para la obtención de cortes transversales de 20 μm. Se realizaron tinciones con WGA (en verde para Tomato y Fzd9; en rojo para shFzd9) para evidenciar la sección transversal de las miofibras y discriminar entre fibras electroporadas y no electroporadas (A). Imágenes de planos z fueron adquiridas mediante microscopía confocal con un objetivo de 40X y son representativas de al menos tres músculos electroporados para cada condición. Se cuantificaron los parámetros de área de sección transversal CSA (B), diámetro (C) y perímetro (D) donde los resultados fueron similares al control. (Barra : 50 μm). (Tomato: N:3, n:500; Fzd9 N:3, n:346; shFzd9 N:3, n:340)

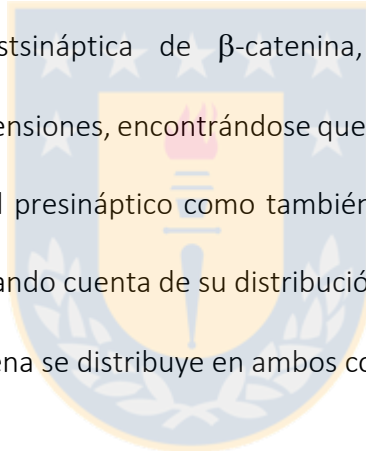
6.5 El efector de la vía Wnt β -catenina es redistribuido en la organización postnatal de la UNM de vertebrado.

La vía de señalización Wnt está involucrada en el desarrollo embrionario de la sinapsis neuromuscular [186, 188, 252]. Previamente se ha descrito que el efector intracelular β -catenina puede tener funciones relevantes para la UNM durante el proceso de formación [188]. Además, hemos reportado que en un modelo *in vitro* de células musculares C2C12 diferenciadas a miotubos, los niveles de β -catenina son incrementados cuando el receptor de la vía Wnt Fzd9 es sobre-expresado [199]. Sin embargo, se desconoce si en etapas postnatales *in vivo*, β -catenina podría participar de la maduración y mantenimiento del terminal de placa motora.

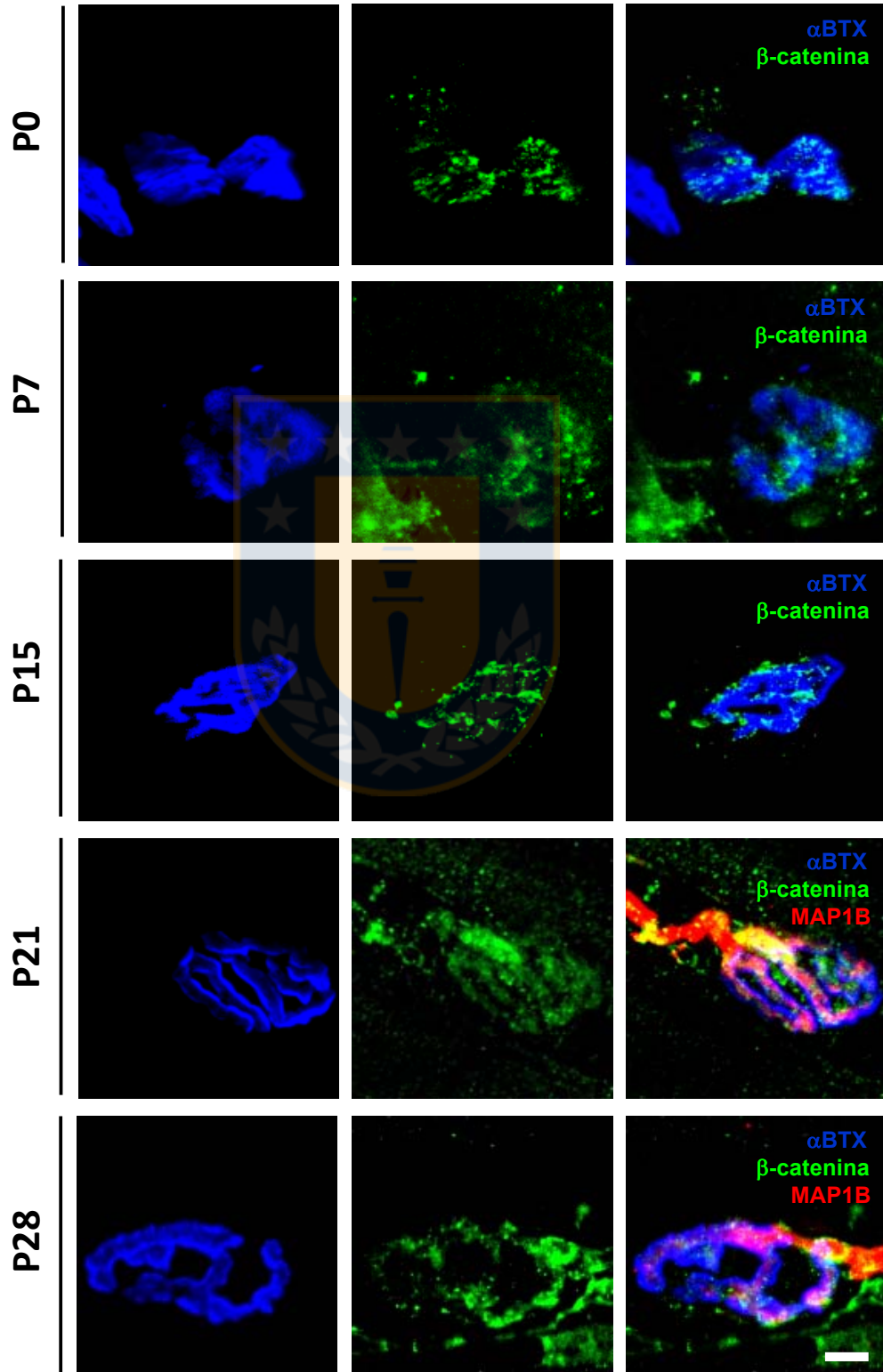
6.5.1 β -catenina se distribuye en la UNM durante la maduración.

Para estudiar si β -catenina se localiza en el terminal sináptico y pueda contribuir a los cambios postnatales de la UNM de vertebrado, músculos LAL fueron disecados a P 0, 7, 14, 21, y 28 días. A continuación, mediante inmunofluorescencia para el montaje de músculos completos se ensayaron inmuno-tinciones contra la proteína β -catenina, la proteína presináptica MAP1B y los AChRs marcados con α BTX. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal y son el resultado de la proyección de la sumatoria de los distintos planos z. Los resultados muestran que β -catenina se localiza tempranamente en el terminal sináptico durante la primera semana del desarrollo

postnatal y que presenta una escasa co-localización con los marcadores para el terminal motor y los AChRs (figura 26, P0 y P7). Con el transcurso del desarrollo postnatal, β -catenina se redistribuye en el terminal motor adquiriendo una localización similar al componente presináptico y ocupando regiones del axón (figura 26, P15 y P21). Esta redistribución en el componente presináptico se hace más evidente en P28 donde se observa que β -catenina colocaliza con los componentes pre y postsinápticos en la región de aposición y además se distribuye en el axón motor. Para discriminar acerca de la distribución pre y postsináptica de β -catenina, se realizaron reconstrucciones volumétricas en tres dimensiones, encontrándose que existen regiones de β -catenina que ocupan tanto el terminal presináptico como también regiones en planos intracelulares respecto de los AChRs, dando cuenta de su distribución en la miofibra (figura 26B). Por lo tanto, β -catenina endógena se distribuye en ambos componentes del terminal sináptico.



A



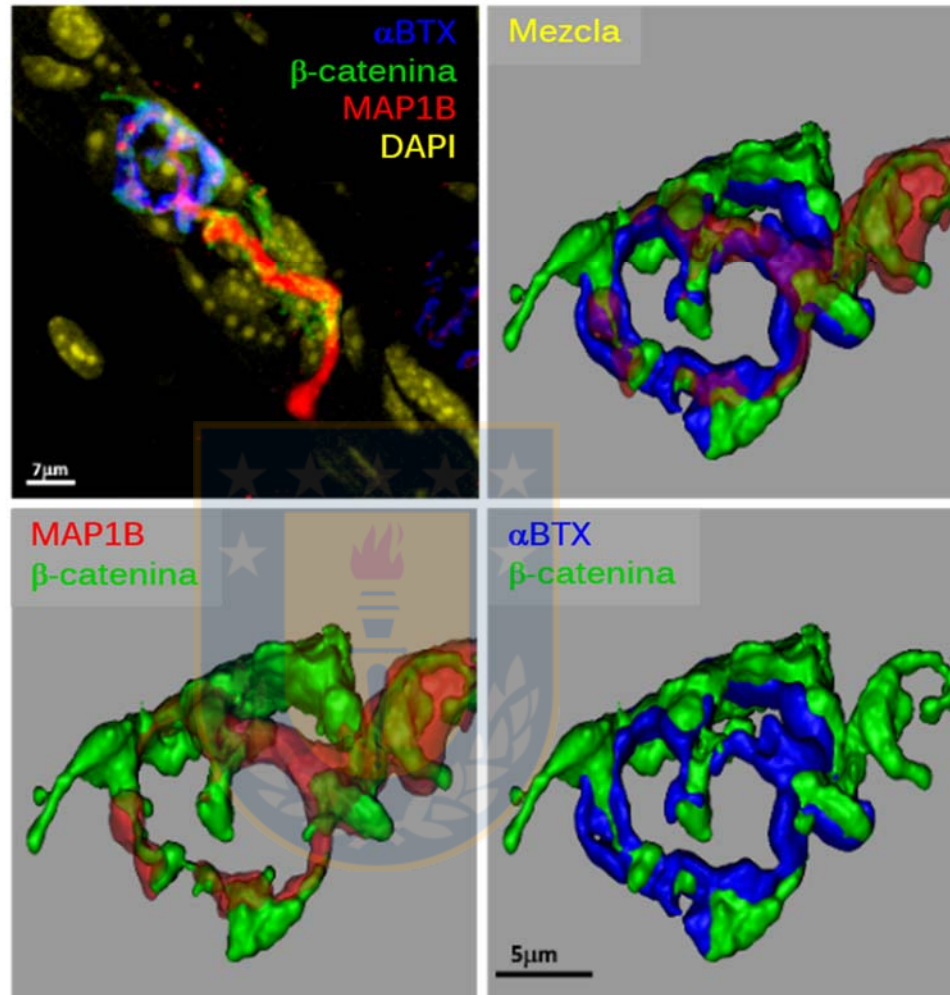
B

Figura 26 Localización de β -catenina durante la maduración postnatal de la UNM de vertebrados.

Músculos LAL fueron disecados y fijados con PFA 4% para montaje completo. Posteriormente fueron inmunomarcados contra β -catenina (verde) y MAP1B (rojo) a P0, P7, P15, P21 y P28 (A). Los AChRs fueron teñidos con α BTX-647 (azul). β -catenina fue colocalizada con los aparatos pre y post-sinápticos encontrándose distribuida en ambos componentes. Se utilizó el programa Imaris para mostrar los canales adquiridos en una proyección de volumen (opción Surpass Volume) considerando los valores de fluorescencia de todos los planos (B), donde se observa una mayor distribución de β -catenina con el componente presináptico. Las imágenes son representativas de al menos dos animales por condición (Barra: 5 μ m).

6.5.2 La distribución de β -catenina en etapa postnatal es mantenida por el aparato presináptico de la UNM de vertebrado.

Previamente mostramos que en un modelo de denervación, la localización y el mantenimiento del receptor Wnt Fzd9 en regiones postsinápticas de la membrana muscular es directamente dependiente de la presencia del terminal presináptico (figura 16). Para conocer si en una condición de denervación el efector Wnt β -catenina altera su localización, utilizamos la denervación del músculo LAL mediante la axotomía del nervio facial en animales adultos. Se removió un segmento de aproximadamente 5mm de nervio para, posterior a 21 días, diseccionar los músculos LAL desde ambos hemisferios para su idéntico procesamiento y estudio. Los músculos fueron fijados y posteriormente teñidos para β -catenina y el componente presináptico contra las proteínas MAP1B y AChT. Los AChRs fueron marcados con α BTX. Los resultados muestran que la ausencia del componente presináptico conlleva a la pérdida de β -catenina desde el terminal de placa motora cuando se compara con el control ipsilateral (figura 27). Esto sugiere que al igual que Fzd9, la localización y distribución de β -catenina es regulada por señales provenientes de la motoneurona.

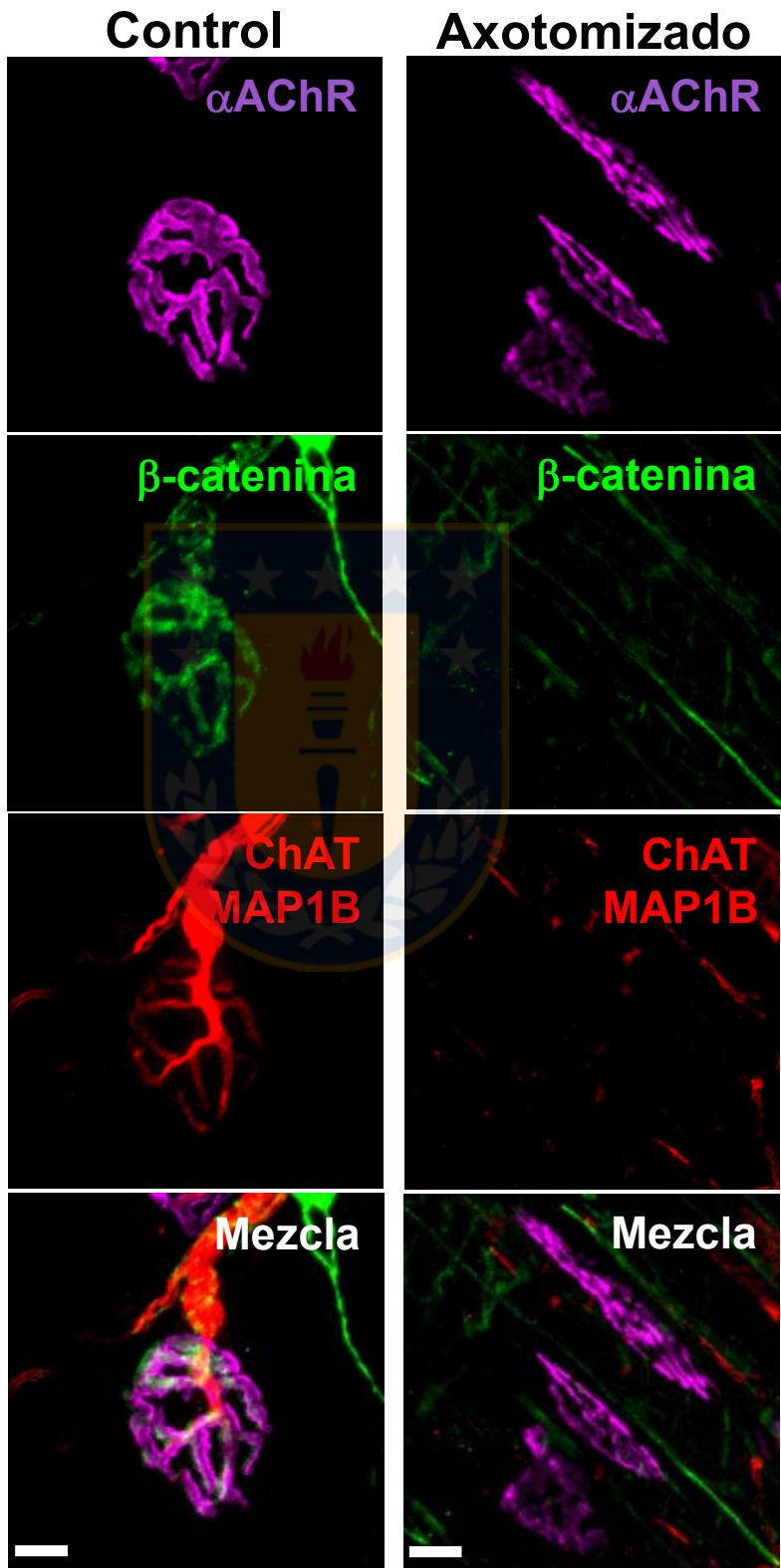


Figura 27 La axotomía del nervio facial afecta la localización de β -catenina en músculos LAL.

El músculo LAL izquierdo de ratones adultos (3 meses) fue denervado en modo ipsilateral durante 21 días. Posteriormente fueron disecados e inmunomarcados con los anticuerpos contra β -catenina y MAP1B / ChAT (rojo). Los AChRs fueron teñidos con α BTX-647. La co-localización de β -catenina (verde) con el terminal del axón motor (rojo) y el terminal postsináptico (magenta) de la UNM fue ensayada mediante la obtención de planos en el eje z de microscopía confocal. Se observó que, al igual que los axones terminales, β -catenina no se detecta en terminales motores denervados comparado con el control. Se muestran fotos representativas de al menos dos animales por condición. Barra: 10 μ m.

6.5.3 La activación de la vía Wnt, altera la localización de β -catenina.

Previamente ha sido reportado que en fibras musculares Wnt3a incrementa los niveles de β -catenina [186]. Para analizar si la activación de la vía Wnt modifica la localización de β -catenina, músculos LAL de ratones adultos fueron electroporados con 80 μ g de los plasmidios que codifican para Tomato y Wnt3a (figura 28, insertos de la columna izquierda). Transcurridos 21 días después de la electroporación, los animales fueron eutanasiados y los músculos LAL fueron separados desde los músculos craneales para su fijación. El inmuno-marcaje se realizó contra la proteína β -catenina mientras que los AChRs fueron marcados con α BTX. Las imágenes corresponden a proyecciones de máxima intensidad de planos z representativas de al menos dos animales por condición obtenidas mediante microscopía confocal. Los resultados indican que en la condición control, β -catenina se localiza en el terminal sináptico distribuyéndose en la región de aposición de ambos componentes y también en el axón de la motoneurona que contacta el terminal

(figura 28, panel superior). Sin embargo, luego de tres semanas de la activación de la vía Wnt con el ligando Wnt3a, se observa que la distribución de β -catenina se circunscribe hacia las regiones donde se encuentran los fragmentos de AChRs que componen cada pretzel y que previamente mostramos en las figuras 10-12 (figura 28). Estos datos muestran que β -catenina podría participar en los cambios morfológicos de la UNM de vertebrado cuando la vía de señalización Wnt es activada. En conjunto, estos datos sugieren que en la UNM de vertebrado, β -catenina se distribuye de manera dinámica durante la etapa postnatal y en función de las alteraciones de los componentes pre y post-sinápticos.



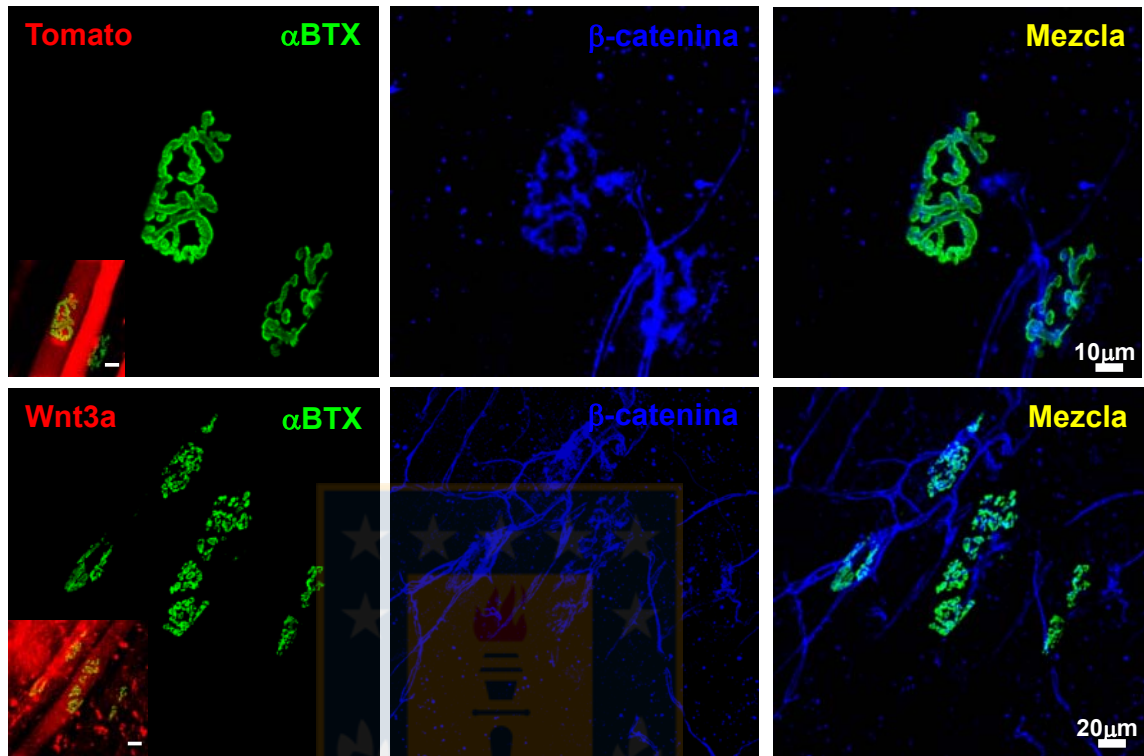


Figura 28 La sobreexpresión muscular de Wnt3a modifica la localización de β -catenina en la UNM.

