



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN WNT EN LA MODULACIÓN DE  
LA PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO DE LA RATA  
*INVIVO.*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

LIC. EN PSIC. ABRIL ESTEFANIA ORTIZ MATAMOROS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. ÓSCAR PROSPÉRO GARCÍA  
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

NOVIEMBRE, 2018.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



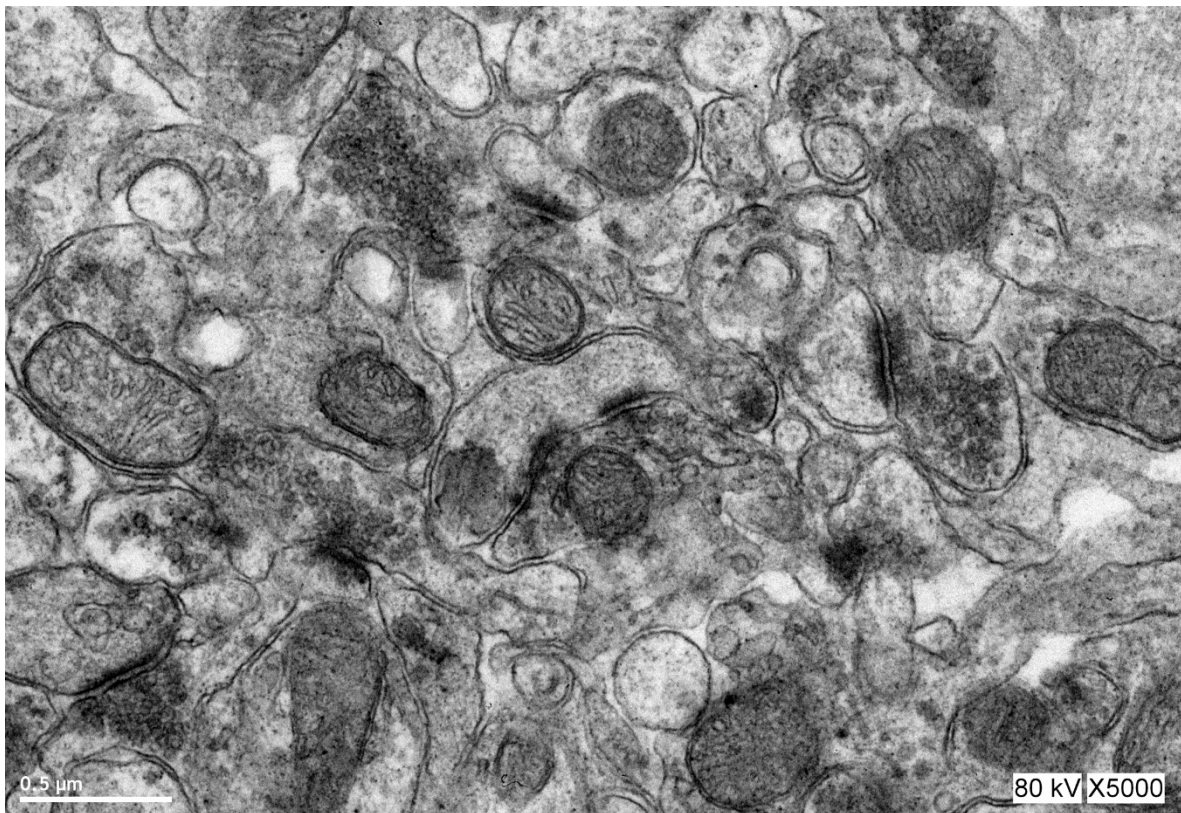
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este proyecto se realizó en el laboratorio C-210, a cargo de la Dra. Clorinda Arias Álvarez, en el departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por el Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM).



Fotografía de sinapsis en el hipocampo de ratas Wistar, vistas a través de un microscopio electrónico de transmisión. Ortiz-Matamoros y Arias, C.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por mis estudios profesionales y de posgrado.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de posgrado (269645).

Este trabajo fue financiado por DGAPA, PAPIIT IN202615. México.

A la Dra. Clorinda Arias Álvarez, mi tutora, por permitirme realizar las tesis de licenciatura y doctorado en su laboratorio. Así mismo, le agradezco todos los conocimientos y enseñanzas que me transmitió durante la dirección de los proyectos.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Angélica Zepeda Rivera y el Dr. Óscar Próspero García por sus comentarios para la mejora de mi proyecto.

La asistencia técnica y el apoyo de la Q.F.B. Patricia Ferrera.

A la Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda por su asistencia técnica.

A la técnico académico Teresa Montiel del Instituto de Fisiología Celular (IFC), UNAM, por su apoyo.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su asistencia técnica en la microscopia confocal.