Músculos LAL de ratones adultos (3 meses) fueron electroporados con vectores que codifican para expresar Wnt3a (co-electroporado con Tomato 1:5) y su control Tomato (fibras rojas en los insertos de la columna izquierda). Posterior a 21 días, las muestras fueron teñidas con α BTX-488 (verde) e inmunomarcadas contra la proteína β -catenina (azul) (A). Proyecciones de máxima intensidad adquiridas con microscopía confocal son representativas de al menos 2 animales por condición. Fue observado que Wnt3a mediante la activación de la vía Wnt dependiente de β -catenina induce una redistribución de β -catenina en los terminales sinápticos (panel inferior), concentrándose en las regiones de fragmentos de agregados del AChR comparado con el control (panel superior). Barra: 10 μ m y 20 μ m.

7. Discusión.

Los actores moleculares implicados en la maduración y/o mantención de la UNM de vertebrado no han sido completamente dilucidados. En este trabajo de tesis, se ha indagado en la posibilidad de que vías de transducción de señales activadas por ligandos Wnt, así como por el neurotransmisor ACh, participen en este proceso. En forma experimental, hemos utilizado la electroporación del músculo esquelético LAL para modificar la expresión de proteínas de interés, tales como el ligando Wnt3a, el receptor Fzd9 y Lrp6, así como también la enzima Cdk5.

7.1 Electroporación del músculo LAL como herramienta de estudio de la UNM de vertebrados.

La electroporación de tejido muscular ha sido propuesta como un posible biorreactor para la secreción de proteínas con un fin terapéutico hacia el mismo tejido o dentro de la circulación [260-264], así como también una posible estrategia para el tratamiento localizado de desórdenes musculares [265-267].

Aun cuando ha sido mostrada la transferencia y expresión de genes exógenos dentro de las fibras musculares mediante la inyección de plasmidios desnudos [268, 269], las aplicaciones desarrolladas a través de esta técnica han sido medianamente limitadas por la eficiencia, reproducibilidad y expresión relativa de genes en cada una de las miofibras

que componen un músculo [270]. Sin embargo, la electrotransferencia incrementa drásticamente la eficiencia en la transferencia de genes y disminuye la variabilidad en su expresión entre cada miofibra haciéndola más predecible. Además, no está sujeta al tiempo de colocación del plasmidio y la entrega de los pulsos eléctricos. Más aun, permite la modulación de la expresión de un gen exógeno por variación en la cantidad de ADN inyectado [270].

Basados en nuestros resultados, el procedimiento de electroporación consistente en 5 pulsos de 20 ms de duración generando un campo eléctrico de $100 \text{ V} / \text{cm}^2$ en el músculo LAL resultó ser altamente eficiente para la expresión transiente de un gen exógeno y suficiente para obtener cerca de un 70% de fibras musculares electroporadas. Adicionalmente, la distribución uniforme del plasmidio en una solución salina hipertónica [271], así como el pretratamiento con hialuronidasa durante 1 hora previo a la electroporación, que facilita la distribución del ADN entre las miofibras, fueron factores que favorecieron el grado de eficiencia del procedimiento [204, 266, 272].

Considerando estas ventajas, en este trabajo utilizamos por primera vez la electropermeabilización *in vivo* de miofibras de músculo LAL, que presenta varias ventajas experimentales para estudiar la morfología y función de la UNM. Con anterioridad había sido descrito que en músculo Tibialis anterior (TA) de ratas adultas, la sobreexpresión por electroporación de una de las proteínas de andamiaje de los AChRs, rapsina, evita la pérdida de AChRs en un modelo de la enfermedad Miastenia gravis, causada por la

generación de anticuerpos contra AChRs [273, 274]. Adicionalmente, se ha descrito que el silenciamiento *in vivo* de rapsina a través de electroporación de músculo TA disminuye los niveles de AChRs, altera la ultra-estructura del aparato postsináptico y reduce la respuesta muscular mediante estimulación eléctrica nerviosa [275]. Sin embargo, estos estudios carecen de un diseño experimental robusto, ya que los plasmidios utilizados tanto para expresar como silenciar rapsina no tienen una etiqueta que permita corroborar y evaluar la electroporación. Cabe mencionar que, el voltaje utilizado en este trabajo fue de $200 \text{ V} / \text{cm}^2$, que la colocación del ADN plasmidial se realizó mediante inyección muscular y que el volumen final utilizado fue de $150 \mu\text{L}$. Todas estas condiciones han sido descritas como agentes importantes en la inducción de daño muscular [204, 212, 260, 276-278]. De hecho, el daño muscular está en relación directa tanto con el voltaje como con el número de pulsos y su duración [279, 280]. Frente al daño, se activa la regeneración muscular, lo que dificulta el análisis e interpretación de los resultados en función del efecto de las moléculas de interés. En un modo importante, se ha establecido que el pretratamiento con hialuronidasa, la reducción en el voltaje y la utilización de pulsos de corta duración resultan en la disminución del daño muscular [204]. Como prueba de lo anterior, el protocolo de electroporación que hemos optimizado para estos experimentos mostró un porcentaje de núcleos centrales similares a animales control y un daño menor al porcentaje reportado previamente para un protocolo de pulsos de $100 \text{ V} / \text{cm}^2$ [204], descartando una alteración relevante del tejido muscular en nuestros estudios. A este respecto, es importante mencionar que se ha reportado que la presencia

de núcleos centrales y fibras con morfología redondeada, los cuales son signos de regeneración muscular, sólo se observaron a tiempos tempranos de electroporación, mientras que 5 días después del procedimiento, prácticamente no se observan señales que pudiesen dar cuenta de daño [281]. Similar a estos antecedentes, en nuestros tiempos de análisis no detectamos fibras musculares redondeadas, indicando que sólo un porcentaje muy menor de fibras podrían haber sido irreversiblemente dañadas y puedan no presentar la sobre-expresión de las proteínas de interés.

Por otra parte, mediante electroporación de músculo esternocleidomastoideo se reportó que rapsina fusionada a GFP requiere de un dominio de miristoilación para su asociación estable con la membrana postsináptica de la UNM donde, también por electroporación, se ha descrito la dinámica de recambio de rapsina [282, 283], así como también una posible vía de señalización reguladora de su expresión [253]. A este respecto, se ha descrito por electroporación de músculo TA, que la sobreexpresión de Wnt3a co-expresado con la proteína fluorescente GFP, induce el desensamble del aparato postsináptico, probablemente inhibiendo la expresión de rapsina para dispersar a los AChRs [186]. Estos estudios sustentan la utilización de proteínas fluorescentes para investigar efectores que puedan modular *in vivo* la estructuración del aparato postsináptico y la transmisión neuromuscular. A este respecto, observamos que una proteína fluorescente no relacionada a la especie como la proteína fluorescente roja “Tomato” mantiene inalterada la morfología postsináptica, lo que sugiere que la

estabilidad, síntesis y reciclaje de los AChRs no son afectados ni por su expresión, ni por el procedimiento de electroporación. Adicionalmente, detectamos que en el desarrollo de la maduración postnatal de la UNM, la expresión de Tomato mediante electroporación no modifica la plasticidad morfológica y estructural de la sinapsis neuromuscular, ya que observamos una transición de estructuras placa a pretzel en número de morfologías y tamaño similar al control. Más aún, luego de la electropermeabilización en músculos LAL de animales adultos para la expresión de Tomato, el contacto entre los terminales axónicos de las motoneuronas y los aparatos postsinápticos permanece similar al de animales control. Esto además fue reflejado en los parámetros electrofisiológicos estudiados en preparados *ex vivo* de músculo LAL durante el periodo postnatal temprano, donde pudimos constatar un nulo efecto frente a la liberación del neurotransmisor ACh de la expresión de Tomato a través de electroporación, sugiriendo un normal desarrollo y mantenimiento de ambos componentes, pre y postsináptico.

Estos datos validan la electroporación de músculo LAL como una estrategia altamente eficiente para el estudio *in vivo* de genes asociados a la función de la UNM. Además, permite un abordaje rápido y reproducible en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de formación, maduración y mantención sináptica, tanto como el entendimiento funcional de patologías neuromusculares.

7.1 La vía ACh/Cdk5/Nestina promueve la reorganización morfológica del aparato postsináptico en la UNM de vertebrado durante etapas postnatales.

En etapas embrionarias, la vía de señalización activada por ACh promueve el desensamble de los AChRs a través del complejo Cdk5/p35 que fosforila nestina [284]. En esta tesis evaluamos la posibilidad de que se active el mismo mecanismo en etapas postnatales para inducir la maduración de la UNM. Previamente ha sido establecido que el desarrollo de músculo esquelético está acompañado de cambios en la composición de filamentos intermedios, donde vimentina es principalmente expresado en mioblastos mientras que desmina en miotubos [285]. Sin embargo, la transición de la proteína de filamentos intermedios nestina es más compleja. Temprano en el desarrollo miogénico ha sido descrito que el mRNA de nestina se expresa en un patrón bifásico [285], que se correlaciona con una reorganización de la red de filamentos intermedios de la cual nestina forma parte y donde experimenta una disminución en su expresión conforme avanza la miogénesis, concentrándose en regiones específicas de la célula muscular [240, 244, 285]. En miotubos postnatales, nestina ha sido encontrada en las bandas Z del sarcómero y en subdominios de membrana asociados al aparato postsináptico [286]. Los resultados encontrados en esta tesis indican que, al igual que estos antecedentes, en etapas perinatales nestina presenta una distribución sarcomerizada a lo largo de la fibra muscular, mientras que en los terminales postsinápticos presenta una distribución inicial difusa, que con el transcurso de la maduración postnatal de la placa motora, se confina

hacia zonas excluyentes de los AChRs. La localización circunscrita de nestina se relaciona con activación de señalizaciones locales. De hecho, estudios previos en modelos heterólogos muestran que las proteínas de filamentos intermedios actúan como andamiaje para proveer una región de membrana donde se circunscriban señales moleculares [287-290]. El aparato postsináptico de la UNM es una región única de la fibra muscular, observación que se sustenta en la unión de ACh a los AChRs nicotínicos en este subdominio restringido de la membrana muscular, que promueve la entrada de iones con la consecuente activación del complejo Cdk5/p35, que es reclutado al sarcolema gracias a la señal de miristoilación de p35 para fosforilar nestina, y que, en ausencia de nestina muscular la actividad quinasa de Cdk5 es suprimida [290].

Cdk5 es un regulador intracelular clave en el desarrollo de la UNM [33]. Aun cuando la distribución endógena *in vivo* de Cdk5 no ha sido reportada en la UNM, estudios de microscopía confocal realizados en este trabajo localizan a la proteína Cdk5 fusionada a GFP en las regiones de baja densidad de AChRs asociados al aparato postsináptico, lo que además concuerda con nuestras observaciones y los antecedentes previamente reportados para nestina. Sin embargo, si consideramos el modelo embrionario descrito principalmente en base a experimentos *in vitro* donde se ha establecido que nestina y Cdk5 estarían asociados a los AChRs [33, 240, 290], cabe entonces preguntarse cómo es que *in vivo* ambos efectores se encuentran enriquecidos en las regiones de baja densidad de AChRs del aparato postsináptico. Una posible explicación involucra la regulación de la

actividad Cdk5 sobre nestina por la proteína p35, que actúa como un co-activador de Cdk5 [240, 241, 290]. Previamente en mioblastos diferenciados ha sido detectado mediante la formación de inmunocomplejos e inmunofluorescencia la interacción física entre Cdk5 y nestina [239, 290]. Sin embargo, el aumento de la actividad quinasa de Cdk5 hacia nestina se produce dado que esta última eleva los niveles de p35 en la membrana muscular en respuesta a la ACh promoviendo la pérdida de AChRs desde la membrana [290]. Por lo tanto, la distribución intracelular de p35 sería esencial en la regulación de Cdk5. En apoyo a esta posibilidad, se ha observado que en ratón el mRNA de p35 disminuye después de nacer [291] y que la proteína presenta una distribución espacial dinámica en el sistema nervioso central, manteniéndose expresado solo por algunas neuronas. En concordancia con estos hallazgos, datos de nuestro laboratorio indican que p35 también se localizaría enriquecido en las zonas sinápticas carentes de AChRs (anexo 2). Por lo tanto, el complejo Cdk5/p35 podría primeramente, promover la maduración del aparato postsináptico, movilizándose hacia la membrana en regiones sinápticas para fosforilar a nestina y con ello desagregar AChRs en regiones discretas y, más tarde, colaborar en la mantención de UNMs maduras a través de su distribución específica en zonas carentes del AChR, donde este complejo podría inhibir la estabilización de los mismos.

Un aspecto clave en la distribución de p35 en la célula se refiere a su biodisponibilidad. Se ha descrito que p35 tiene una vida media corta, siendo rápidamente degradado por

el proteosoma [291, 292]. Así mismo, el complejo Cdk5/p35 está sujeto a una rápida inactivación mediada en parte por la propia actividad de autofosforilación del complejo y la degradación y una consecuente degradación de p35, actuando como un mecanismo regulatorio negativo [239, 292-294]. A este respecto, el rápido recambio de p35 podría ser un mecanismo normal para evitar la formación de complejos Cdk5/p35 estables cuando Cdk5 es activado. En células musculares, se ha observado que bajo la inhibición de Cdk5, el efector p35 se encuentra unido a nestina, mientras que cuando nestina es fosforilada por Cdk5, p35 no se observa asociado a Cdk5/nestina. Esto indicaría que p35 es requerido para la fosforilación de nestina por Cdk5 [239]. Más aún, en mioblastos diferenciados, el tratamiento farmacológico con roscovitina, un inhibidor de Cdk5, evita la degradación de p35 [239]. Tomando estas evidencias y los resultados del presente trabajo, se puede concluir que la localización diferencial de los efectores del complejo Cdk5/p35/nestina podrían colaborar en la regulación de la estabilidad o desensamble de los AChRs para la mantención estructural del aparato postsináptico. En apoyo a esta idea, observamos que la sobreexpresión de Cdk5 en etapas postnatales tempranas reorganiza la distribución de los agregados de AChRs, promoviendo la aparición de pretzels fragmentados. Estos resultados son concordantes con el desarrollo embrionario de la UNM, donde ACh activa Cdk5/p35 para la fosforilación de nestina y producir el desensamble de los AChRs que se encuentran en el sarcolema [282, 290]. Por lo tanto, Cdk5 podría tener también una función desmantelante de agregados del AChRs en etapas postnatales adultas.

Una mirada alternativa de estos resultados, es que nestina actúe como andamiaje molecular de la señalización mediada por complejos Cdk5/p35/Nestina [239]. Esto promovería finas transiciones morfológicas para posibilitar la adaptación funcional de sinapsis neuromusculares, como lo observado en envejecimiento, donde una característica fenotípica de los aparatos postsinápticos es la fragmentación [96, 104]. De manera interesante, la ausencia de nestina en células musculares *in vitro*, junto con la pérdida de la señal de miristoilación de p35 para ser reclutado al sarcolema, promueve un incremento de la capacidad fosforilativa de Cdk5 [290], lo que puede representar otro nivel de regulación del complejo. De hecho, en distintos sistemas, Cdk5 fosforila diversos sustratos, que incluyen a p35 [291], Pak1 [295, 296], β -catenina [297, 298] y el receptor ErbB [251], todas ellas proteínas que participan de la organización de la maquinaria postsináptica en la UNM, abriendo la interesante posibilidad de que la fosforilación dependiente de Cdk5 de estos u otros sustratos participe de la maduración del aparato postsináptico en la UNM.

En el desarrollo embrionario, el neurotransmisor ACh activa la vía mediada por Cdk5/p35/nestina para la desagregación de AChRs. Sin embargo, es poco probable que en una UNM adulta el gatillante de esta vía sea el neurotransmisor. Desde la tercera semana postnatal, la lámina basal es enriquecida en acetilcolinesterasa (AChE) que hidroliza ACh en tiempos de 300-400 μ s [299], limitando su permanencia en el espacio sináptico durante el período postnatal y permitiendo su difusión en forma casi exclusiva

para la respuesta muscular [300, 301]. A este respecto, la actividad Cdk5 podría depender de otras señales derivadas del componente presináptico, ya que en este período los axones terminales se diferencian continuamente y refinan el contacto con los agregados del AChR [4], con lo cual moléculas organizadoras gobiernan la diferenciación y estabilización postsináptica [302, 303]. Más aún, la eficacia de la comunicación en sinapsis depende de los mecanismos que regulan la densidad de los receptores postsinápticos del neurotransmisor en los sitios de liberación [116]. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína quinasa A muscular participa en la inhibición de la maduración de la UNM por a través una vía activada por el factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF, secretado por el terminal motor [304]. Dado que PKA también ha sido descrita como un regulador de la función de Cdk5 en otros sistemas [305], esta quinasa podría participar de la organización postsináptica de la UNM estimulada por el axón motor y mediada por Cdk5.

Existen variados antecedentes que conectan la activación de Cdk5 con señales presinápticas. Por ejemplo, en músculos diafragma embrionarios provenientes de animales carentes de Cdk5, aun cuando los agregados del AChRs están localizados adyacentes al nervio, los axones motores se proyectan más allá de los aparatos postsinápticos [238]. Por otra parte, en cultivos de explantes de músculo diafragma provenientes de animales carentes de motoneuronas, se observó que en comparación al control, tratamientos con el inhibidor de Cdk5 roscovitina inducen una alteración en

la distribución de aparatos postsinápticos, los que se extienden más allá de la región del pre-patrón, sin alterar el número de agregados del AChRs, sugiriendo que Cdk5 está involucrada en la distribución de los AChRs a través de señales derivadas del terminal presináptico [306].

¿A través de qué mecanismos el terminal presináptico podría regular la agregación del AChR en una sinapsis madura? Un organizador neuronal clave de la diferenciación postsináptica en la UNM embrionaria es agrina [307, 308]. La posible función de agrina en la estabilización de los AChR en UNMs maduras ha sido abordada en músculos denervados. En este modelo, los AChRs permanecen por menos de 24 h en el sarcolema mientras que en condiciones control son estables por al menos 14 días [116]. Se ha descrito que la transfección de agrina neuronal en miofibras de músculo soleus, favorece la agregación estable y el tiempo de vida media (a 10 días) de los AChRs en la membrana de fibras musculares denervadas. Sin embargo, independientemente de la cantidad de agrina neural recombinante secretada por los músculos denervados, la estimulación eléctrica del músculo provocó la pérdida de la mayoría de los agregados de AChRs inducidos por agrina [302]. Tomando la aproximación contraria, un elegante abordaje experimental donde se inhibió la actividad contráctil mediante el bloqueo crónico de los AChRs con α -bungarotoxina o curare en condiciones saturantes para impedir la neurotransmisión, evidenció igualmente la pérdida de los agregados del AChRs desde el sarcolema [116]. Más aún, el uso de agentes bloqueantes de los AChRs en músculos

denervados, no aceleró la pérdida de los AChRs, sugiriendo que, independiente de factores tróficos provenientes del axón motor, la activación de la fibra muscular es la variable que determina la tasa de pérdida de AChRs. A este respecto, resulta interesante la evaluación de estimulación de fibras musculares en forma directa sumada al efecto de agentes bloqueantes, donde se encontró que en presencia de curare o α -bungarotoxina, así como también de tetrodotoxina (bloqueador de los canales de Na^+ dependientes de voltaje), la estimulación muscular evitó la pérdida de los AChRs, sugiriendo que la transmisión neuromuscular es necesaria para la mantención de los AChRs en la membrana postsináptica [116].

En apoyo a la función de la transmisión sináptica como señal de mantención y organización del aparato postsináptico, es necesario considerar que la función primaria de las células musculares es generar una fuerza mecánica para el movimiento. Estas fuerzas se generan en los sarcómeros y se transmiten en forma longitudinal a las uniones miotendinosas y de modo lateral a la matriz extracelular [302, 309, 310]. Las fuerzas laterales son transmitidas por cadenas de proteínas, de las cuales F-actina y distrofina son de localización intracelular, distroglicano que se localiza transmembrana y laminina - 2 dispuesta en la lámina basal [311]. La proteína distrofina se observa como franjas transversales sobre los sarcómeros, formando una red en forma de costilla que junto a otras proteínas del citoesqueleto se denominan costámeros, que igualmente se orientan en franjas transversales a la fibra muscular [312]. En denervación, la distribución de los

AChRs es modificada a la par con la de proteínas del citoesqueleto que se asocian a estos receptores. De hecho, la denervación induce que las proteínas que forman parte de los costámeros se orienten en un sentido longitudinal a la miofibra; sin embargo, cuando músculos denervados son estimulados eléctricamente en forma directa, se observa una reorientación de las proteínas de costámeros hacia una disposición transversal, similar a músculos inervados [313]. Un comportamiento similar fue observado respecto a la distribución del AChR, sugiriendo que la actividad muscular organiza el aparato postsináptico modulando la distribución de proteínas que conectan al AChR con el citoesqueleto y la lámina basal. En este sentido, se reportó que tratamientos con una alta concentración de agrina neural recombinante en músculos denervados, preservan la distribución transversal de los AChRs, sugiriendo que no solo la actividad muscular eléctrica sino que también agrina derivada del terminal de la motoneurona mantiene el patrón de costámeros en músculos denervados. Por otra parte, las células musculares secretan una isoforma de agrina distinta a la neural. Concerniente a ello, se ha descrito que la isoforma muscular también puede preservar el patrón transversal que muestran las proteínas de los costámeros, sugiriendo que podría actuar en la organización de especializaciones postsinápticas y su anclaje al citoesqueleto, contribuyendo a la estabilización de AChRs [313].