Al Médico Cirujano Rodolfo Paredes del IFC, UNAM, por su asistencia técnica en la microscopía electrónica de transmisión.

Al Dr. Ramón Trullás Oliva por darme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio de investigación del Departamento de muerte y proliferación celular, en el Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IibB-CSIC), España.

La asistencia técnica de Núria Serra, al Dr. Petar Podlesniy y a la Dra. Joanna Figueiro-Silva por su ayuda durante mi estancia en el IibB, España.

A la Mtra. Karina B. Torres Maldonado por su invaluable apoyo durante tantos años.

A los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, sus apreciables sugerencias y comentarios:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz. Instituto de Neurobiología, UNAM.

Dra. Aliesha Araceli González Arenas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Lourdes Maissieu Trigo. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Martha Robles Flores. Facultad de Medicina, UNAM.

Dedicado con cariño a:  
mis padres ***Alejandra & Fernando***;  
mis hermanos: ***Vania, Mario, Ana y Luis***;  
a mi abuelo: ***Mario***;  
a ***Ilia***.

*In memoriam:*  
***Rufina & Alicia***, mis abuelas.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	1
<b>GLOSARIO</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	10
<b>2.1 Vía de señalización Wnt</b>	
2.1.1. La familia de proteínas Wnt.....	10
2.1.2. Receptores y correceptores de las proteínas Wnt.....	12
2.1.3. Señalización intracelular de la vía Wnt.....	14
Vía canónica de Wnt.....	14
Vías Wnt no canónicas.....	19
Vía Wnt/PCP.....	20
Vía Wnt/Calcio.....	22
2.1.4. Moduladores negativos de la actividad de Wnt.....	24
La familia sFRP.....	25
La familia Dickkopf.....	26
<b>2.2. Vía Wnt y sus efectos sobre Sistema Nervioso</b>	
2.2.1. Función de Wnt en el desarrollo de axones y dendritas.....	28
2.2.2. Función de Wnt en la formación de sinapsis.....	32
2.2.3. Efectos de Wnt en la función sináptica.....	35
2.2.4. Wnt y actividad neuronal.....	37
2.2.5. Función de Wnt en neuronas maduras.....	37
2.2.6. Wnt y neurogénesis.....	40
2.2.7. Wnt en enfermedades neurodegenerativas.....	43
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	44
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	44
<b>5. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	44
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	45
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	46
7.1. Sujetos experimentales.....	46
7.2. Cirugía estereotáxica para el implante de cánulas bilaterales e infusión de fármacos.....	46

7.3. Pruebas conductuales.....	47
7.3.1 Tarea de reconocimiento de lugar de objeto (RLO).....	47
7.3.2. Campo abierto.....	49
7.4. Obtención del tejido para histología.....	49
7.5. Tinción con violeta de cresilo.....	49
7.6. Inmunohistoquímica.....	50
7.7. Procesamiento del tejido para inmunofluorescencia.....	51
7.8. Análisis de imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	51
7.9. Conteo celular.....	52
7.10. Procesamiento del tejido para Western-blot.....	52
7.11. Microscopía electrónica.....	54
7.12. Análisis estadísticos.....	54
7.13. Cultivos de células de neuroblastoma humano .....	54
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
8.1. W nt7a, W nt5a y Dkk-1 i nducen c ambios en l as pr oteínas de l citoesqueleto de células de neuroblastoma humano <i>in vitro</i> .....	56
8.2. Efecto de los agonistas y el antagonista Wnt en la viabilidad neuronal.....	59
8.3. Efectos del tratamiento a largo plazo con Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 en marcadores pre- y post-sinápticos.....	60
8.4. Cambios e n l a de nsidad de l m arcador pr esináptico, B assoon, i nducidos por l a modulación de Wnt.....	62
8.5. E fecto ne urogénico de l a i n fusión c rónica de W nt7a, W nt5a o Dkk-1 en el hipocampo.....	62
8.6. Activación de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en el hipocampo.....	72
8.7. Cambios ul traestructurales en l as sinapsis i nducidos por W nt7a, W nt5a o Dkk-1 .....	72
8.8. Cambios c onductuales i nducidos por l a m odulación d e l a señalización Wnt.....	75
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>100</b>
12.1 “ <i>Role of Wnt Signaling in the Control of Adult Hippocampal Functioning in Health and Disease: Therapeutic Implications</i> ”.	
12.2. “ <i>Chronic infusion of Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 in the adult hippocampus induces structural synaptic changes and modifies anxiety and memory performance</i> ”	
12.3, “ <i>Differential changes in the number and morphology of the new neurons after chronic infusion of Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 in the adult hippocampus in vivo</i> ” (En prensa).	