En una mirada integrativa de los antecedentes señalados, y respecto a los resultados de este trabajo, es posible plantear que el complejo Cdk5/p35/nestina, en conjunto con

efectores de otras vías de señalización activadas por moléculas derivadas del componente presináptico, así como la actividad muscular, podrían promover espacio-temporalmente los cambios morfológicos y funcionales del aparato postsináptico para la correcta respuesta muscular.

7.1 Wnt3a promueve la fragmentación del aparato postsináptico y modifica la transmisión sináptica de la UNM.

Los ligandos Wnt son una familia de glicoproteínas secretadas que tienen funciones relevantes en el desarrollo embrionario [314]. Diversos estudios sugieren funciones de la señalización Wnt en la formación de la UNM [178, 181, 315]. En vertebrados, estudios en la UNM de pez cebra han demostrado que la señalización Wnt contribuye al prepatrón de AChRs [316]. Específicamente, la unión de Wnt11r al receptor MuSK, cuya región extracelular contiene un dominio rico en cisteínas homólogo a los receptores Fzd [190, 317-319], es requerida para la formación aneural de los agregados de AChR [30]. Una función similar se ha mostrado para Wnt4 y su unión a MuSK sobre la formación del prepatrón de agregados de AChR en mamíferos, puesto que ratones nulos para Wnt4 presentan una significativa reducción en el número de agregados de AChR aneurales [31]. Debido a que MuSK es esencial para la diferenciación postsináptica de la UNM, se ha profundizado en la comprensión de cómo este receptor transduce la señal. A este respecto, utilizando la región intracelular de MuSK como blanco, se ha identificado a Dvl

como una proteína intracelular de unión a MuSK [182]. Esta unión es crucial para la agregación de AChRs inducidos por agrina y la transmisión sináptica en la UNM. En cultivos de una línea de células musculares, la inhibición de la función de Dvl o de su expresión no tiene efecto sobre la expresión de AChRs pero disminuye el número de agregados de AChRs inducidos por agrina y la formación de sinapsis neuromusculares en co-cultivo de motoneuronas y miocitos derivados de embriones de *Xenopus* [182].

Dvl es un efector clave de las vías activadas por ligandos Wnt. Al menos dos vías de señalización son activadas río abajo de Dvl, la vía Wnt canónica y la vía Wnt PCP [320]. Así, la interacción funcional de Dvl con MuSK sugiere que una o ambas vías Wnt pueden estar involucradas en la regulación de los agregados de AChRs. En este sentido, agrina estimula la agregación de AChRs a través de dos GTPasas pequeñas que participan de la remodelación del citoesqueleto, Cdc42 y Rac, ambas blancos de la vía Wnt PCP [308, 321]. Agrina también activa a Pak1 para la agregación de AChRs, activación que disminuye en células musculares que expresan dominios mutados de Dvl [182]. Consistente con esta idea, ratones nulos para Dvl1 presentan una anormal distribución de AChRs en músculo diafragma [252]. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la participación de Dvl aún no están claros. Una hipótesis a probar es que Dvl participa en la formación de un complejo de señalización a través de MuSK para la agregación de AChRs. En efecto, en células musculares Dvl podría interactuar con MuSK y Pak1 simultáneamente para formar un complejo ternario. De esta forma, Dvl podría funcionar

reclutando a Pak1. Esta posibilidad es apoyada por la observación que la interrupción de la interacción MuSK/Dvl inhibe la activación de Pak1 por agrina y la posterior agregación de AChRs [182].

La función directa de ligandos Wnt en el ensamblaje del aparato postsináptico de la UNM de vertebrados fue primeramente mostrada mediante experimentos de ganancia y pérdida de función utilizando implantes de células transfectadas para expresar Wnt3 o el antagonista endógeno de la vía Wnt Sfrp1 en la extremidad anterior de embriones de pollo. La implantación de células que expresan Sfrp1 en ala de pollo, en estadios donde las motoneuronas comienzan a inervar miofibras, resultó en una significativa reducción de AChRs [252], demostrando que ligandos Wnt endógenos son requeridos para el ensamblaje postsináptico. En la misma línea, se observó que Wnt3, el cual es expresado en somas de motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal en etapas de inervación de células musculares [194], induce la formación de micro-agregados del AChR que, en presencia de agrina, crecen y se estabilizan posiblemente a través de una vía que comparte efectores con la vía Wnt PCP [252]. Estos datos sugieren que Wnt3 derivado del axón motor colabora con agrina para promover la formación de agregados del AChR grandes y estables. En otro trabajo, se describió que el ligando Wnt3a, que comparte un 85% de identidad con Wnt3, es expresado por el músculo esquelético en estadios de formación de la UNM. De manera opuesta a Wnt3, en cultivos de células musculares Wnt3a reduce la agregación de AChRs inducida por agrina a través de la

inhibición de la expresión de rapsina, una proteína de andamiaje fundamental para el anclaje de los AChRs al sarcolema [253]. De un modo interesante, la sobreexpresión *in vivo* de Wnt3a en músculo Tibialis anterior de ratón de 6 semanas postnatales induce la desorganización del aparato postsináptico, mostrando un alto patrón de disrupción [253]. Adicionalmente, un estudio reciente ha mostrado que en denervación de músculo plantar, Wnt3a muscular incrementa su expresión luego de dos semanas desde la axotomía y se localiza en regiones asociadas al aparato postsináptico, apoyando la idea de que la vía de señalización Wnt podría tener un efecto negativo en la organización del aparato postsináptico y contribuir a la desestabilización de la placa motora en denervación. El aumento de Wnt3a en músculos denervados se correlaciona con la activación de la vía de señalización Wnt dependiente de β -catenina [254]. Con el fin de dilucidar si el aumento en la actividad de la vía Wnt en células musculares afecta la organización de la UNM y la transmisión sináptica, en este trabajo de tesis se sobreexpresó Wnt3a mediante electroporación de músculo LAL de animales adultos. Al igual que los antecedentes previamente reportados [253], se observó que Wnt3a promueve la fragmentación del aparato postsináptico de la UNM. El análisis de aparatos postsinápticos en preparados de músculo completo reveló que Wnt3a incrementa también el número de fragmentos por cada pretzel. Respecto al posible mecanismo involucrado, ha sido bien establecido que el anclaje de los AChRs es dependiente de una red de citoesqueleto de actina crítica para regular la estabilidad de los AChRs [322]. Varias proteínas citoplasmáticas que incluyen a rapsina, quinasas Src y la proteína Hsp90

estabilizan a los agregados de AChRs, incrementado su unión al citoesqueleto [307, 323, 324]. De manera relevante, la agregación y desagregación de AChRs depende del factor despolimerizador de actina ADF/cofilina [136]. Adicionalmente, PAK1 un efector de la familia de GTPasas pequeñas de la familia Rho, regula la agregación de AChRs inducidos por agrina [182, 308, 321]. Por otro lado, la proteína de unión a MuSK, Tid1, media la agregación de AChRs inducida por agrina a través de GTPasas pequeñas [325]. Una proteína Rho factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), efexina-1, ha sido descrita río abajo de la señalización del receptor para efrina EphA4, que activa RhoA [326, 327], que en sinapsis centrales controla la guía axonal y el mantenimiento de sinapsis [327]. En la UNM, efexina-1 muscular resultó ser esencial para la maduración y la transmisión neuromuscular eficiente [75]. Más aún, en cultivo de células musculares, ha sido reportado que Wnt3 colabora con agrina para inducir la agregación de AChRs mediante un mecanismo dependiente de la activación en serie de las GTPasas pequeñas Rac1 (activada por Wnt3) y RhoA (activada por agrina) [252]. Considerando estos antecedentes, es posible que los mecanismos moleculares que subyacen a la reorganización de aparato postsináptico en una estructura fragmentada inducida por la sobreexpresión de Wnt3a se relacione con la activación de señales locales que modifican el citoesqueleto asociado a los AChRs.

Junto a lo anterior, observamos distintos grados de inervación para los aparatos postsinápticos pudiendo encontrarse pretzels parcialmente inervados, ya sea porque

presentan regiones de AChRs libres de terminal presináptico, o por un adelgazamiento del preterminal que contacta los AChRs. Concerniente a este fenotipo observado, se ha descrito que durante etapas de envejecimiento la estructura de la sinapsis neuromuscular cambia incrementando la complejidad de las ramas del terminal nervioso, lo que se desarrolla en paralelo con la fragmentación del aparato postsináptico [328-330]. Tradicionalmente, el envejecimiento ha sido asociado a la degeneración de la UNM donde tales cambios se han correlacionado con la disminución de la masa muscular y la función motora. No obstante, si los cambios en la UNM anteceden la pérdida de masa o fuerza muscular aún no ha sido resuelto. La contracción muscular es iniciada por un potencial de acción generado en la neurona motora y conducido por sus axones, culminando en la liberación de ACh al terminal de la placa motora. De manera interesante, los resultados del presente trabajo muestran que los registros intracelulares realizados en miofibras que sobre-expresan Wnt3a, evidencian que en los terminales neuromusculares se produce un aumento en la amplitud de los potenciales evocados y también un incremento en el contenido cuantal de neurotransmisor liberado. Estudios similares en animales envejecidos y el reciente reporte donde se correlaciona la morfología fragmentada del aparato postsináptico con una mantención o aumento de la transmisión neuromuscular apoyan nuestros hallazgos [109, 330]. De esta manera, se confirma que el incremento en la fragmentación de la UNM propiamente tal, no implica necesariamente una pérdida progresiva en las características fundamentales de la transmisión neuromuscular. Más aún, estos antecedentes revelan que los cambios

morfológicos y funcionales que ocurren en la UNM con el envejecimiento, pueden explicarse en función de una alteración muscular primaria donde la respuesta muscular a la liberación del neurotransmisor se encuentre afectada por un progresivo desacoplamiento de la excitación-contracción [331, 332].

En las fibras musculares, ACh se une a AChRs iniciando un incremento en la conductancia de Na^+ y K^+ en la membrana postsináptica. Los potenciales del terminal de placa motora en la membrana muscular, conducen a la generación de potenciales de acción y su conducción a las invaginaciones del sarcolema o túbulos T. La transducción de cambios en el potencial de membrana eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} . La transducción electromecánica en la fibra muscular requiere la participación del receptor dihidropiridina (DHPR, Cav1.1) [333] localizado en el túbulo T. DHPR es un canal de Ca^{2+} tipo L dependiente de voltaje y su activación evoca la liberación intracelular de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico a través de canales de Ca^{2+} sensibles al receptor de rianodina tipo 1 (RyR1) hacia el sarcoplasma. La consecuencia funcional de la alteración en el número, función o interacción de estos receptores resulta en una reducción en la cantidad de Ca^{2+} intracelular movilizado y pérdida en el desarrollo de la fuerza [332, 334]. El Ca^{2+} está unido a la troponina C, dando lugar a la formación de enlaces cruzados entre la actina y la miosina y el deslizamiento de filamentos para producir la contracción. En un protocolo de estimulación experimental, dos tipos de despolarización, focal y global, toman lugar en el músculo. La despolarización focal es la activación local de AChRs por

ACh, mientras que la despolarización global es un potencial de acción que viaja por todo el túbulo T para producir el acoplamiento E-C. Dos modelos in vivo de ratón que presentan afectado el acoplamiento E-C muestran desorganización de agregados de AChRs. Uno de ellos tiene delecionada la subunidad $\beta 1$ de DHPR (*Cacnb1^{null}*) el cual presenta un significativo incremento del mRNA de MuSK y un aumento de la depolarización espontánea dependiente de ACh [335]. El otro modelo presenta la deleción de *Stac3* [336], que interrumpe la activación voltaje dependiente de DHPR y causa una amplia depolarización.

Dado que *Wnt3a* afecta el número y/o distribución de AChRs [253], se ha estudiado la posible relación entre la actividad DHPR y la señalización de *Wnt3a*. En un modelo de cultivo de explantes de músculo diafragma embrionario de ratón se observó que, en comparación a animales control, cuando el cultivo es proveniente de un diafragma de animales nulos para *Mnx1*, es decir, carentes de motoneuronas ya que no expresan el factor de transcripción *Hb9* necesario para su desarrollo [337], el tratamiento con *Wnt3a* recombinante evidenció una tendencia moderada a disminuir el número o distribución de agregados de AChRs. Sin embargo, cuando se aplicó *Wnt3a* junto con nitrendipino, un bloqueador farmacológico de DHPR, a explantes de diafragma de ratones nulos para *Mnx1*, se observó una significativa disminución de los AChRs [338], sugiriendo que la actividad DHPR inhibe la función desagregante de AChRs por *Wnt3a*. En forma adicional, tratamientos con *Wnt3a* en cultivo de explantes de músculo diafragma de animales

carentes de RyR1 o RyR1/Mnx1 a los cuales se les ha bloqueado farmacológicamente DHPR, igualmente evidencian una significativa disminución del porcentaje de AChRs en comparación con el control [338]. Esto sugiere que Wnt3a podría promover los cambios en la distribución y eliminación de AChRs modificando el balance molecular entre DHPR y RyR1 en el acoplamiento E-C de la transmisión en la UNM.

En su conjunto, nuestras observaciones muestran que Wnt3a induce un activo remodelamiento del aparato postsináptico hacia un fenotipo fragmentado. Este cambio morfológico se correlaciona con un incremento en la eficacia de la transmisión neuromuscular. Ambos parámetros están igualmente afectados en UNMs de individuos envejecidos. Considerando que la función desagregante de AChRs por Wnt3a se relaciona con el acoplamiento E-C, cabe la posibilidad de que Wnt3a promueva la desagregación del aparato postsináptico maduro, para así mantener agregados de AChRs sólo en aquellos subdominios de membrana mejor estructurados para la activación de DHPR/RyR en función de generar una contracción muscular eficiente.

7.2 Fzd9 altera la morfología y función de la UNM en el desarrollo postnatal.

El desarrollo postnatal de la UNM es un proceso que requiere de una interacción recíproca entre el terminal motor presináptico y la especialización postsináptica muscular con la cual se encuentra en aposición [339, 340], que tiene por función definir

la organización molecular que traduce el mensaje neuronal en una fuerza mecánica de respuesta muscular [4]. Una señal esencial para este proceso involucra la unión de agrina neuronal al co-receptor de MuSK, Lrp4, para el mantenimiento de los AChRs postsinápticos [50, 236, 341-344]. El receptor MuSK está conformado por una región extracelular de unión a ligando, un dominio de un solo paso transmembrana y un dominio quinasa intracelular [345]. A su vez, el ectodominio de MuSK está compuesto de tres dominios consecutivos tipo inmunoglobulina que participan en la unión de agrina al co-receptor Lrp4 [346-348] y un dominio rico en cisteínas (CRD) que es homólogo al dominio de 120 aminoácidos CRD de los receptores Fzd de la vía Wnt, que también es compartido por los receptores Ror1, Ror2 y Ryk [30, 233, 318, 319, 349]. La activación de MuSK que promueve la agregación de los AChRs puede ser inducida en forma dual por agrina y ligandos Wnts, siendo solo estos últimos quienes señalizan a través del dominio CRD de MuSK para promover el patrón previo de agregación de AChRs durante etapas de desarrollo embrionario [30, 350-352].

Dado que el dominio CRD de receptores Fzds se encuentra presente en distintos receptores, se ha tratado de determinar su estructura con cierta dificultad experimental, pues los ligandos Wnt presentan una alta insolubilidad y los métodos convencionales de producción de proteínas no mantienen su conformación, que es consecuencia de un complejo conjunto de modificaciones postraduccionales cuyas enzimas no han sido bien caracterizadas [353]. Sin embargo, se ha resuelto la estructura cristalográfica de Fzd8

[317, 354, 355], la cual ha sido comparada con la estructura del dominio CRD presente en MuSK revelando que este último se diferencia del dominio CRD de Fzd8 en el extremo carboxilo terminal, donde se encontraron dos unidades estructurales o protómeros diferentes. Uno de ellos permite una conformación estructural cerrada, mientras que el otro protómero presenta una estructura más relajada, generando una conformación abierta para la unión de ligando. Esta observación en la región C-terminal del dominio CRD de MuSK podría representar que ocurran cambios conformacionales en un determinado contexto fisiológico y que sean inducidos por ligandos Wnt u otra proteína reguladora como el co-receptor Lrp4 [355].

El co-receptor Lrp4 es un miembro de la familia de receptores LDLR de un solo paso transmembrana que presentan un corto dominio carboxilo terminal intracelular y un gran ectodominio [50, 344, 355, 356]. Animales carentes de Lrp4 mueren al nacer y presentan defectos en ambos componentes, pre y postsináptico, observándose un crecimiento aberrante de axones motores, pérdida de AChRs y de la agregación de proteínas postsinápticas, así como también de la expresión diferencial de genes confinados a la región subsináptica [50]. Estas observaciones son concordantes con que, por una parte, el dominio extracelular de Lrp4 es suficiente para mediar la formación de la UNM dependiente de agrina [357], mientras que, por otro lado, Lrp4 podría tener una función complementaria en la formación de la UNM actuando como una señal retrógrada para la diferenciación presináptica temprana [344], donde promueva la agregación de vesículas

sinápticas y proteínas de las zonas activas. Por lo tanto, Lrp4 podría coordinar la formación de sinapsis neuromusculares en forma bidireccional, es decir, en ambos componentes [344].

La unión de agrina a Lrp4 y la directa interacción de ligandos Wnt, para activar MuSK y promover la agregación de AChRs en la formación de la UNM, puede ser una consecuencia temporal en la cual ligandos Wnt promuevan el patrón previo de agregación de AChRs y sean, posteriormente, estabilizados por agrina. Otra posibilidad descrita en forma reciente sugiere una segregación funcional evolutiva divergente sobre la activación de MuSK, donde el patrón previo de agregación de AChRs en pez cebra y en mamífero es inducido por mecanismos distintos [191]. La observación de agregados de AChRs en un ratón carente del dominio CRD de MuSK en etapa embrionaria, sugiere entonces que Lrp4 es suficiente para inducir el patrón previo de agregación de AChRs en mamífero. En forma diferencial, la eliminación genética de Lrp4 en pez cebra y la detección de la formación normal del patrón previo de agregación de AChRs sugiere que, en este caso, la activación de MuSK es mediada por ligandos Wnts [191].

Aun cuando en la UNM embrionaria de mamífero la ausencia del dominio CRD de MuSK exhibe un patrón normal de agregación de AChRs, lo cierto es que la pérdida de los ligandos Wnt4 [351], y Wnt11 [193] evidencian importantes defectos en la inervación muscular además de la pérdida de AChRs, sugiriendo que la señalización Wnt participa en el desarrollo embrionario de la UNM de mamífero. En este contexto, resulta atractivo

tomar como argumentos estas observaciones ya que además indican que ligandos Wnt pueden no sólo actuar a través de su interacción con MuSK, sino también a través de receptores Fzds propios de la vía Wnt. En apoyo a lo anterior, recientemente se ha mostrado que en mamífero, la proteína R-espondina 2, que ha sido descrita como una señal potenciadora de la actividad Wnt [358, 359], es enriquecida y liberada por el terminal presináptico para unirse al receptor Lgr5, que actúa como co-receptor de receptores Fzds de la vía Wnt [359]. Esta señal promueve la activación de MuSK dependiente de ligandos Wnt, con la consecuente agregación del AChR. En músculo diafragma de ratones de estadio embrionario carentes de R-espondina 2, se observó que los AChRs presentan una mayor área de distribución así como una menor intensidad de señal fluorescente. Estos antecedentes sugieren que, si bien se ha mostrado que inmunocomplejos R-espondina/Lgr5 podrían asociarse a MuSK [360], la localización de receptores Fzd de la vía Wnt y la posible función en el contexto de la UNM de mamífero no ha sido reportada.