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biogénesis y secreción de Wnt.....	p. 11
<b>Figura 2.</b> Vías de señalización Wnt canónica.....	p.19
<b>Figura 3.</b> Vías de señalización Wnt no canónicas o independientes de $\beta$ -catenina.....	p. 23
<b>Figura 4.</b> Señalización Wnt en la membrana: agonistas y antagonistas Wnt.....	p. 27
<b>Figura 5.</b> Línea de tiempo del protocolo experimental.....	p. 46
<b>Figura 6.</b> La modulación de la vía de señalización Wnt induce cambios en el citoesqueleto y la morfología de la línea de células de neuroblastoma humano MSN .....	p. 57
<b>Figura 7.</b> El agonista Wnt5a y el antagonista Dkk-1 permanecen activos y continúan liberándose de las minibombas osmóticas recuperadas el día 11, al final de los experimentos <i>in vivo</i> .....	p.58
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de una sección coronal del hipocampo de la rata adulta, en la cual, se ejemplifica el sitio de colocación de la cánula bilateral.....	p.59
<b>Figura 9.</b> Cambios en proteínas sinápticas inducidas por la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1. .....	p.61
<b>Figura 10.</b> Cambios en MAP2 y Bassoon en la subregión CA1 después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.....	p.63
<b>Figura 11.</b> Cambios en MAP2 y Bassoon en la subregión CA3 después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.....	p.64
<b>Figura 12.</b> Cambios en MAP2 y Bassoon en el giro dentado después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.....	p.65
<b>Figura 13.</b> Inmunofluorescencia contra GFAP ( <i>coral</i> ) en la lámina suprapiramidal del GD luego de la exposición a largo plazo a: Wnt7a, Wnt5a, Dkk-1.....	p. 67
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia contra GFAP ( <i>coral</i> ) en la cresta del GD luego de la exposición a largo plazo a: Wnt7a, Wnt5a, Dkk-1.....	p.68
<b>Figura 15.</b> Efectos de la modulación de la señalización Wnt en la tasa de neurogénesis en la lámina suprapiramidal del GD.....	p.69
<b>Figura 16.</b> Efectos de la modulación de la señalización Wnt en la tasa de neurogénesis en la cresta del GD.....	p.70
<b>Figura 17.</b> Cambios en el patrón de crecimiento y la orientación de las neuritas de células nuevas inducidos por los moduladores de Wnt.....	p.71
<b>Figura 18.</b> Modulación de los niveles de $\beta$ -catenina y la fosforilación de tau por los agonistas y el antagonista de Wnt.....	p.73
<b>Figura 19.</b> Análisis ultraestructurales de las sinapsis de hipocampos de animales expuestos crónicamente a los agonistas y el antagonista de Wnt.....	p.74
<b>Figura 20.</b> Cambios conductuales evaluados en las tareas de: campo abierto y reconocimiento de lugar de objeto luego de la exposición a largo plazo a los moduladores de la vía Wnt.....	p. 76



## GLOSARIO

aa	aminoácidos
aCSF	Líquido cefaloraquídeo artificial. Del inglés: <i>artificial cerebrospinal fluid</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPA	receptores tipo AMPA (del inglés: <i>Alpha amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i> )
$\alpha$ N-catenina	catenina neural
ANOVA	Análisis de la varianza (Del inglés: <i>ANalysis Of VAriance</i> )
AP	anteroposterior
APC	Poliposis adenomatosa de colon (del inglés: <i>adenomatous polyposis coli</i> )
APCDD1	del inglés: <i>adenomatosis polyposis coli down-regulated</i>
aPKC	del inglés: <i>atypical PKC</i>
ATF2	factor de transcripción. Del inglés: <i>activating transcription factor 2</i>
BCL9	del inglés: <i>B-cell lymphoma 9 protein</i>
BSA	albúmina de suero bovino
$\beta$ -TrCP	del inglés: <i><math>\beta</math>-transducin repeat-containing protein E3 ubiquitin ligase</i>
°C	Grado Celsius (históricamente conocido como centígrado)
CA1/3	<i>Cornu Ammonis 1/3</i>
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de Calcio
CamKII	Calmodulina-dependiente de la proteína cinasa II (del inglés: <i>Calmodulin-dependent protein kinase II</i> )
CamKIV	Del inglés: <i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV</i>
CBP	Del inglés: <i>CREB (cAMP response element-binding)-binding protein</i>
Cdc42	del inglés: <i>cell division cycle 42</i>
CDK14	del inglés: <i>cell-cycle-dependent kinase</i>
CK-1, $\epsilon$ , $\delta$ y $\gamma$	proteína caseína cinasa (del inglés: <i>casein kinase</i> )
cKO	del inglés: <i>conditional knockout</i>
cm	centímetros
CNA	calcineurina (en inglés: <i>Calcineurin</i> )
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C-terminal	Externo carboxilo terminal
CREB	del inglés: <i>cAMP-response element-binding protein</i>
CRD	dominio rico en cisteínas (del inglés: <i>Cistein rich domain</i> )
c/u	cada uno
Cys	Cisteína, aminoácido no esencial
DAB	diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol (del inglés: <i>1,2, diacylglycerol</i> )
DCX	Doblecortina
DCX+	Células doblecortina positivas
DEP	dominio C-terminal de la proteína Dishevelled. Acrónimo que combina: DVL, Egl-10, pleackstrin
DIX	dominio N-terminal de proteína Axina “disheveled”
Dkk-1	del inglés: <i>Dickkopf-related protein 1</i>
DSU	Del inglés <i>Disk Scanning Unit</i>
DV	Dorsoventral
Dvl	proteína Dishevelled