Previamente reportamos que Fzd9 está localizado en UNMs de estadio embrionario, sugiriendo que podría participar en el desarrollo de esta sinapsis [199]. Adicionalmente, en esta tesis detectamos que los receptores Fzd4, Fzd6 y Fzd9 se localizan en regiones sinápticas en UNMs de músculo Tibial anterior. De particular interés fue el receptor Fzd9 ya que previamente había sido descrito que su ARNm se encuentra disminuido en músculo denervado [198]. En concordancia con este antecedente observamos que, luego

de la axotomía del nervio facial, la proteína Fzd9 no fue detectable en el aparato postsináptico de músculo LAL adulto sugiriendo que, al igual que otras proteínas sinápticas, su distribución postsináptica es dependiente de la inervación. Dada la expresión temprana de Fzd9 y su dependencia del terminal presináptico, abordamos la posible función *in vivo* de Fzd9 en el desarrollo postnatal, donde la sinapsis neuromuscular experimenta drásticos cambios morfológicos y funcionales en los componentes pre y postsináptico [59, 361]. En la ontogenia postnatal, la distribución de Fzd9 endógeno reveló que desde P0 comenzó a confinarse a las regiones postsinápticas que se encuentran en aposición con el terminal motor, como fue observado en etapas adultas y comprobado en proyecciones tridimensionales, sugiriendo una posible función en la maduración del aparato postsináptico. Experimentos de sobreexpresión y silenciamiento de Fzd9 mediante la electroporación *in vivo* de músculo LAL, mostraron que Fzd9 altera la morfología del aparato postsináptico, sugiriendo que una vía de señalización Wnt podría regular la agregación de los AChRs. A este respecto, se correlacionó la función *in vivo* de los actores moleculares de la vía Wnt dependiente de β -catenina, Lrp6, la forma trunca de Lrp6, Lrp6 Δ C, y el antagonista de ligandos Wnt Dkk1 cuyos resultados, en su conjunto, sugieren que ante la activación de la vía Wnt/ β -catenina, el aparato postsináptico experimenta una transición a formas complejas de agregados de AChRs característicos de UNMs de animales adulto, mientras que la inhibición de la vía de señalización podría promover la mantención de aparatos postsinápticos de menor complejidad, retrasando el proceso de maduración del aparato

postsináptico. Esto sugiere que la formación de un complejo de membrana Wnt/Fzd9/Lrp6 podría tener una función desagregante de los AChRs que son mantenidos por el complejo agrina/Lrp4/MuSK. En apoyo a esta idea, ha sido reportado que los efectores intracelulares de la vía Wnt, Dvl, APC y β -catenina forman parte del andamiaje postsináptico de los agregados del AChRs [362-364]. La alteración de estos efectores Wnt no solo afecta la estructuración de la UNM sino que también evidencian una reducida transmisión sináptica del terminal presináptico [362] así como defectos en la liberación espontánea del neurotransmisor ACh [365, 366]. Los registros electrofisiológicos realizados para evaluar la transmisión sináptica de músculos LAL, donde se sobre-expresó o silenció Fzd9, muestran que los tiempos de subida y decaimiento de los potenciales postsinápticos evocados no se ven alterados, sugiriendo que las propiedades ionotrópicas de los canales de AChRs no fueron modificadas. Asimismo, no se detectaron alteraciones en la movilización y liberación de vesículas del neurotransmisor ACh a alta frecuencia de estimulación, lo que indicó un comportamiento normal en la liberación de vesículas del terminal presináptico. Sin embargo, en respuesta a la estimulación presináptica de baja frecuencia, se determinó un menor contenido cuantal y una respuesta postsináptica disminuida, lo que estaría en relación con el incremento en la complejidad del aparato postsináptico y la pérdida de aposición entre ambos componentes. Esto se traduciría en que, aun cuando la liberación de vesículas presinápticas no se observó alterada, la difusión pasiva del neurotransmisor en el espacio sináptico fue modificada por los cambios morfológicos postsinápticos. Consistente con

que la reorganización postsináptica dada por la sobre-expresión de Fzd9 evidenció un aumento de la superficie de AChRs, sin alterar el tamaño y superficie de las fibras musculares, la resistencia de entrada de membrana fue reducida. Esto sugiere que las alteraciones en la transmisión sináptica pueden ser explicadas por la redistribución de AChRs. Una explicación alternativa que debe ser considerada se refiere a las modificaciones en la densidad de los AChRs, cuya disminución podría afectar la liberación evocada y espontánea del neurotransmisor. Estos hallazgos muestran por primera vez la localización física de receptores Fzd en la sinapsis neuromuscular y la posible función en la regulación de la estructura y transmisión sináptica.

En la literatura se pueden encontrar escasos ejemplos similares al efecto de Fzd9 en la UNM. Uno de ellos es la disrupción de la señalización mediada por el receptor tirosina quinasa TrkB de la neurotrofina BDNF, que resulta en la disminución de la agregación de AChRs, promoviendo un fenotipo fragmentado del aparato postsináptico [367]. De manera interesante, recientemente fue mostrado que la isoforma de la proteína quinasa PKC, cPKC β I, que es exclusiva del terminal presináptico y activada por BDNF para la potenciación de la liberación de ACh, puede incrementar su actividad quinasa inducida por la propia liberación de ACh, sugiriendo que la contracción muscular inducida por la motoneurona es un regulador de la señalización BDNF/TrkB, activando en forma retrógrda la isoforma cPKC β I para modular la función sináptica [368]. Por otra parte, se ha reportado que en músculo diafragma la proteína mucina de tipo

glicosilfosfatidilinositol CD24 es expresada por los núcleos subsinápticos de las fibras musculares. Los ratones carentes de CD24 presentan una neurotransmisión deprimida a alta frecuencia de estimulación [369]. Este efecto fisiológico es acompañado por alteraciones en la captación de AM1-43, una sonda fluorescente dependiente de la actividad sináptica, indicando que CD24 es requerido para un normal ciclo de liberación de vesículas sinápticas. Similares resultados se han observado en ausencia de β -catenina muscular, donde además de una alteración en el tamaño de los agregados de AChRs, se detectó una menor frecuencia en la liberación espontánea de neurotransmisor, sugiriendo que la modificación de una proteína postsináptica induce un cambio en el terminal presináptico a través de una reducción en la liberación de neurotransmisor [365].

En sinapsis centrales, los ligandos Wnt han sido asociados al ensamblaje de los componentes estructurales del compartimiento pre y postsináptico. En cerebelo, Wnt7a es expresado en células granulares al mismo tiempo que axones de fibras musgosas realizan contacto presináptico actuando como una señal retrógrada [370, 371]. En cultivo primario de células granulares se ha mostrado que el remodelamiento axonal es inducido por Wnt7a en forma autocrina [372]. El ligando Wnt7a también participa de la extensión y ramificación axonal, el alargamiento del cono de crecimiento y la acumulación de proteínas sinápticas como sinaptofisina, sinaptotagmina y SV2 [371, 373], sin afectar la agregación de proteínas postsinápticas como la proteína de

andamiaje PSD-95 [374]. Esto se ha correlacionado con ensayos de registros electrofisiológicos en rebanadas de hipocampo de ratas que muestran que, en las regiones CA3-CA1, Wnt7a incrementa la amplitud de potenciales postsinápticos excitatorios y disminuye la tasa de facilitación por pulso pareado [374].

En la postsinapsis, se ha descrito en cultivos de neuronas que el tratamiento con el dominio CRD de Fzd2, que actúa como un secuestrador de ligandos Wnts, disminuye la densidad de espinas, apoyando la idea de que ligandos Wnt participan en la morfogénesis postsináptica. El ligando Wnt5a participa de los cambios morfológicos de diferenciación postsináptica induciendo la formación transiente de protrusiones en dendritas, cuyo resultado fue el incremento en la red de espinas dendríticas maduras [375]. Aun cuando se ha reportado que un posible mecanismo por el cual Wnt5a y Wnt7a incrementan la densidad y madurez de espinas dendríticas es a través de una vía dependiente de Ca^{2+} y calcio calmodulina quinasa II (CamKII) [375, 376], también se ha descrito que el efector Wnt Dvl está involucrado en el desarrollo de la postsinapsis de espinas dendríticas, induciendo su crecimiento y promoviendo el ensamblaje de estructuras pre y postsinápticas en espinas pre-existentes [376]. También se ha descrito que Wnt5a modula el ensamblaje postsináptico incrementando la agregación de PSD-95 a través de la vía Wnt/JNK [377]. De manera interesante, recientemente fue descrito que Wnt5a, el cual modula la plasticidad sináptica en neuronas hipocampales, promueve la formación y densidad de espinas dendríticas a través de su unión al receptor Fzd9,

mediante la activación de una vía dependiente de proteína G [378]. Tomando en cuenta estos antecedentes, surge la interesante posibilidad de que los mecanismos celulares en los cuales está involucrado Fzd9 para modificar la morfología y función de la UNM, también podrían ocurrir a través de la activación de una vía no canónica que involucra la activación de proteína G.

El receptor Fzd9 ha sido detectado en diversos modelos y procesos celulares. Las células ependimarias localizadas alrededor del canal central de la médula espinal expresan Fzd9, Fzd1 y Fzd8, los cuales disminuyen su expresión en el envejecimiento, sugiriendo una función reguladora en el nicho neurogénico de la médula espinal [379, 380]. Por otra parte, la pérdida auditiva resulta de la rápida degeneración de las neuritas entre el ganglio espiral y el órgano de Corti dado que las células ciliadas sensoriales están dañadas o desaparecen perdiendo la capacidad de proporcionar apoyo trófico. Se ha descrito en cultivo primario de neuronas de ganglio espiral que Fzd9 es expresado y se distribuye en el cono de crecimiento, sugiriendo que podría modular y guiar la regeneración de neuritas en neuronas del ganglio espiral adulto [381]. La vía de señalización Wnt a través de Fzd9 ha sido asociada al síndrome de Williams, enfermedad genética caracterizada por un trastorno del desarrollo asociado a malformación de músculo cardíaco, retraso psicomotor, pérdida de la morfología facial y severos defectos en el procesamiento visual del espacio. El receptor Fzd9 se expresa selectivamente en neuronas del hipocampo y es uno de los genes suprimidos en esta enfermedad. Animales carentes de Fzd9 muestran

una anatomía y organización normal del hipocampo. Sin embargo, durante el desarrollo se ha descrito un aumento en la muerte de neuronas del giro dentado por apoptosis. Además, los animales nulos para Fzd9 mostraron importantes deficiencias en pruebas de aprendizaje y memoria visual-espacial, copiando el fenotipo de la enfermedad [382]. Considerando estos antecedentes y los resultados del presente trabajo, es posible postular que Fzd9 es requerido tanto para el desarrollo del sistema nervioso central como periférico donde podría promover cambios morfológicos en la maquinaria postsináptica, para el establecimiento de sinapsis funcionales.

7.3 β -catenina participa de la organización in vivo de los agregados de AChRs en la UNM de vertebrado en la etapa postnatal.

Previamente ha sido reportado que β -catenina regula la agregación de AChRs en cultivo de células musculares *in vitro* [383] y que afecta el desarrollo de la UNM [365]. Además, ha sido mostrado que tanto la sobre-expresión como el silenciamiento de Fzd9 aumentan y reducen, respectivamente, los niveles de β -catenina citosólica [384]. Considerando que β -catenina participa del desarrollo embrionario de la UNM, en esta tesis se analizó la distribución de β -catenina en UNMs durante el período postnatal. En la vía Wnt canónica, los ligandos Wnt se unen a receptores Fzd que interactúan con el co-receptor Lrp5/6 para activar la proteína Dvl que inhibe la fosforilación de β -catenina

a través de GSK3 β . El resultado neto es la acumulación de β -catenina y su translocación al núcleo donde conduce la activación de la transcripción de genes dependiente de factores TCF/LEF-1 [385-388]. Con anterioridad se ha investigado si la vía Wnt canónica está involucrada en el desarrollo de la UNM. Las primeras evidencias mostraron que MuSK interactúa con el dominio DEP del efector Wnt Dvl, mientras que la proteína de la familia de quinasas serina/treonina PAK1 se asocia a la región N-terminal de Dvl formando un complejo ternario que regula la agregación de AChRs [362]. Posteriormente se mostró que la proteína de andamiaje APC, que además es un efector de la vía Wnt que forma parte del complejo que promueve la degradación de β -catenina, interactúa con la subunidad β del AChR [389, 390], siendo requerido para la agregación de AChRs inducidos por agrina [363]. Más aún, también se ha reportado que en modelos neuronales, APC también regula la localización sináptica de la subunidad α 3 del AChR mediante la unión de PSD-93, β -catenina y EB1 [391, 392]; además incrementa la agregación y localización en la membrana de la subunidad α 7 del AChR en respuesta a Wnt7a [393].

Por otra parte, se conoce que la estimulación de miotubos C2C12 con Wnt1 y LiCl, un inhibidor de GSK3 β [394, 395], activan la vía canónica acumulando β -catenina en el citosol. En este modelo, el tratamiento con agrina no parecen afectar el nivel global de β -catenina citosólica bajo condiciones en las que se indujo la formación de agregados de AChR [362, 396]. Sin embargo, agrina utiliza a Gsk3 β para activar MuSK y promover la

agregación de AChRs. Ahora bien, la activación de la vía Wnt mediante tratamientos con LiCl no mostró efecto en la fosforilación de receptores MuSK o AChR, lo que puede implicar que LiCl actúa río abajo de MuSK [396]. A su vez, mientras LiCl y Wnt1 no tienen efecto aparente en la agregación AChRs independiente de agrina en miotubos C2C12, sí parecen tener un efecto inhibitorio de la agregación de AChRs inducidos por agrina [396]. Adicionalmente, se ha mostrado que la agregación del AChR mediante su interacción con rapsina es regulada por β -catenina a través de una vía no canónica [383]. Por lo tanto, una posibilidad interesante es que en ausencia de agrina, rapsina sea inhibida por su unión a β -catenina. Apoyando lo anterior, la activación de la vía Wnt y el aumento de β -catenina inhiben de una forma independiente de factores TCF/LEF-1 la transcripción de rapsina [186].

La función de β -catenina también ha sido evaluada *in vivo*. En músculo diafragma de animales carentes de β -catenina muscular se observa que los AChRs tienen un tamaño mayor y se encuentran ampliamente distribuidos en la superficie muscular en comparación al control. Las ramas del nervio frénico se encuentran deslocalizadas y funcionalmente la liberación evocada y espontánea del neurotransmisor ACh se encuentra disminuida. Más aún, la plasticidad sináptica también se encuentra alterada [365]. Por otra parte, la estabilización de β -catenina muscular también presenta un fenotipo presináptico similar, donde se observó un incremento en las ramas presinápticas y desfasciculación del nervio [397]. La expresión estable de β -catenina

también ha sido estudiada en motoneuronas resultando en un nulo efecto sobre la formación de la UNM [366, 397]. Estos datos sugieren que durante el desarrollo, β -catenina muscular podría funcionar a través de una cascada de señales que regule en forma retrógrada el desarrollo presináptico [365, 366, 397].

Si bien β -catenina es requerida para el desarrollo de la UNM, su distribución endógena en el desarrollo postnatal no ha sido bien caracterizada. Estudios previos muestran que a PO, β -catenina está asociada a las regiones sinápticas en la UNM de músculo diafragma [384]. A este respecto, nuestras observaciones muestran que en etapas tempranas de maduración postnatal de la UNM de vertebrados, β -catenina se distribuye en regiones asociadas a los AChRs y a medida que transcurre el desarrollo, su localización se define en función de la re-estructuración de los componentes sinápticos. Esto es consistente con el estudio en la ontogenia de rata para la proteína AChE [300], y lo observado en la ontogenia de ratón para miosina Va [398], y los resultados de nestina y Fzd9 mostrados en esta tesis. La proteína β -catenina se localiza en ambos componentes sinápticos como quedó en evidencia mediante reconstrucciones tridimensionales. Más aún, en músculos denervados ha sido previamente mostrado que una forma de β -catenina activada incrementa su señal con el tiempo de denervación y se distribuye en el componente postsináptico [399]. Sin embargo, evidencias de esta tesis muestran que cuando se comparó músculos LAL no denervados, en los cuales se observó una señal inmunorreactiva específica de β -catenina que se distribuyó en el aparato postsináptico,

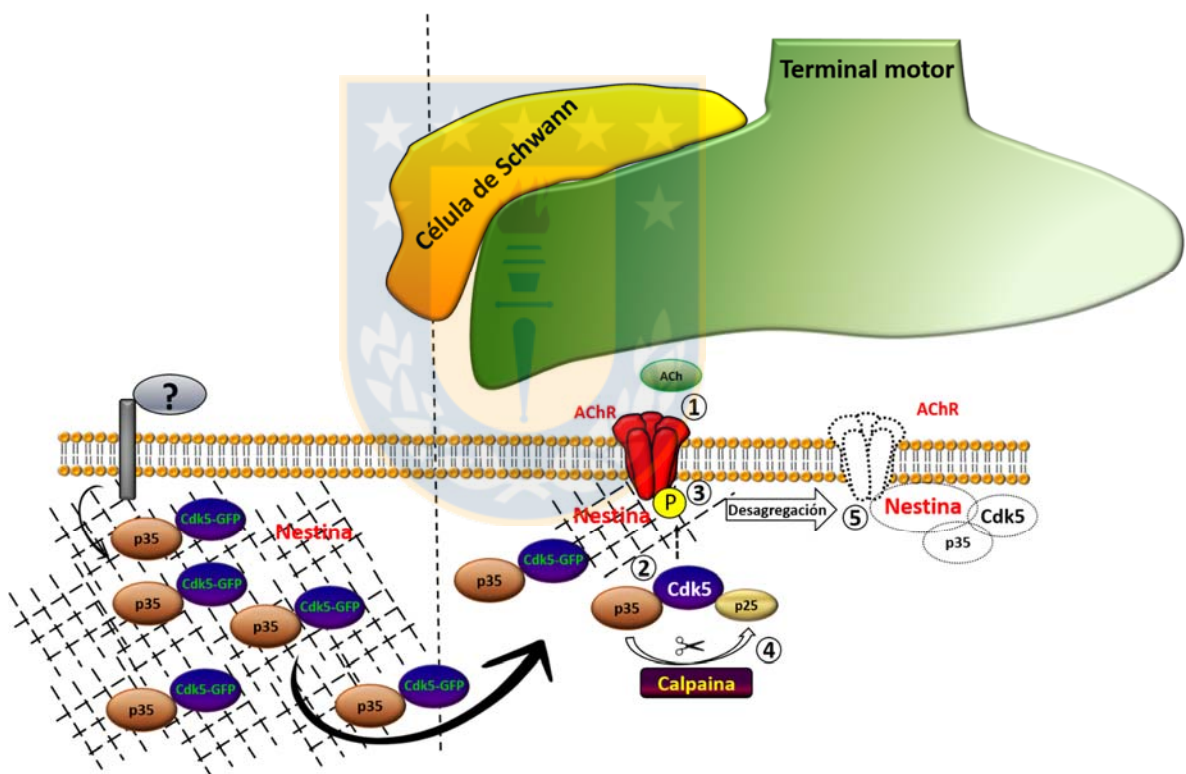
con animales que presentan axotomía del nervio facial por 21 días, la señal inmunorreactiva no fue detectada, indicando que la motoneurona contribuye a la mantención de β -catenina en una zona sináptica. En apoyo a esta observación, se ha descrito que en denervación los niveles de la proteína nestina incrementan hasta el día 21 pero posteriormente disminuye, siendo indetectable al día 56 después de la denervación [244]. La diferencia de esta observación con lo reportado en la literatura [349] podría radicar en el uso de distintos anticuerpos que reconocen β -catenina y de diferentes músculos denervados. Sin perjuicio de ello, una posible explicación biológica a esta discrepancia es que nuestro análisis fue realizado a las 3 semanas de denervación mientras que las observaciones previamente reportadas son luego de 8 semanas, con lo cual, es posible que en nuestra condición no hallamos detectado un contingente de β -catenina que se asocia a los AChRs en forma tardía. Si este fuera el caso, es necesario indicar que, en denervación muscular, los AChRs alcanzan una tasa de recambio menor a las 17 h luego de aproximadamente una semana; por tanto, si β -catenina se asocia a los AChRs en forma tardía, es probable que el mecanismo de estabilización de esos nuevos agregados de AChRs sea distinto a los que había inducido agrina secretada por la motoneurona.

De manera interesante, la sobreexpresión *in vivo* de Wnt3a muscular reorganiza la sinapsis neuromuscular generando que cada pretzel esté conformado por fragmentos aislados de AChRs. En esta condición de activación de la vía Wnt, β -catenina se distribuye

junto con los fragmentos de AChRs. Por lo tanto, aun cuando la morfología del aparato postsináptico sea modificada por la vía Wnt, es posible que la estimulación del terminal presináptico mediante la secreción de agrina, favorezca la asociación de β -catenina a rapsina [364]. Esto sugiere que β -catenina pueda participar en la mantención de los agregados de AChRs probablemente por un mecanismo que regula el citoesqueleto que promueve el fenotipo fragmentado del aparato postsináptico. En forma similar, se ha descrito que la proteasa caspasa-3, usualmente asociada como mediador de muerte celular, promueve la dispersión de los AChRs a través del clivaje del efector de la vía Wnt Dvl, que participa del andamiaje molecular de AChRs y se asocia a GTPasas pequeñas [362]. Sin embargo, la inactivación genética de caspasa-3 y el consecuente mantenimiento de Dvl asociado a los AChRs, favorece la estabilización de agregados del AChR [400]. Por lo anterior, es posible que β -catenina sea distribuida en un modo dinámico durante el desarrollo postnatal y en forma dependiente de la inervación, lo que sugiere que esta proteína podría participar en la mantención de los componentes de la UNM de vertebrado.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran que los cambios morfológicos y funcionales que se desarrollan durante la etapa postnatal para proporcionar una respuesta neuromuscular eficiente en la etapa adulta, subyacen a la regulación de vías extrínsecas. A este respecto, avanzamos en la comprensión de los mecanismos moleculares que contribuyen potencialmente al entendimiento de las

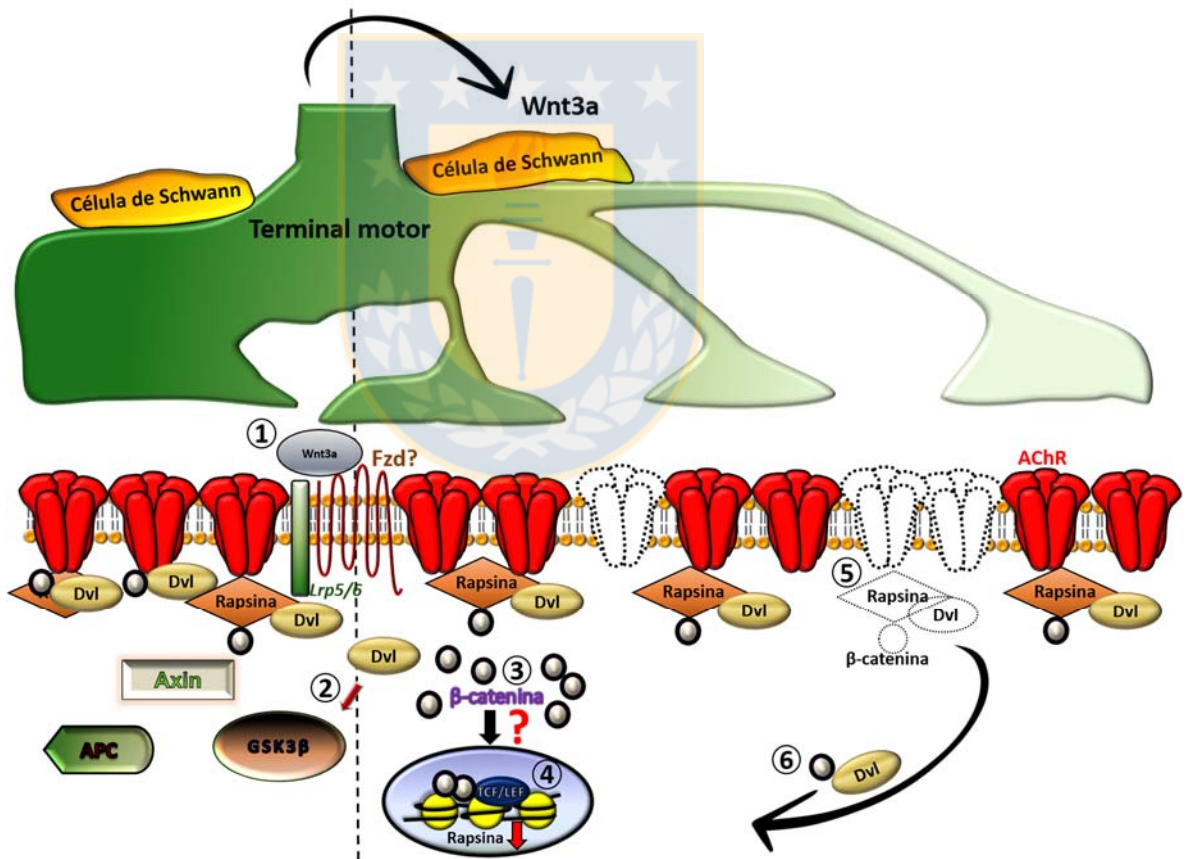
transiciones estructurales del aparato postsináptico en la maduración postnatal y su relación con la transmisión neuromuscular. Específicamente, describimos la participación, por una parte, de la vía ACh/Cdk5/nestina y, por otra, de la señalización Wnt, a través de Wnt3a y Fzd9, como nuevos actores moleculares que podría regular *in vivo* la maduración y/o mantención estructural y funcional de la UNM de vertebrado.



Modelo 1 La vía ACh/Cdk5 regula la agregación del AChR *in vivo* en la etapa postnatal.

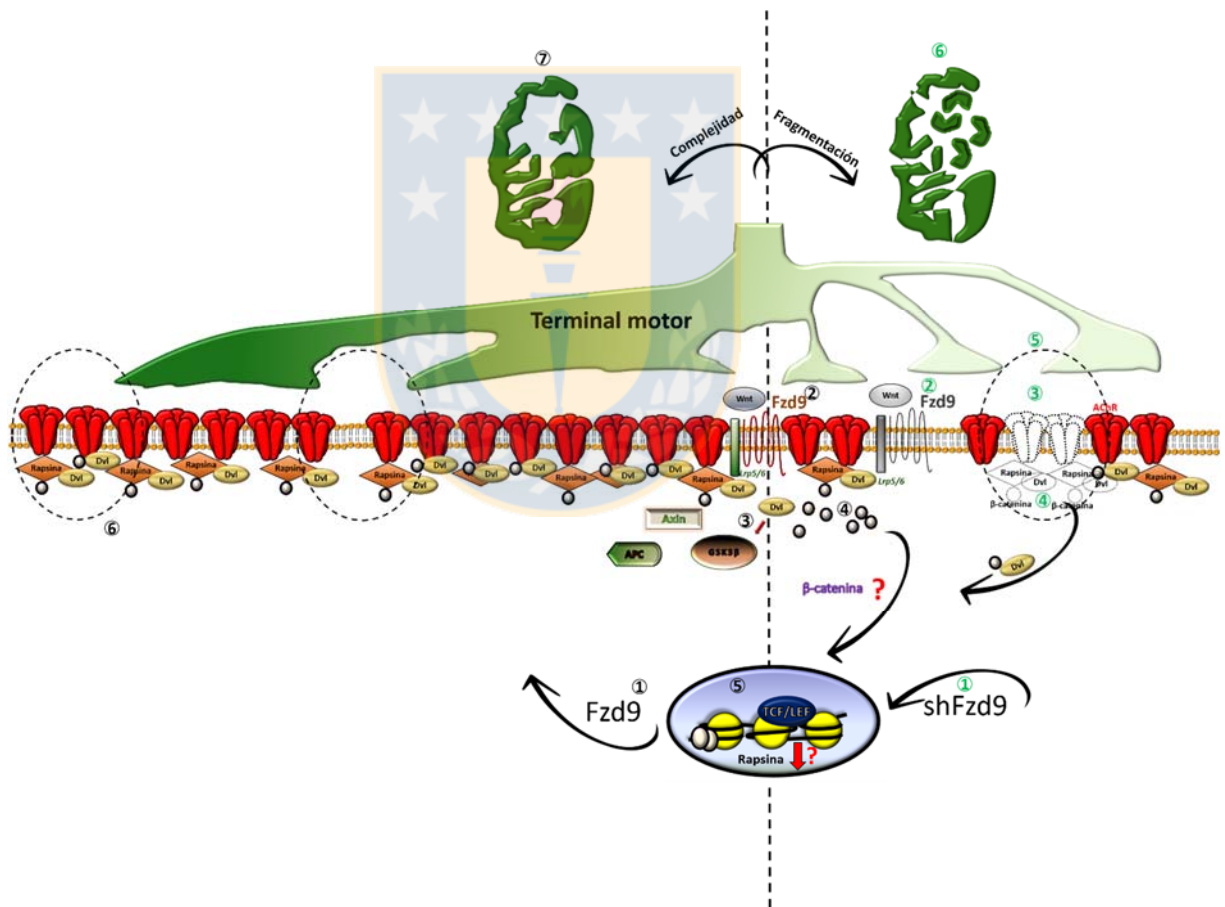
En estadio embrionario, ACh actúa a través de Cdk5 para inhibir la agregación del AChR (1). Sin embargo, en el desarrollo postnatal se desconocen los efectores río arriba de Cdk5. Considerando la actividad desagregante de los efectores intracelulares de la vía en la maduración postnatal del aparato postsináptico, la proteína sobre-expresada Cdk5-GFP se distribuyó en las regiones de baja densidad de AChRs que no cubre el terminal motor, donde también fue detectado tanto nestina como p35. Cdk5-GFP así como la proteína endógena se unen a p35 para alcanzar la membrana muscular y asociarse al filamento

intermedio nestina (2). La estimulación de los efectores río arriba de Cdk5 activan la fosforilación de nestina por Cdk5/p35 (3) mientras que, por otra parte, activa a calpaína dependiente de calcio que escinde a p35 en una forma corta p25 que sobre-activa a Cdk5 (4). Ambos complejos inician la desestabilización de los AChRs desde la membrana y su degradación (5). Como resultado, tanto la sobre-expresión de Cdk5-GFP así como la forma activada de los complejos Cdk5/p35 o Cdk5/p25 se disocian de nestina incrementando el número de complejos activos para promover la desagregación de AChRs.



Modelo 2 La activación de la vía Wnt/ β -catenina a través de Wnt3a induce una morfología y función de la UNM de vertebrado tipo envejecimiento.

En ratones adultos, la sobre-expresión de Wnt3a muscular se une a un receptor Fzd y el co-receptor Lrp5/6, activando la vía Wnt dependiente de β -catenina (1). El efector intracelular Dvl inactiva a la quinasa GSK3 β (2) que fosforila β -catenina favoreciendo su estabilización (3). La acumulación de β -catenina suprime la expresión de rapsina a través de un mecanismo desconocido (4), induciendo la fragmentación del aparato postsináptico (5). Alternativamente, la activación de la vía Wnt/ β -catenina requiere de Dvl y β -catenina, además de la degradación de APC que forma parte del complejo de destrucción de β -catenina, y dado que las proteínas mencionadas participan del citoesqueleto que actúa en el andamiaje de los AChRs, es probable que ocurra un desplazamiento de dichos efectores desde la membrana postsináptica, induciendo la desestabilización de los AChRs (6).



Modelo 3 La sobre-expresión y el silenciamiento de Fzd9 alteran la morfología del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado.

La maduración postnatal de la UNM de vertebrado, experimenta drásticos cambios morfológicos que quedan evidenciados en la transición morfológica “placa a pretzel” del

aparato postsináptico, donde se observa un aumento en la complejidad estructural y la aparición de regiones de baja densidad de AChRs. En la maduración y/o mantención postnatal del aparato postsináptico de la UNM de vertebrado, es posible que mediante la sobre-expresión del receptor Fzd9 (1) se promueva su inserción en la membrana postsináptica (2) y active una vía de señalización Wnt mediante la inhibición de Gsk3 β (3) que podría inducir la acumulación de β -catenina (4), al igual que en cultivos de células musculares *in vitro*, con lo cual podría movilizar distintos efectores asociados al andamiaje de los AChRs para formar estructuras postsinápticas ramificadas y complejas (7) que alteren la aposición de los componentes pre y post-sinápticos, como se muestra en los círculos de línea punteada (6), que finalmente conlleva a una neurotransmisión disminuida. Por otra parte, el silenciamiento de Fzd9 (1) induce la fragmentación del aparato postsináptico por un mecanismo intracelular aun no estudiado que promueve el desensamble de los agregados del AChRs, posiblemente modificando en forma local la distribución de proteínas asociadas a los AChRs, como β -catenina (4), que inducirá una alteración de la aposición entre el terminal motor y la región postsináptica (5) para evidenciar una morfología fragmentada del aparato psotsináptico (6) y una neurotransmisión alterada.

Los resultados más relevantes de este trabajo de tesis doctoral, pueden ser resumidos en:

- 1.- El receptor Fzd9 endógeno es distribuido en forma dinámica en el aparato postsináptico de la UNM de vertebrado durante la maduración postnatal. Asimismo, los efectores intracelulares β -catenina y nestina de las vías Wnt y ACh, respectivamente, son reorganizados en función de los cambios morfológicos de la UNM.
- 2.- La activación postnatal de la vía ACh/Cdk5 mediante la sobre-expresión de Cdk5 altera la agregación del AChRs induciendo la fragmentación del aparato postsináptico.
- 3.- La activación de la vía Wnt/ β -catenina inducida por la sobre-expresión muscular del ligando Wnt3a promueve un fenotipo morfológico fragmentado del aparato postsináptico que favorece la función de la UNM de vertebrado.
- 4.- La sobreexpresión y silenciamiento del receptor Fzd9 muscular alteran la estructuración y la transmisión sináptica de la UNM reduciendo el contenido cuantal de liberación del neurotransmisor ACh.

8.CONCLUSIONES

1.- La transición morfológica “placa a pretzel” del aparato postsináptico que caracteriza el proceso de maduración postnatal de la UNM de vertebrado, podría estar regulado por los efectores intracelulares de la vía ACh/Cdk5 que continúan participando de la desagregación local de los AChRs en el desarrollo postnatal.

2.- Dado que la sobre-expresión muscular de Wnt3a en etapa adulta induce la morfología fragmentada del aparato postsináptico favoreciendo el acoplamiento excitación-contracción en la sinapsis neuromuscular, es posible que Wnt3a participe como un modulador en la mantención de la UNM de vertebrado.

3.- El receptor de la vía Wnt Fzd9 es un nuevo actor molecular postsináptico que podría participar de la regulación del proceso de maduración y/o mantención estructural y funcional de la sinapsis neuromuscular, induciendo la desagregación local de AChRs durante el desarrollo postnatal de la UNM de vertebrado.

9.ANEXOS

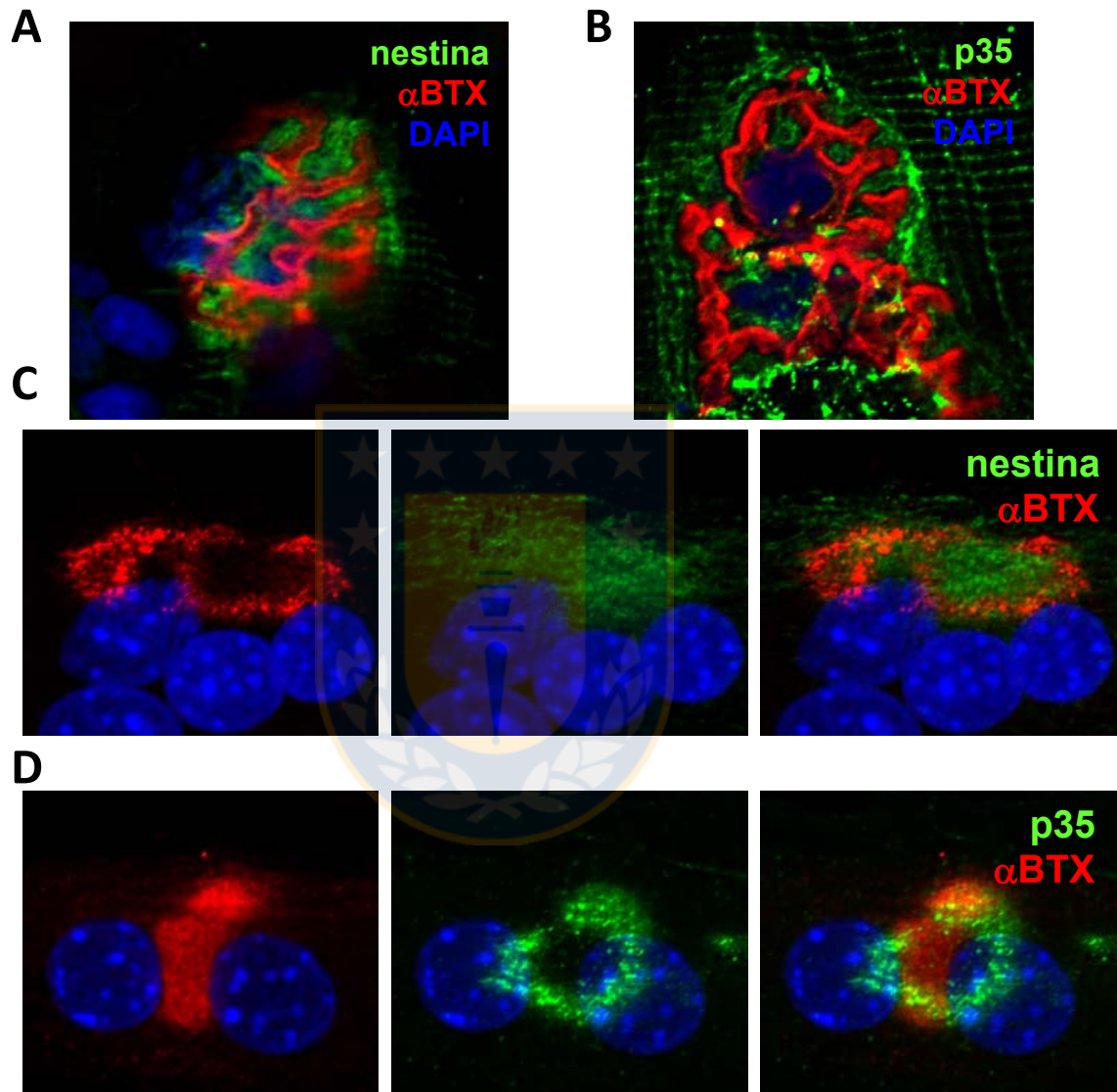


Figura 29 Anexo 1. Distribución de los efectores nestina y p35 de la vía ACh/Cdk5 en la UNM de vertebrado y cultivo de células musculares diferenciadas.

Músculos diafragma de ratón adulto (3 - 6 meses) fueron disecados y fijados en PFA 4%. El inmuno-marcaje se realizó para las proteínas nestina y p35 revelados con un anticuerpo secundario acoplado a Cy2 (verde). Los AChRs fueron marcados con α BTX-555 (rojo) para la co-localización con el terminal sináptico donde se observó que nestina (A) y p35 (B) se distribuyen en regiones sinápticas excluyentes de AChRs (A). Cultivos *in vitro* de células

C2C12 diferenciadas a miotubos sobre laminina y ornitina para generar estructuras postsinápticas complejas tipo pretzels, fueron fijados con PFA y teñidos contra nestina y p35 (verde). Los agregados de AChRs fueron marcados con α BTX-555 (rojo). En este modelo carente del componente neuronal, nestina (C) y p35 (D) se localizan en regiones asociadas a los agregados de AChRs pero con ausencia de un patrón de distribución similar al observado *in vivo* en músculo diafragma.



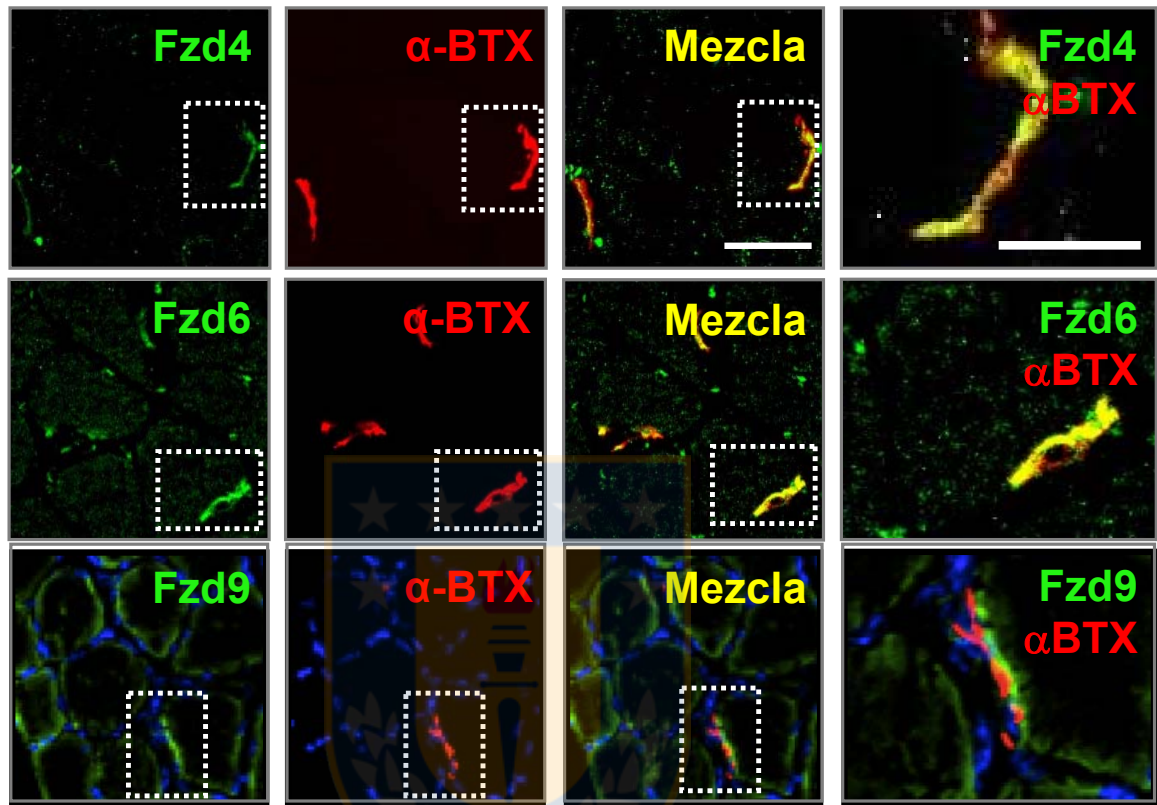


Figura 30 Anexo 2. Localización de receptores Fzds en la UNM de vertebrado.

Músculos *Tibialis anterior* fueron disecados y fijados por congelación en isopentano enfriado con nitrógeno líquido durante 60 segundos. Posteriormente las muestras fueron crio-preservadas por inmersión en OCT a -80° C para la obtención de secciones transversales de 20 μ m. A continuación, se realizaron tinciones inmunofluorescentes con anticuerpos contra las proteínas Fzd4, Fzd6 y Fzd9 (verde) y el marcaje de los AChRs con α BTX-555 (rojo). Las imágenes representativas de planos z de los cortes transversales fueron adquiridas mediante microscopía confocal con un objetivo de 63X para cada condición y procesadas en ImageJ. La superposición de marcas muestra que Fzd4 y Fzd6 colocalizan con los AChRs en la región sináptica, mientras que Fzd9 presenta una colocalización parcial como se muestra en las imágenes aumentadas de la derecha del panel. (Barra: 10 μ m y 5 μ m).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 791-805.
2. Jessell, T.M. and E.R. Kandel, *Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication*. Cell, 1993. **72**, **Supplement**(0): p. 1-30.
3. Lai, K.-O. and N. Ip, *Postsynaptic signaling of new players at the neuromuscular junction*. Journal of Neurocytology, 2003. **32**(5-8): p. 727-741.
4. Shi, L., A.K.Y. Fu, and N.Y. Ip, *Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction*. Trends in Neurosciences, 2012. **35**(7): p. 441-453.
5. Bewick, G.S., et al., *Postnatal emergence of mature release properties in terminals of rat fast- and slow-twitch muscles*. European Journal of Neuroscience, 2004. **19**(11): p. 2967-2976.
6. Jessen, K.R. and R. Mirsky, *Schwann cell precursors and their development*. Glia, 1991. **4**(2): p. 185-194.
7. Mirsky, R. and K.R. Jessen, *Schwann cell development, differentiation and myelination*. Current opinion in neurobiology, 1996. **6**(1): p. 89-96.
8. Hess, D.M., et al., *Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses*. Journal of Comparative Neurology, 2007. **501**(4): p. 465-482.
9. Rimer, M., et al., *Neuregulin-2 is synthesized by motor neurons and terminal Schwann cells and activates acetylcholine receptor transcription in muscle cells expressing ErbB4*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2004. **26**(2): p. 271-281.
10. Reddy, L.V., et al., *Glial cells maintain synaptic structure and function and promote development of the neuromuscular junction in vivo*. Neuron, 2003. **40**(3): p. 563-580.
11. Miledi, R. and C. Slater, *On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section*. The Journal of Physiology, 1970. **207**(2): p. 507-528.
12. Astrow, S.H., Y.J. Son, and W.J. Thompson, *Differential neural regulation of a neuromuscular junction-associated antigen in muscle fibers and Schwann cells*. Developmental Neurobiology, 1994. **25**(8): p. 937-952.
13. Astrow, S.H., H. Qiang, and C.-P. Ko, *Perisynaptic Schwann cells at neuromuscular junctions revealed by a novel monoclonal antibody*. Journal of neurocytology, 1998. **27**(9): p. 667-681.
14. Koirala, S., H. Qiang, and C.P. Ko, *Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction*. Developmental Neurobiology, 2000. **44**(3): p. 343-360.
15. Son, Y.-J. and W.J. Thompson, *Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons*. Neuron, 1995. **14**(1): p. 125-132.
16. Son, Y.-J., J.T. Trachtenberg, and W.J. Thompson, *Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions*. Trends in neurosciences, 1996. **19**(7): p. 280-285.
17. Haydon, P.G. and G. Carmignoto, *Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling*. Physiological reviews, 2006. **86**(3): p. 1009-1031.
18. Pasti, L., et al., *Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ*. Journal of Neuroscience, 1997. **17**(20): p. 7817-7830.
19. Robitaille, R., *Modulation of synaptic efficacy and synaptic depression by glial cells at the frog neuromuscular junction*. Neuron, 1998. **21**(4): p. 847-855.
20. Jahromi, B.S., R. Robitaille, and M.P. Charlton, *Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ*. Neuron, 1992. **8**(6): p. 1069-1077.
21. Robitaille, R., B.S. Jahromi, and M.P. Charlton, *Muscarinic Ca²⁺ responses resistant to muscarinic antagonists at perisynaptic Schwann cells of the frog neuromuscular junction*. The Journal of Physiology, 1997. **504**(2): p. 337-347.
22. Rochon, D., I. Rouse, and R. Robitaille, *Synapse-glia interactions at the mammalian neuromuscular junction*. Journal of Neuroscience, 2001. **21**(11): p. 3819-3829.

23. Todd, K.J., H. Darabid, and R. Robitaille, *Perisynaptic glia discriminate patterns of motor nerve activity and influence plasticity at the neuromuscular junction*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(35): p. 11870-11882.
24. Pinard, A., et al., *Glutamatergic modulation of synaptic plasticity at a PNS vertebrate cholinergic synapse*. European Journal of Neuroscience, 2003. **18**(12): p. 3241-3250.
25. Thomas, S. and R. Robitaille, *Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse*. Journal of Neuroscience, 2001. **21**(4): p. 1087-1095.
26. Lindgren, C.A., et al., *Cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 glycerol ester and nitric oxide are involved in muscarine-induced presynaptic enhancement at the vertebrate neuromuscular junction*. The Journal of physiology, 2013. **591**(19): p. 4749-4764.
27. Petrov, K.A., et al., *Schwann cells sense and control acetylcholine spillover at the neuromuscular junction by $\alpha 7$ nicotinic receptors and butyrylcholinesterase*. Journal of Neuroscience, 2014. **34**(36): p. 11870-11883.
28. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *DEVELOPMENT OF THE VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION*. Annual Review of Neuroscience, 1999. **22**(1): p. 389-442.
29. Weichun, L., et al., *Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1057-1064.
30. Jing, L., et al., *Wnt signals organize synaptic prepatterning and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor*. Neuron, 2009. **61**(5): p. 721-33.
31. Strohlic, L., et al., *Wnt4 Participates in the Formation of Vertebrate Neuromuscular Junction*. PLoS ONE, 2012. **7**(1): p. e29976.
32. Jing, Z., et al., *Zebrafish unplugged reveals a role for muscle-specific kinase homologs in axonal pathway choice*. Nature neuroscience, 2004. **7**(12): p. 1303-1309.
33. Lin, W., et al., *Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism*. Neuron, 2005. **46**(4): p. 569-579.
34. Yang, X., et al., *Patterning of Muscle Acetylcholine Receptor Gene Expression in the Absence of Motor Innervation*. Neuron, 2001. **30**(2): p. 399-410.
35. Misgeld, T., et al., *Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(31): p. 11088-11093.
36. Vock, V.M., O.N. Ponomareva, and M. Rimer, *Evidence for Muscle-Dependent Neuromuscular Synaptic Site Determination in Mammals*. Society for Neuroscience, 2008. **28**(12): p. 3123-3130.
37. Valenzuela, D.M., et al., *Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: Expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury*. Neuron, 1995. **15**(3): p. 573-584.
38. DeChiara, T.M., et al., *The Receptor Tyrosine Kinase MuSK Is Required for Neuromuscular Junction Formation In Vivo*. Cell, 1996. **85**(4): p. 501-512.
39. Kim, N., et al., *Lrp4 Is a Receptor for Agrin and Forms a Complex with MuSK*. Cell, 2008. **135**(2): p. 334-342.
40. Zhang, B., et al., *LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin*. Neuron, 2008. **60**(2): p. 285-297.
41. Zong, Y. and R. Jin, *Structural mechanisms of the agrin-LRP4-MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012: p. 1-12.
42. Fuhrer, C., et al., *Roles of rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors*. Vol. 19. 1999. 6405-16.
43. Luo, S., et al., *HSP90 β Regulates Rapsyn Turnover and Subsequent AChR Cluster Formation and Maintenance*. Neuron, 2008. **60**(1): p. 97-110.
44. Dobbins, G.C., et al., *The role of the cytoskeleton in neuromuscular junction formation*. Journal of Molecular Neuroscience, 2006. **30**(1-2): p. 115-117.
45. Chen, F., et al., *Rapsyn Interaction with Calpain Stabilizes AChR Clusters at the Neuromuscular Junction*. Neuron, 2007. **55**(2): p. 247-260.

46. Sadasivam, G., et al., *Src-Family Kinases Stabilize the Neuromuscular Synapse In Vivo via Protein Interactions, Phosphorylation, and Cytoskeletal Linkage of Acetylcholine Receptors*. The Journal of Neuroscience, 2005. **25**(45): p. 10479-10493.
47. Mohamed, A.S., et al., *Src-Class Kinases Act within the Agrin/MuSK Pathway to Regulate Acetylcholine Receptor Phosphorylation, Cytoskeletal Anchoring, and Clustering*. The Journal of Neuroscience, 2001. **21**(11): p. 3806-3818.
48. Okada, K., et al., *The Muscle Protein Dok-7 Is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis*. Science, 2006. **312**(5781): p. 1802-1805.
49. Linnoila, J., et al., *A Mammalian Homolog of Drosophila Tumorous Imaginal Discs, Tid1, Mediates Agrin Signaling at the Neuromuscular Junction*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 625-641.
50. Weatherbee, S.D., K.V. Anderson, and L.A. Niswander, *LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction*. Development, 2006. **133**(24): p. 4993-5000.
51. Gautam, M., et al., *Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice*. Nature, 1995. **377**(Nature Publishing Group): p. 232-236.
52. Bolliger, M.F., et al., *Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction*. Journal of Cell Science, 2010. **123**(22): p. 3944-3955.
53. Nishimune, H., *Active zones of mammalian neuromuscular junctions: formation, density, and aging*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1274**: p. 24-32.
54. Nishimune, H., *Molecular Mechanism of Active Zone Organization at Vertebrate Neuromuscular Junctions*. Molecular Neurobiology, 2012. **45**(1): p. 1-16.
55. Patton, B., *Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses*. Journal of Neurocytology, 2003. **32**(5-8): p. 883-903.
56. Feng, Z. and C.-P. Ko, *The Role of Glial Cells in the Formation and Maintenance of the Neuromuscular Junction*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1132**(1): p. 19-28.
57. Bennett, M.R. and A.G. Pettigrew, *The formation of synapses in striated muscle during development*. The Journal of Physiology, 1974. **241**(2): p. 515-545.
58. Hurren, B., et al., *First Neuromuscular Contact Correlates with Onset of Primary Myogenesis in Rat and Mouse Limb Muscles*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133811.
59. Slater, C.R., *Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse*. Developmental Biology, 1982. **94**(1): p. 11-22.
60. <dennis1981.pdf>.
61. Dennis, M.J., L. Ziskind-Conhaim, and A.J. Harris, *Development of neuromuscular junctions in rat embryos*. Developmental Biology, 1981. **81**(2): p. 266-279.
62. Wyatt, R. and R. Balice-Gordon, *Activity-dependent elimination of neuromuscular synapses*. Journal of Neurocytology, 2003. **32**(5-8): p. 777-794.
63. Bishop, D.L., et al., *Axon Branch Removal at Developing Synapses by Axosome Shedding*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 651-661.
64. Redfern, P.A., *Neuromuscular transmission in new-born rats*. The Journal of Physiology, 1970. **209**(3): p. 701-709.
65. Peters, A. and A.R. Muir, *THE RELATIONSHIP BETWEEN AXONS AND SCHWANN CELLS DURING DEVELOPMENT OF PERIPHERAL NERVES IN THE RAT*. Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences, 1959. **44**(1): p. 117-130.
66. Cano, R., et al., *Structural and Functional Maturation of Active Zones in Large Synapses*. Molecular Neurobiology, 2013. **47**(1): p. 209-219.
67. Liley, A.W. and K.A.K. North, *AN ELECTRICAL INVESTIGATION OF EFFECTS OF REPETITIVE STIMULATION ON MAMMALIAN NEUROMUSCULAR JUNCTION*. Journal of Neurophysiology, 1953. **16**(5): p. 509-527.
68. Betz, W.J., *Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog*. The Journal of Physiology, 1970. **206**(3): p. 629-644.
69. Henríquez, J.P. and P.C. Salinas, *Dual roles for Wnt signalling during the formation of the vertebrate neuromuscular junction*. Acta Physiologica, 2012. **204**(1): p. 128-136.
70. Koles, K. and V. Budnik, *Wnt signaling in neuromuscular junction development*. Vol. 4. 2012.

71. Steinbach, J.H., *Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions*. *Developmental Biology*, 1981. **84**(2): p. 267-276.
72. Marques, M.J., J.-A. Conchello, and J.W. Lichtman, *From Plaques to Pretzel: Fold Formation and Acetylcholine Receptor Loss at the Developing Neuromuscular Junction*. *The Journal of Neuroscience*, 2000. **20**(10): p. 3663-3675.
73. Lanuza, M.A., et al., *Pre- and postsynaptic maturation of the neuromuscular junction during neonatal synapse elimination depends on protein kinase C*. *Journal of Neuroscience Research*, 2002. **67**(5): p. 607-617.
74. Kishi, M., et al., *LL5 β : a regulator of postsynaptic differentiation identified in a screen for synaptically enriched transcripts at the neuromuscular junction*. *The Journal of Cell Biology*, 2005. **169**(2): p. 355-366.
75. Shi, L., et al., *Ephexin1 Is Required for Structural Maturation and Neurotransmission at the Neuromuscular Junction*. *Neuron*, 2010. **65**(2): p. 204-216.
76. Flucher, B.E. and M.P. Daniels, *Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein*. *Neuron*, 1989. **3**(2): p. 163-175.
77. Bewick, G.S., C. Young, and C.R. Slater, *Spatial relationships of utrophin, dystrophin, beta-dystroglycan and beta-spectrin to acetylcholine receptor clusters during postnatal maturation of the rat neuromuscular junction*. *Journal of Neurocytology*, 1996. **25**(7): p. 367-379.
78. Trinidad, J.C., G.D. Fischbach, and J.B. Cohen, *The Agrin/MuSK Signaling Pathway Is Spatially Segregated from the Neuregulin/ErbB Receptor Signaling Pathway at the Neuromuscular Junction*. *The Journal of Neuroscience*, 2000. **20**(23): p. 8762-8770.
79. Zhu, D., W.C. Xiong, and L. Mei, *Lipid Rafts Serve as a Signaling Platform for Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering*. *The Journal of Neuroscience*, 2006. **26**(18): p. 4841-4851.
80. Peng, H.B., et al., *Acetylcholinesterase Clustering at the Neuromuscular Junction Involves Perlecan and Dystroglycan*. *The Journal of Cell Biology*, 1999. **145**(4): p. 911-921.
81. Villarroel, A. and B. Sakmann, *Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development*. *The Journal of Physiology*, 1996. **496**(Pt 2): p. 331-338.
82. Missias, A.C., et al., *Deficient development and maintenance of postsynaptic specializations in mutant mice lacking an 'adult' acetylcholine receptor subunit*. *Development*, 1997. **124**(24): p. 5075-5086.
83. Bruneau, E., et al., *Identification of Nicotinic Acetylcholine Receptor Recycling and Its Role in Maintaining Receptor Density at the Neuromuscular Junction In Vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 2005. **25**(43): p. 9949-9959.
84. Bruneau, E.G. and M. Akaaboune, *The dynamics of recycled acetylcholine receptors at the neuromuscular junction in vivo*. *Development*, 2006. **133**(22): p. 4485-4493.
85. Hippenmeyer, S., et al., *ETS Transcription Factor Erm Controls Subsynaptic Gene Expression in Skeletal Muscles*. *Neuron*, 2007. **55**(5): p. 726-740.
86. Méjat, A., et al., *Synapse-Specific Gene Expression at the Neuromuscular Junction*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003. **998**(1): p. 53-65.
87. Schaeffer, L., A. de Kerchove d'Exaerde, and J.-P. Changeux, *Targeting Transcription to the Neuromuscular Synapse*. *Neuron*, 2001. **31**(1): p. 15-22.
88. Diamond, J. and R. Miledi, *A study of foetal and new-born rat muscle fibres*. *The Journal of Physiology*, 1962. **162**(3): p. 393-408.
89. Ginetzinsky, A. and N. Shamarina, *The tonomotor phenomenon in denervated muscle*. *Usp. sovrem. Biol*, 1942. **15**: p. 283-294.
90. Kupfer, C. and G.B. Koelle, *A histochemical study of cholinesterase during formation of the motor end plate of the albino rat*. *Journal of Experimental Zoology*, 1951. **116**(3): p. 397-413.
91. Beckett, E.B. and G. Bourne, *SOME HISTOCHEMICAL OBSERVATIONS ON ENZYME REACTIONS IN GOAT FOETAL CARDIAC AND SKELETAL MUSCLE AND SOME UMAN FOETAL MUSCLE*. *Cells Tissues Organs*, 1958. **35**(3): p. 224-253.

92. Katz, B. and S. Thesleff, *A study of the 'desensitization' produced by acetylcholine at the motor end-plate*. The Journal of Physiology, 1957. **138**(1): p. 63-80.
93. Katz, B. and S. Thesleff, *On the factors which determine the amplitude of the 'miniature end-plate potential'*. The Journal of Physiology, 1957. **137**(2): p. 267-278.
94. Valdez, G., et al., *Shared Resistance to Aging and ALS in Neuromuscular Junctions of Specific Muscles*. PLoS ONE, 2012. **7**(4): p. e34640.
95. Jang, Y.C. and H. Van Remmen, *Age-associated alterations of neuromuscular junction*. Experimental gerontology, 2011. **46**(2-3): p. 193-198.
96. Deschenes, M.R., et al., *Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type*. Developmental Neurobiology, 2013. **73**(10): p. 744-753.
97. Oda, K., *Age changes of motor innervation and acetylcholine receptor distribution on human skeletal muscle fibres*. Journal of the Neurological Sciences, 1984. **66**(2): p. 327-338.
98. Chung, T., et al., *Evidence for dying-back axonal degeneration in age-associated skeletal muscle decline*. Muscle Nerve, 2017. **55**(6): p. 894-901.
99. Robbins, N. and M.A. Fahim, *Progression of age changes in mature mouse motor nerve terminals and its relation to locomotor activity*. Journal of Neurocytology, 1985. **14**(6): p. 1019-1036.
100. Bhattacharyya, B.J., K. Tsen, and M.D. Sokoll, *Age-induced alteration of neuromuscular transmission: effect of halothane*. European Journal of Pharmacology, 1994. **254**(1): p. 97-104.
101. Chai, R.J., et al., *Striking Denervation of Neuromuscular Junctions without Lumbar Motoneuron Loss in Geriatric Mouse Muscle*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28090.
102. Kulakowski, S.A., S.D. Parker, and K.E. Personius, *Reduced TrkB expression results in precocious age-like changes in neuromuscular structure, neurotransmission and muscle function*. Journal of Applied Physiology, 2011.
103. Wang, Q., et al., *Loss of synaptic vesicles from neuromuscular junctions in aged MRF4-null mice (78/80 characters)*. Neuroreport, 2011. **22**(4): p. 185-189.
104. Deschenes, M.R., et al., *Remodeling of the Neuromuscular Junction Precedes Sarcopenia Related Alterations in Myofibers*. Experimental gerontology, 2010. **45**(5): p. 389-393.
105. Gonzalez-Freire, M., et al., *The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle*. Frontiers in Aging Neuroscience, 2014. **6**: p. 208.
106. Punga, A.R. and M.A. Ruegg, *Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases*. Current Opinion in Pharmacology, 2012. **12**(3): p. 340-346.
107. Cheng, A., et al., *Sequence of Age-Associated Changes to the Mouse Neuromuscular Junction and the Protective Effects of Voluntary Exercise*. PLoS ONE, 2013. **8**(7): p. e67970.
108. Messi, M.a.L. and O. Delbono, *Target-Derived Trophic Effect on Skeletal Muscle Innervation in Senescent Mice*. The Journal of Neuroscience, 2003. **23**(4): p. 1351-1359.
109. Banker, B.Q., S.S. Kelly, and N. Robbins, *Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice*. The Journal of Physiology, 1983. **339**: p. 355-377.
110. Willadt, S., M. Nash, and C.R. Slater, *Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 24849.
111. Wood, S.J. and C. R. Slater, *Safety factor at the neuromuscular junction*. Progress in Neurobiology, 2001. **64**(4): p. 393-429.
112. Katz, E., et al., *Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction*. The Journal of Physiology, 1996. **497**(Pt 3): p. 687-697.
113. Nudler, S., et al., *Ca²⁺ Channels and Synaptic Transmission at the Adult, Neonatal, and P/Q-Type Deficient Neuromuscular Junction*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **998**(1): p. 11-17.
114. García, K.D., et al., *The Sodium Channel Scn8a Is the Major Contributor to the Postnatal Developmental Increase of Sodium Current Density in Spinal Motoneurons*. The Journal of Neuroscience, 1998. **18**(14): p. 5234-5239.

115. Schubert, W., et al., *Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites*. Brain Research, 1991. **563**(1): p. 184-194.
116. Akaaboune, M., et al., *Rapid and reversible effects of activity on acetylcholine receptor density at the neuromuscular junction in vivo*. Science, 1999. **286**(5439): p. 503-507.
117. Wang, P., et al., *Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2*. The Journal of Neuroscience, 2005. **25**(5): p. 1219-1225.
118. Wang, Z., et al., *Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis*. The Journal of Neuroscience, 2009. **29**(35): p. 10788-10801.
119. Singhal, N. and P.T. Martin, *Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction*. Developmental Neurobiology, 2011. **71**(11): p. 982-1005.
120. Rogers, R.S. and H. Nishimune, *The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions*. Matrix Biology, 2017. **57-58**: p. 86-105.
121. Fox, M.A., et al., *Distinct Target-Derived Signals Organize Formation, Maturation, and Maintenance of Motor Nerve Terminals*. Cell, 2007. **129**(1): p. 179-193.
122. Nishimune, H., J.R. Sanes, and S.S. Carlson, *A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals*. Nature, 2004. **432**(7017): p. 580-587.
123. Chen, J., T. Mizushige, and H. Nishimune, *Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice*. The Journal of Comparative Neurology, 2012. **520**(2): p. 434-452.
124. Grady, R.M., et al., *Maturation and Maintenance of the Neuromuscular Synapse*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 279-293.
125. Ohlendieck, K., et al., *Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma*. The Journal of Cell Biology, 1991. **112**(1): p. 135-148.
126. Peters, M.F., et al., *[beta]2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle*. NeuroReport, 1994. **5**(13): p. 1577-1580.
127. Patton, B.L., A.Y. Chiu, and J.R. Sanes, *Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 698-701.
128. Bowe, M.A., et al., *Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans*. Neuron, 1994. **12**(5): p. 1173-1180.
129. Campanelli, J.T., et al., *A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering*. Cell, 1994. **77**(5): p. 663-674.
130. Gee, S.H., et al., *Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor*. Cell, 1994. **77**(5): p. 675-686.
131. Sugiyama, J., D.C. Bowen, and Z.W. Hall, *Dystroglycan binds nerve and muscle agrin*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 103-115.
132. Apel, E.D., et al., *Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 115-126.
133. Cartaud, A., et al., *Evidence for in Situ and in Vitro Association between β -Dystroglycan and the Subs synaptic 43K Rapsyn Protein: CONSEQUENCE FOR ACETYLCHOLINE RECEPTOR CLUSTERING AT THE SYNAPSE*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(18): p. 11321-11326.
134. Latvanlehto, A., et al., *Muscle-Derived Collagen XIII Regulates Maturation of the Skeletal Neuromuscular Junction*. The Journal of Neuroscience, 2010. **30**(37): p. 12230-12241.
135. Tanaka, T., et al., *CLAC-P/Collagen Type XXV Is Required for the Intramuscular Innervation of Motoneurons during Neuromuscular Development*. The Journal of Neuroscience, 2014. **34**(4): p. 1370-1379.
136. Chi Wai, L., et al., *Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking*. Nature neuroscience, 2009. **12**(7): p. 848-856.
137. Weston, C., et al., *Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(8): p. 6450-6455.

138. Proszynski, T.J., et al., *Podosomes are present in a postsynaptic apparatus and participate in its maturation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(43): p. 18373-18378.
139. Kang, H., et al., *Regulation of the Intermediate Filament Protein Nestin at Rodent Neuromuscular Junctions by Innervation and Activity*. The Journal of Neuroscience, 2007. **27**(22): p. 5948-5957.
140. Yang, J., et al., *Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse*. Nature neuroscience, 2011. **14**(3): p. 324-330.
141. Fu, A.K.Y., et al., *Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(42): p. 15224-15230.
142. Lai, K.-O., et al., *Expression of Eph Receptors in Skeletal Muscle and Their Localization at the Neuromuscular Junction*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2001. **17**(6): p. 1034-1047.
143. Wilkinson, D.G., *Eph receptors and ephrins: Regulators of guidance and assembly*, in *International Review of Cytology*, W.J. Kwang, Editor. 2000, Academic Press. p. 177-244.
144. Minic, J., et al., *Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase*. European Journal of Neuroscience, 2002. **15**(3): p. 439-448.
145. Miller, J., *The Wnts*. Genome Biology, 2001. **3**(1): p. reviews3001.1 - reviews3001.15.
146. Huang, H.-C., *The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways*. Genome Biology, 2004. **5**(7): p. 234.
147. Yang, Y. and M. Mlodzik, *Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt)*. Annual review of cell and developmental biology, 2015. **31**: p. 623-646.
148. Takeo, S., et al., *The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos*. Nature, 2002. **417**(6886): p. 295-299.
149. Kühl, M., et al., *The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends in Genetics, 2000. **16**(7): p. 279-283.
150. Cadigan, K.M. and Y.I. Liu, *Wnt signaling: complexity at the surface*. Journal of Cell Science, 2006. **119**(3): p. 395-402.
151. Song, X., S. Wang, and L. Li, *New insights into the regulation of Axin function in canonical Wnt signaling pathway*. Protein Cell, 2014. **5**(3): p. 186-93.
152. Neufeld, K.L., et al., *APC-mediated downregulation of β -catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export*. EMBO Reports, 2000. **1**(6): p. 519-523.
153. Neufeld, K.L., *Nuclear APC*. Advances in experimental medicine and biology, 2009. **656**: p. 13-29.
154. Gordon, M.D. and R. Nusse, *Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(32): p. 22429-22433.
155. Zeng, L., et al., *The Mouse Fused Locus Encodes Axin, an Inhibitor of the Wnt Signaling Pathway That Regulates Embryonic Axis Formation*. Cell, 1997. **90**(1): p. 181-192.
156. Heuberger, J. and W. Birchmeier, *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Vol. 2. 2010. a002915.
157. Crampton, S.P., et al., *Integration of the β -Catenin-Dependent Wnt Pathway with Integrin Signaling through the Adaptor Molecule Grb2*. PLoS ONE, 2009. **4**(11): p. e7841.
158. Axelrod, J.D., *Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling*. Genes & Development, 2001. **15**(10): p. 1182-1187.
159. Axelrod, J.D. and H. McNeill, *Coupling Planar Cell Polarity Signaling to Morphogenesis*. TheScientificWorldJOURNAL, 2002. **2**: p. 434-454.
160. Roel, N., *Cell biology: Relays at the membrane*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 747-749.
161. Ciani, L. and P.C. Salinas, *WNTS in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity*. Nature Reviews Neuroscience, 2005. **6**(5): p. 351-362.
162. Kühl, M., *The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2004. **9**: p. 967-974.
163. Sheldahl, L.C., et al., *Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner*. Current Biology, 1999. **9**(13): p. 695-S1.

164. van Amerongen, R., A. Mikels, and R. Nusse, *Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors*. *Sci. Signal.*, 2008. **1**(35): p. re9-.
165. Oishi, I., et al., *The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway*. *Genes to Cells*, 2003. **8**(7): p. 645-654.
166. Berndt, J.D., et al., *Mindbomb 1, an E3 ubiquitin ligase, forms a complex with RYK to activate Wnt/ β -catenin signaling*. *The Journal of Cell Biology*, 2011. **194**(5): p. 737-750.
167. Andre, P., et al., *The Wnt Coreceptor Ryk Regulates Wnt/Planar Cell Polarity by Modulating the Degradation of the Core Planar Cell Polarity Component Vangl2*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(53): p. 44518-44525.
168. Macheda, M.L., et al., *The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(35): p. 29312-23.
169. Green, J., R. Nusse, and R. van Amerongen, *The Role of Ryk and Ror Receptor Tyrosine Kinases in Wnt Signal Transduction*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014. **6**(2): p. a009175.
170. Ho, H.-Y.H., et al., *Wnt5a–Ror–Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(11): p. 4044-4051.
171. Lu, W., et al., *Mammalian Ryk Is a Wnt Coreceptor Required for Stimulation of Neurite Outgrowth*. *Cell*, 2004. **119**(1): p. 97-108.
172. Bingyu, M., et al., *LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins*. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 321-325.
173. Rattner, A., et al., *A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(7): p. 2859-2863.
174. Malinauskas, T. and E.Y. Jones, *Extracellular modulators of Wnt signalling*. *Curr Opin Struct Biol*, 2014. **29**: p. 77-84.
175. Malinauskas, T., et al., *Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **18**(8): p. 886-93.
176. Jen-Chih, H., et al., *A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities*. *Nature*, 1999. **398**(6726): p. 431-436.
177. Packard, M., et al., *The Drosophila Wnt, Wingless, Provides an Essential Signal for Pre- and Postsynaptic Differentiation*. *Cell*, 2002. **111**(3): p. 319-330.
178. Mathew, D., et al., *Wingless Signaling at Synapses Is Through Cleavage and Nuclear Import of Receptor DFrizzled2*. *Science*, 2005. **310**(5752): p. 1344-1347.
179. Kamimura, K., et al., *Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the Drosophila neuromuscular junction*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(2): p. 219-33.
180. Kerr, K.S., et al., *Glial Wingless/Wnt Regulates Glutamate Receptor Clustering and Synaptic Physiology at the Drosophila Neuromuscular Junction*. *The Journal of Neuroscience*, 2014. **34**(8): p. 2910-2920.
181. Klassen, M.P. and K. Shen, *Wnt signaling positions neuromuscular connectivity by inhibiting synapse formation in C. elegans*. *Cell*, 2007. **130**(4): p. 704-716.
182. Luo, Z.G., et al., *Regulation of AChR Clustering by Dishevelled Interacting with MuSK and PAK1*. *Neuron*, 2002. **35**(3): p. 489-505.
183. Junmei, W., et al., *Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC*. *Nature neuroscience*, 2003. **6**(10): p. 1017.
184. Zhang, B., et al., *β -Catenin Regulates Acetylcholine Receptor Clustering in Muscle Cells through Interaction with Rapsyn*. *The Journal of Neuroscience*, 2007. **27**(15): p. 3968-3973.
185. Henriquez, J.P., et al., *Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(48): p. 18812-18817.
186. Wang, J., et al., *Wnt/ β -Catenin Signaling Suppresses Rapsyn Expression and Inhibits Acetylcholine Receptor Clustering at the Neuromuscular Junction*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(31): p. 21668-21675.

187. Sharma, S.K. and B.G. Wallace, *Lithium inhibits a late step in agrin-induced AChR aggregation*. Journal of Neurobiology, 2003. **54**(2): p. 346-357.
188. Xiao-Ming, L., et al., *Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle β -catenin*. Nature neuroscience, 2008. **11**(3): p. 262-268.
189. Takamori, M., T. Nakamura, and M. Motomura, *Antibodies against Wnt receptor of muscle-specific tyrosine kinase in myasthenia gravis*. Journal of Neuroimmunology, 2013. **254**(1): p. 183-186.
190. Messeant, J., et al., *MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance*. J Neurosci, 2015. **35**(12): p. 4926-41.
191. Remédo, L., et al., *Diverging roles for Lrp4 and Wnt signaling in neuromuscular synapse development during evolution*. Genes & Development, 2016. **30**(9): p. 1058-1069.
192. Zhang, B., et al., *Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells*. Molecular Brain, 2012. **5**(1): p. 7.
193. Messeant, J., et al., *Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways*. Development, 2017. **144**(9): p. 1712-1724.
194. Krylova, O., et al., *WNT-3, Expressed by Motoneurons, Regulates Terminal Arborization of Neurotrophin-3-Responsive Spinal Sensory Neurons*. Neuron, 2002. **35**(6): p. 1043-1056.
195. Hall, A., *Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-514.
196. David, I.S., W. Ursula, and M. Marek, *The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 292-295.
197. Roelink, H. and R. Nusse, *Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube*. Genes & Development, 1991. **5**(3): p. 381-388.
198. Magnusson, C., et al., *Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle*. European Journal of Neuroscience, 2005. **21**(2): p. 577-580.
199. Avilés, E., et al., *Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells*. Frontiers in Cellular Neuroscience (Impress), 2014.
200. Teneb, J., *Function of the Wnt receptor Frizzled-9 in the maturation of postsynaptic apparatus at the vertebrate neuromuscular junction* Undergrade thesis at the University of Concepcion, 2012.
201. Lade, A., et al., *Calpain Induces N-terminal Truncation of β -Catenin in Normal Murine Liver Development: DIAGNOSTIC IMPLICATIONS IN HEPATOBLASTOMAS*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(27): p. 22789-22798.
202. Ma, S., et al., *Site-specific Phosphorylation Protects Glycogen Synthase Kinase-3 β from Calpain-mediated Truncation of Its N and C Termini*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(27): p. 22521-22532.
203. Fang, W.-Q., et al., *Cdk5-Mediated Phosphorylation of Axin Directs Axon Formation during Cerebral Cortex Development*. The Journal of Neuroscience, 2011. **31**(38): p. 13613-13624.
204. McMahon, J., et al., *Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase-increased expression with reduced muscle damage*. Gene Therapy, 2001. **8**(16): p. 1264.
205. Harrison, R.L., B.J. Byrne, and L. Tung, *Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue*. FEBS Letters, 1998. **435**(1): p. 1-5.
206. Maruyama, H., et al., *Skin-targeted gene transfer using in vivo electroporation*. Gene Therapy, 2001. **8**(23): p. 1808.
207. Inoue, T. and R. Krumlauf, *An impulse to the brain—using in vivo electroporation*. Nature neuroscience, 2001. **4**: p. 1156-1158.
208. Lin, C.-R., et al., *Electroporation for direct spinal gene transfer in rats*. Neuroscience Letters, 2002. **317**(1): p. 1-4.
209. Jayankura, M., et al., *In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer*. The Journal of Gene Medicine, 2003. **5**(7): p. 618-624.
210. Bloquel, C., et al., *Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications*. The journal of gene medicine, 2004. **6**(S1).

211. Molnar, M.J., et al., *Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles*. Mol Ther, 2004. **10**(3): p. 447-55.
212. Vicat, J., et al., *Brief report: muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression*. Human gene therapy, 2000. **11**(6): p. 909-916.
213. Miyazaki, S. and J. Miyazaki, *In vivo DNA electrotransfer into muscle*. Dev Growth Differ, 2008. **50**(6): p. 479-83.
214. Murray, L.M., T.H. Gillingwater, and S.H. Parson, *Using mouse cranial muscles to investigate neuromuscular pathology in vivo*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(11): p. 740-3.
215. Teriakidis, A., D.J. Willshaw, and R.R. Ribchester, *Prevalence and elimination of sibling neurite convergence in motor units supplying neonatal and adult mouse skeletal muscle*. J Comp Neurol, 2012. **520**(14): p. 3203-16.
216. Velasco, E., et al., *Análisis ultraestructural del músculo levator auris longus de ratón intoxicado in vivo por la neurotoxina botulínica tipo A*. Investigación Clínica, 2008. **49**(4).
217. Wright, M., A. Kim, and Y.-J. Son, *Subcutaneous Administration of Muscarinic Antagonists and Triple-Immunostaining of the Levator Auris Longus Muscle in Mice*. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 2011(55): p. 3124.
218. Garcia, N., et al., *Exogenous ciliary neurotrophic factor (CNTF) reduces synaptic depression during repetitive stimulation*. Journal of the Peripheral Nervous System, 2012. **17**(3): p. 312-323.
219. Garcia, N., et al., *Adenosine A(1) and A(2)A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction*. Eur J Neurosci, 2013. **38**(2): p. 2229-41.
220. Ruiz, R., et al., *Altered intracellular Ca²⁺ homeostasis in nerve terminals of severe spinal muscular atrophy mice*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(3): p. 849-857.
221. Tejero, R., et al., *Synaptotagmin-2, and-1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy*. Human molecular genetics, 2016. **25**(21): p. 4703-4716.
222. Thomson, S.R., et al., *Morphological characteristics of motor neurons do not determine their relative susceptibility to degeneration in a mouse model of severe spinal muscular atrophy*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52605.
223. Tintignac, L.A., H.R. Brenner, and M.A. Ruegg, *Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting*. Physiol Rev, 2015. **95**(3): p. 809-52.
224. Fu, A.K., et al., *Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15224-9.
225. Zhao, C., et al., *Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval*. Development, 2005. **132**(12): p. 2917-27.
226. DiFranco, M., et al., *DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation*. J Vis Exp, 2009(32).
227. DiFranco, M., et al., *Inward rectifier potassium currents in mammalian skeletal muscle fibres*. J Physiol, 2015. **593**(5): p. 1213-38.
228. DiFranco, M., et al., *Functional expression of transgenic IsDHPR channels in adult mammalian skeletal muscle fibres*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 6): p. 1421-42.
229. DiFranco, M., M. Quinonez, and J.L. Vergara, *The delayed rectifier potassium conductance in the sarcolemma and the transverse tubular system membranes of mammalian skeletal muscle fibers*. The Journal of general physiology, 2012. **140**(2): p. 109-137.
230. DiFranco, M., et al., *DNA Transfection of Mammalian Skeletal Muscles using In Vivo Electroporation*. 2009(32): p. e1520.
231. Olmstead, D.N., et al., *Facial nerve axotomy in mice: a model to study motoneuron response to injury*. J Vis Exp, 2015(96): p. e52382.
232. Perez-Garcia, M.J. and S.J. Burden, *Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice*. Cell Rep, 2012. **2**(3): p. 497-502.
233. Messéant, J., et al., *MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance*. The Journal of Neuroscience, 2015. **35**(12): p. 4926-4941.

234. Bolte, S. and F. Cordelieres, *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy*. Journal of microscopy, 2006. **224**(3): p. 213-232.
235. Boyd, I. and A. Martin, *The end-plate potential in mammalian muscle*. The Journal of physiology, 1956. **132**(1): p. 74-91.
236. Nitkin, R.M., et al., *Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ*. The Journal of cell biology, 1987. **105**(6): p. 2471-2478.
237. Del Castillo, J. and B. Katz, *The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings*. The Journal of physiology, 1954. **124**(3): p. 553-559.
238. Fu, A.K., et al., *Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(42): p. 15224-15230.
239. Sahlgren, C.M., et al., *Cdk5 Regulates the Organization of Nestin and Its Association with p35*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(14): p. 5090-5106.
240. Sahlgren, C.M., et al., *Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(14): p. 5090-5106.
241. Mohseni, P., et al., *Nestin is not essential for development of the CNS but required for dispersion of acetylcholine receptor clusters at the area of neuromuscular junctions*. Journal of Neuroscience, 2011. **31**(32): p. 11547-11552.
242. Yang, Y., et al., *Accumulation of beta-catenin by lithium chloride in porcine myoblast cultures accelerates cell differentiation*. Mol Biol Rep, 2011. **38**(3): p. 2043-9.
243. Sjöberg, G., et al., *Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy*. Experimental cell research, 1994. **214**(2): p. 447-458.
244. Vaittinen, S., et al., *Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle*. The American journal of pathology, 1999. **154**(2): p. 591-600.
245. Kang, H., et al., *Regulation of the intermediate filament protein nestin at rodent neuromuscular junctions by innervation and activity*. J Neurosci, 2007. **27**(22): p. 5948-57.
246. Ohshima, T., et al., *Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(20): p. 11173-11178.
247. Sarker, K.P. and K.Y. Lee, *L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway*. Oncogene, 2004. **23**(36): p. 6064-70.
248. Lazaro, J.-B., et al., *Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells*. Journal of Cell Science, 1997. **110**(10): p. 1251-1260.
249. Philpott, A., et al., *The role of cyclin-dependent kinase 5 and a novel regulatory subunit in regulating muscle differentiation and patterning*. Genes & Development, 1997. **11**(11): p. 1409-1421.
250. Pallari, H.M., et al., *Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(9): p. 1539-49.
251. Fu, A.K., et al., *Cdk5 is involved in neuregulin-induced AChR expression at the neuromuscular junction*. Nature Neuroscience, 2001. **4**(4): p. 374-381.
252. Henriquez, J.P., et al., *Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(48): p. 18812-7.
253. Wang, J., et al., *Wnt/beta-catenin signaling suppresses Rapsyn expression and inhibits acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction*. J Biol Chem, 2008. **283**(31): p. 21668-75.
254. Kurimoto, S., et al., *Activation of the Wnt/beta-catenin signaling cascade after traumatic nerve injury*. Neuroscience, 2015. **294**: p. 101-8.
255. Magnusson, C., et al., *Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle*. European Journal of Neuroscience, 2005. **21**(2): p. 577-580.

256. de Oliveira, G.P., et al., *Early Gene Expression Changes in Skeletal Muscle from SOD1G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis Animal Model*. Cellular and molecular neurobiology, 2014. **34**(3): p. 451-462.
257. Murray, L.M., et al., *Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre-and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy*. Human molecular genetics, 2007. **17**(7): p. 949-962.
258. Ryan, M.D., A.M. King, and G.P. Thomas, *Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence*. Journal of General Virology, 1991. **72**(11): p. 2727-2732.
259. Wang, J., et al., *Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1017-8.
260. Aihara, H. and J.-i. Miyazaki, *Gene transfer into muscle by electroporation in vivo*. Nature biotechnology, 1998. **16**(9): p. 867-870.
261. Bettan, M., et al., *Efficient DNA electrotransfer into tumors*. Bioelectrochemistry, 2000. **52**(1): p. 83-90.
262. Draghia-Akli, R., et al., *High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs*. The FASEB Journal, 2003. **17**(3): p. 526-528.
263. Lesbordes, J.-C., et al., *In vivo electrotransfer of the cardiotrophin-1 gene into skeletal muscle slows down progression of motor neuron degeneration in pmn mice*. Human Molecular Genetics, 2002. **11**(14): p. 1615-1625.
264. Li, S. and M. Benninger, *Applications of muscle electroporation gene therapy*. Current gene therapy, 2002. **2**(1): p. 101-105.
265. Vilquin, J., et al., *Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies*. Gene Therapy, 2001. **8**(14): p. 1097.
266. Gollins, H., et al., *High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle*. Gene Therapy, 2003. **10**(6): p. 504-512.
267. Molnar, M.J., et al., *Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles*. Molecular Therapy, 2004. **10**(3): p. 447-455.
268. Wolff, J.A., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-1468.
269. Acsadi, G. and G. Dickson, *Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 815.
270. Mir, L.M., et al., *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(8): p. 4262-4267.
271. Davis, H.L., R.G. Whalen, and B.A. Demeneix, *Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression*. Human Gene Therapy, 1993. **4**(2): p. 151-159.
272. Mennuni, C., et al., *Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle*. Human Gene Therapy, 2002. **13**(3): p. 355-365.
273. Losen, M., et al., *Increased expression of rapsyn in muscles prevents acetylcholine receptor loss in experimental autoimmune myasthenia gravis*. Brain, 2005. **128**(10): p. 2327-2337.
274. Martínez-Martínez, P., et al., *Overexpression of rapsyn in rat muscle increases acetylcholine receptor levels in chronic experimental autoimmune myasthenia gravis*. The American Journal of Pathology, 2007. **170**(2): p. 644-657.
275. Martínez-Martínez, P., et al., *Silencing rapsyn in vivo decreases acetylcholine receptors and augments sodium channels and secondary postsynaptic membrane folding*. Neurobiology of Disease, 2009. **35**(1): p. 14-23.
276. McMahan, J., et al., *Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle*. Gene therapy, 1998. **5**(9).

277. Wells, D.J., et al., *Evaluation of plasmid DNA for in vivo gene therapy: factors affecting the number of transfected fibers*. Journal of pharmaceutical sciences, 1998. **87**(6): p. 763-768.
278. Mathiesen, I., et al., *Regulation of the size and distribution of agrin-induced postsynaptic-like apparatus in adult skeletal muscle by electrical muscle activity*. Molecular and Cellular Neuroscience, 1999. **13**(3): p. 207-217.
279. Gehl, J., et al., *In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1999. **1428**(2): p. 233-240.
280. Bureau, M., et al., *Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2000. **1474**(3): p. 353-359.
281. Bertrand, A., et al., *Muscle electrotransfer as a tool for studying muscle fiber-specific and nerve-dependent activity of promoters*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2003. **285**(5): p. C1071-C1081.
282. Chen, P.J., et al., *AChRs Are Essential for the Targeting of Rapsyn to the Postsynaptic Membrane of NMJs in Living Mice*. Journal of Neuroscience, 2016. **36**(21): p. 5680-5685.
283. Bruneau, E.G. and M. Akaaboune, *Dynamics of the Rapsyn Scaffolding Protein at the Neuromuscular Junction of Live Mice*. Journal of Neuroscience, 2010. **30**(2): p. 614-619.
284. Yang, J., et al., *Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse*. Nat Neurosci, 2011. **14**(3): p. 324-30.
285. Sejersen, T. and U. Lendahl, *Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development*. Journal of Cell Science, 1993. **106**(4): p. 1291-1300.
286. Kang, H., et al., *Regulation of the Intermediate Filament Protein Nestin at Rodent Neuromuscular Junctions by Innervation and Activity*. Journal of Neuroscience, 2007. **27**(22): p. 5948-5957.
287. Sahlgren, C.M., et al., *A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death*. The EMBO Journal, 2006. **25**(20): p. 4808-4819.
288. Kim, S. and P.A. Coulombe, *Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm*. Genes & Development, 2007. **21**(13): p. 1581-1597.
289. Pallari, H.-M. and J.E. Eriksson, *Intermediate filaments as signaling platforms*. Science Signaling, 2006. **2006**(366): p. pe53-pe53.
290. Yang, J., et al., *Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse*. Nature Neuroscience, 2011. **14**(3): p. 324-330.
291. Patrick, G.N., et al., *Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 615-622.
292. Takasugi, T., et al., *Two Degradation Pathways of the p35 Cdk5 (Cyclin-dependent Kinase) Activation Subunit, Dependent and Independent of Ubiquitination*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(9): p. 4649-4657.
293. Lovestone, S. and C. Reynolds, *The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes*. Neuroscience, 1997. **78**(2): p. 309-324.
294. Pant, A.C., H.C. Pant, and N. Amin, *Phosphorylation of human high molecular weight neurofilament protein (hNF-H) by neuronal cyclin-dependent kinase 5 (cdk5)*. Brain Research, 1997. **765**(2): p. 259-266.
295. Rashid, T., M. Banerjee, and M. Nikolic, *Phosphorylation of Pak1 by the p35/Cdk5 Kinase Affects Neuronal Morphology*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(52): p. 49043-49052.
296. Nikolic, M., et al., *The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity*. Nature, 1998. **395**(6698): p. 194-198.
297. Kwon, Y.T., et al., *Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase*. Current Biology, 2000. **10**(7): p. 363-372.
298. Kesavapany, S., et al., *p35/cdk5 binds and phosphorylates β -catenin and regulates β -catenin/presenilin-1 interaction*. European Journal of Neuroscience, 2001. **13**(2): p. 241-247.
299. Namba, T. and D. Grob, *Cholinesterase activity of the motor endplate in isolated muscle membrane*. Journal of Neurochemistry, 1968. **15**(12): p. 1445-1454.

300. Kupfer, C. and G.B. Koelle, *A histochemical study of cholinesterase during formation of the motor end plate of the albino rat*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 1951. **116**(3): p. 397-413.
301. Chang, C., et al., *Acetylcholine hydrolysis during neuromuscular transmission in the synaptic cleft of skeletal muscle of mouse and chick*. Neuropharmacology, 1985. **24**(6): p. 533-539.
302. Bezakova, G., et al., *Neural agrin controls acetylcholine receptor stability in skeletal muscle fibers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(17): p. 9924-9929.
303. Bezakova, G. and M.A. Ruegg, *New insights into the roles of agrin*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003. **4**(4): p. 295-309.
304. Song, W. and X.A. Jin, *Cyclic AMP inhibits neuromuscular junction maturation mediated by intracellular Ca²⁺*. Neuroscience Letters, 2015. **589**: p. 104-109.
305. Liu, F., et al., *PKA modulates GSK-3 β -and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners*. FEBS Letters, 2006. **580**(26): p. 6269-6274.
306. Hanson, M.G. and L.A. Niswander, *An explant muscle model to examine the refinement of the synaptic landscape*. Journal of Neuroscience Methods, 2014. **238**: p. 95-104.
307. Moransard, M., et al., *Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(9): p. 7350-7359.
308. Weston, C., et al., *Agrin-Induced Acetylcholine Receptor Clustering Is Mediated by the Small Guanosine Triphosphatases Rac and Cdc42*. The Journal of Cell Biology, 2000. **150**(1): p. 205-212.
309. Street, S.F., *Lateral transmission of tension in frog myofibers: a myofibrillar network and transverse cytoskeletal connections are possible transmitters*. Journal of Cellular Physiology, 1983. **114**(3): p. 346-364.
310. Monti, R.J., et al., *Transmission of forces within mammalian skeletal muscles*. Journal of biomechanics, 1999. **32**(4): p. 371-380.
311. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin*. The Journal of Cell Biology, 1993. **122**(4): p. 809-823.
312. Craig, S.W. and J.V. Pardo, *Gamma actin, spectrin, and intermediate filament proteins colocalize with vinculin at costameres, myofibril-to-sarcolemma attachment sites*. Cytoskeleton, 1983. **3**(5): p. 449-462.
313. Bezakova, G. and T. Lomo, *Muscle activity and muscle agrin regulate the organization of cytoskeletal proteins and attached acetylcholine receptor (AChR) aggregates in skeletal muscle fibers*. The Journal of Cell Biology, 2001. **153**(7): p. 1453-1464.
314. van Amerongen, R., A. Mikels, and R. Nusse, *Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors*. Science Signaling, 2008. **1**(35): p. re9-re9.
315. Packard, M., et al., *The Drosophila Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation*. Cell, 2002. **111**(3): p. 319-330.
316. Jing, L., et al., *Wnt signals organize synaptic prepatter and axon guidance through the zebrafish unplugged/MuSK receptor*. Neuron, 2009. **61**(5): p. 721-733.
317. Dann, C.E., et al., *Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 86-90.
318. Masiakowski, P. and G.D. Yancopoulos, *The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases*. Current Biology, 1998. **8**(12): p. R407.
319. Xu, Y.K. and R. Nusse, *The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases*. Current Biology, 1998. **8**(12): p. R405-R406.
320. Li, L., et al., *Dishevelled Proteins Lead to Two Signaling Pathways: REGULATION OF LEF-1 AND c-Jun N-TERMINAL KINASE IN MAMMALIAN CELLS*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(1): p. 129-134.
321. Weston, C., et al., *Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6450-5.

322. Mitsui, T., et al., *Functional association between nicotinic acetylcholine receptor and sarcomeric proteins via actin and desmin filaments*. Journal of cellular biochemistry, 2000. **77**(4): p. 584-595.
323. Luo, S., et al., *HSP90 beta regulates rapsyn turnover and subsequent AChR cluster formation and maintenance*. Neuron, 2008. **60**(1): p. 97-110.
324. Sadasivam, G., et al., *Src-family kinases stabilize the neuromuscular synapse in vivo via protein interactions, phosphorylation, and cytoskeletal linkage of acetylcholine receptors*. J Neurosci, 2005. **25**(45): p. 10479-93.
325. Linnoila, J., et al., *A mammalian homolog of Drosophila tumorous imaginal discs, Tid1, mediates agrin signaling at the neuromuscular junction*. Neuron, 2008. **60**(4): p. 625-41.
326. Shamah, S.M., et al., *EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin*. Cell, 2001. **105**(2): p. 233-244.
327. Fu, A.K.Y. and N.Y. Ip, *Cyclin-Dependent Kinase 5 Links Extracellular Cues to Actin Cytoskeleton During Dendritic Spine Development*. Cell Adhesion & Migration, 2007. **1**(2): p. 110-112.
328. Wokke, J., et al., *Morphological changes in the human end plate with age*. Journal of the neurological sciences, 1990. **95**(3): p. 291-310.
329. Arizono, N., et al., *Morphometric analysis of human neuromuscular junction in different ages*. Pathology International, 1984. **34**(6): p. 1243-1249.
330. Willadt, S., M. Nash, and C.R. Slater, *Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24849.
331. Delbono, O., K. O'rourke, and W. Ettinger, *Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers*. The Journal of membrane biology, 1995. **148**(3): p. 211-222.
332. Delbono, O., M. Renganathan, and M.L. Messi, *Excitation-Ca²⁺ release-contraction coupling in single aged human skeletal muscle fiber*. Muscle & nerve, 1997. **20**(S5): p. 88-92.
333. Schneider, M. and W. Chandler, *Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling*. Nature, 1973. **242**(5395): p. 244-246.
334. Wang, X., et al., *Decreased synaptic activity shifts the calcium dependence of release at the mammalian neuromuscular junction in vivo*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(47): p. 10687-10692.
335. Chen, F., et al., *Neuromuscular synaptic patterning requires the function of skeletal muscle dihydropyridine receptors*. Nat Neurosci, 2011. **14**(5): p. 570-7.
336. Nelson, B.R., et al., *Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca²⁺ release and contractility*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(29): p. 11881-11886.
337. Pfaff, S.L., et al., *Requirement for LIM Homeobox Gene Isl1 in Motor Neuron Generation Reveals a Motor Neuron-Dependent Step in Interneuron Differentiation*. Cell, 1996. **84**(2): p. 309-320.
338. Hanson, M.G. and L.A. Niswander, *Rectification of muscle and nerve deficits in paralyzed ryanodine receptor type 1 mutant embryos*. Developmental biology, 2015. **404**(2): p. 76-87.
339. Burden, S.J., *The formation of neuromuscular synapses*. Genes & Development, 1998. **12**(2): p. 133-148.
340. Hall, Z.W. and J.R. Sanes, *Synaptic structure and development: The neuromuscular junction*. Cell, 1993. **72**: p. 99-121.
341. Kim, N., et al., *Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK*. Cell, 2008. **135**(2): p. 334-42.
342. McMahan, U. *The agrin hypothesis*. in Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 1990. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
343. Zhang, B., et al., *LRP4 serves as a coreceptor of agrin*. Neuron, 2008. **60**(2): p. 285-97.
344. Yumoto, N., N. Kim, and S.J. Burden, *Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses*. Nature, 2012. **489**(7416): p. 438-442.
345. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-1134.

346. Zhou, H., et al., *Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations*. The Journal of cell biology, 1999. **146**(5): p. 1133-1146.
347. Stiegler, A.L., S.J. Burden, and S.R. Hubbard, *Crystal structure of the agrin-responsive immunoglobulin-like domains 1 and 2 of the receptor tyrosine kinase MuSK*. Journal of molecular biology, 2006. **364**(3): p. 424-433.
348. Wang, Q., et al., *The Ig1/2 domain of MuSK binds to muscle surface and is involved in acetylcholine receptor clustering*. Neurosignals, 2008. **16**(2-3): p. 246-53.
349. Green, J., R. Nusse, and R. van Amerongen, *The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. **6**(2).
350. Banerjee, S., et al., *A novel role for MuSK and non-canonical Wnt signaling during segmental neural crest cell migration*. Development, 2011. **138**(15): p. 3287-96.
351. Strohlic, L., et al., *Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29976.
352. Zhang, B., et al., *Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells*. Mol Brain, 2012. **5**: p. 7.
353. Willert, K. and R. Nusse, *Wnt proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a007864.
354. MacDonald, B.T. and X. He, *Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/beta-catenin signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
355. Zong, Y., et al., *Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling*. Genes Dev, 2012. **26**(3): p. 247-58.
356. May, P., et al., *The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions*. Ann Med, 2007. **39**(3): p. 219-28.
357. Gomez, A.M. and S.J. Burden, *The extracellular region of Lrp4 is sufficient to mediate neuromuscular synapse formation*. Dev Dyn, 2011. **240**(12): p. 2626-33.
358. Kim, K.A., et al., *R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2588-96.
359. de Lau, W., et al., *Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling*. Nature, 2011. **476**(7360): p. 293-297.
360. Nakashima, H., et al., *R-spondin 2 promotes acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction via Lgr5*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28512.
361. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Development of the vertebrate neuromuscular junction*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 389-442.
362. Luo, Z.G., et al., *Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1*. Neuron, 2002. **35**(3): p. 489-505.
363. Wang, J., et al., *Regulation of acetylcholine receptor clustering by the tumor suppressor APC*. Nature Neuroscience, 2003. **6**(10): p. 1017-1018.
364. Zhang, B., et al., *Beta-catenin regulates acetylcholine receptor clustering in muscle cells through interaction with rapsyn*. J Neurosci, 2007. **27**(15): p. 3968-73.
365. Li, X.M., et al., *Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle beta-catenin*. Nat Neurosci, 2008. **11**(3): p. 262-8.
366. Wu, H., et al., *Beta-Catenin gain of function in muscles impairs neuromuscular junction formation*. Development, 2012. **139**(13): p. 2392-2404.
367. Gonzalez, M., et al., *Disruption of TrkB-mediated signaling induces disassembly of postsynaptic receptor clusters at neuromuscular junctions*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 567-583.
368. Hurtado, E., et al., *Muscle Contraction Regulates BDNF/TrkB Signaling to Modulate Synaptic Function through Presynaptic cPKCa and cPKCβI*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2017. **10**.
369. Jevsek, M., et al., *CD24 is expressed by myofiber synaptic nuclei and regulates synaptic transmission*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(16): p. 6374-6379.
370. Ahmad-Annuar, A., et al., *Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release*. The Journal of Cell Biology, 2006. **174**(1): p. 127-139.

371. Hall, A.C., F.R. Lucas, and P.C. Salinas, *Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling*. Cell, 2000. **100**(5): p. 525-535.
372. Lucas, F.R. and P.C. Salinas, *WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons*. Developmental Biology, 1997. **192**(1): p. 31-44.
373. Budnik, V. and P.C. Salinas, *Wnt signaling during synaptic development and plasticity*. Current Opinion in Neurobiology, 2011. **21**(1): p. 151-159.
374. Cerpa, W., et al., *Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(9): p. 5918-5927.
375. Varela-Nallar, L., et al., *Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(49): p. 21164-21169.
376. Ciani, L., et al., *Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(26): p. 10732-10737.
377. Fariás, G.G., et al., *Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(23): p. 15857-15866.
378. Ramirez, V.T., et al., *Wnt-5a/Frizzled9 receptor signaling through the Gao-Gβγ complex regulates dendritic spine formation*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(36): p. 19092-19107.
379. González-Fernández, C., et al., *Wnts are expressed in the spinal cord of adult mice and are differentially induced after injury*. Journal of neurotrauma, 2014. **31**(6): p. 565-581.
380. Gonzalez-Fernandez, C., et al., *Wnts Are Expressed in the Ependymal Region of the Adult Spinal Cord*. Molecular Neurobiology, 2016: p. 1-14.
381. Shah, S.M., et al., *Expression of Wnt receptors in adult spiral ganglion neurons: frizzled 9 localization at growth cones of regenerating neurites*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 478-487.
382. Zhao, C., et al., *Hippocampal and visuospatial learning defects in mice with a deletion of frizzled 9, a gene in the Williams syndrome deletion interval*. Development, 2005. **132**(12): p. 2917-2927.
383. Zhang, B., et al., *-Catenin Regulates Acetylcholine Receptor Clustering in Muscle Cells through Interaction with Rapsyn*. Journal of Neuroscience, 2007. **27**(15): p. 3968-3973.
384. Avilés, E.C., et al., *Frizzled-9 impairs acetylcholine receptor clustering in skeletal muscle cells*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014. **8**.
385. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes & Development, 1997. **11**(24): p. 3286-3305.
386. Klingensmith, J. and R. Nusse, *Signaling by wingless in Drosophila*. Developmental Biology, 1994. **166**(2): p. 396-414.
387. Noordermeer, J., et al., *dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in Drosophila*. Nature, 1994. **367**(6458): p. 80.
388. Theisen, H., et al., *Dishevelled is required during wingless signaling to establish both cell polarity and cell identity*. Development, 1994. **120**(2): p. 347-360.
389. Reilein, A. and W.J. Nelson, *APC is a component of an organizing template for cortical microtubule networks*. Nature Cell Biology, 2005. **7**(5): p. 463-473.
390. Moseley, J.B., et al., *Regulated binding of adenomatous polyposis coli protein to actin*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(17): p. 12661-12668.
391. Temburni, M.K., et al., *Neuronal nicotinic synapse assembly requires the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(30): p. 6776-6784.
392. Rosenberg, M.M., et al., *Adenomatous polyposis coli plays a key role, in vivo, in coordinating assembly of the neuronal nicotinic postsynaptic complex*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2008. **38**(2): p. 138-152.
393. Fariás, G., et al., *Wnt-7a induces presynaptic colocalization of alpha 7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons*. J Neurosci, 2007. **27**: p. 5313-5325.
394. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(16): p. 8455-8459.

395. Stambolic, V., L. Ruel, and J.R. Woodgett, *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells*. *Current Biology*, 1996. **6**(12): p. 1664-1669.
396. Sharma, S. and B. Wallace, *Lithium inhibits a late step in agrin-induced AChR aggregation*. *Developmental Neurobiology*, 2003. **54**(2): p. 346-357.
397. Liu, Y., et al., *β -Catenin stabilization in skeletal muscles, but not in motor neurons, leads to aberrant motor innervation of the muscle during neuromuscular development in mice*. *Developmental Biology*, 2012. **366**(2): p. 255-267.
398. Yampolsky, P., P.G. Pacifici, and V. Witzemann, *Differential muscle-driven synaptic remodeling in the neuromuscular junction after denervation*. *European Journal of Neuroscience*, 2010. **31**(4): p. 646-658.
399. Kurimoto, S., et al., *Activation of the Wnt/ β -catenin signaling cascade after traumatic nerve injury*. *Neuroscience*, 2015. **294**: p. 101-108.
400. Wang, H., et al., *Key changes in denervated muscles and their impact on regeneration and reinnervation*. *Neural Regeneration Research*, 2014. **9**(20): p. 1796.