fEPSP	Potenciales postsinápticos excitadores de campo (del inglés: <i>field excitatory postsynaptic potentials</i> )
Foxy-5	hexapeptido formilado derivado de Wnt5a
Frzb	por el motivo Frizzled asociado con el desarrollo óseo; del inglés: <i>bone</i>
Fz o Fzd	receptor Frizzled
GABA	ácido $\gamma$ -aminobutírico (del inglés: <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> )
GABA <sub>A</sub>	Receptor de GABA tipo A (del inglés: <i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid type A</i> ). Clase de receptor que forma parte de un complejo de canal iónico regulado por ligando
GAG	Glicosaminoglicanos, los heteropolisacáridos más abundantes del cuerpo
GAPs	proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa (del inglés: <i>GTPase-activating proteins</i> )
GAPDH	Del inglés: <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEFs	factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (del inglés: <i>guanine nucleotide exchange factors</i> )
GD	Giro dentado
GDI	inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (del inglés: <i>guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i> )
GDP	Guanosín difosfato (del inglés: <i>Guanosine diphosphate</i> )
GFAP	Del inglés: <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (del inglés: <i>G-protein-coupled receptors</i> )
GRK	Del inglés: <i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GSK-3	Cinasa sintasa de glucógeno, Glicógeno ó glucógeno sintasa cinasa-3 (del inglés: <i>Glycogen synthase kinase 3</i> )
GTP	Guanosín trifosfato (del inglés: <i>Guanosine triphosphate</i> )
GTPasa	Guanosina trifosfatasa o trifosfatasas de guanosina
h	hora (s)
H <sub>2</sub> O	agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HDACs	Desacetilasas de histonas. Del inglés: <i>histone deacetylases</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HFS	Del inglés: <i>High-frequency stimulation</i>
HIF1 $\alpha$	del inglés: <i>Hypoxia inducible factor 1 alpha</i>
HMG	grupo de alta movilidad (del inglés: <i>high mobility</i> )
HSPGs	Heparán sulfato proteoglicanos (del inglés: <i>Heparan sulfate proteoglycans</i> )
IGFBP-4	Del inglés: <i>insulin-like growth-factor binding protein 4</i>
HRP	Del inglés: <i>horseradish peroxidase</i>
iLoop	asas intracelulares (del inglés: <i>intracellular loop</i> )
<i>int-1</i>	gen <i>int-1</i> del ratón (del inglés: <i>integration-1</i> )
IP <sub>3</sub> o InsP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato, inositol 1, 4, 5-trifosfato o trifosfoinositol (del inglés: <i>Inositol-1, 4, 5-triphosphate</i> ). Un segundo mensajero de la transducción de señal celular
JNK	del inglés: <i>c-JUN- N-terminal kinase</i>
K <sup>+</sup>	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
kDa	kiloDalton

KO	ratones nulos o <i>knockout</i>
Krm1/2	Kremen1 y 2
LDL	lipoproteína de baja densidad (del inglés: <i>low-density lipoprotein</i> )
LEF	factor potenciador linfoide (del inglés: <i>lymphoid-enhancing factor</i> )
Li <sup>+</sup>	Litio
LRP-5/6	receptor relacionado a LDL (del inglés: <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i> )
LTP	potenciación a largo plazo (del inglés: <i>long-term potentiation</i> ).
M	molar
mAb	del inglés: <i>monoclonal Antibody</i>
MAP(s)	proteína(s) asociada(s) a microtúbulos (del inglés: <i>microtubule-associated proteins</i> ).
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos. De las siglas en inglés: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MARK	del inglés: <i>microtubule-affinity-regulating kinase</i>
mEPSCs	corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (del inglés: <i>miniature excitatory postsynaptic currents</i> )
µg	microgramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
Min	minutos
µL	microlitro
ml	mililitro
ML	mediolateral
µM	microMolar
mM	milimolar
mm	milimetro
MUSK	receptor de tirosina quinasa (del inglés: <i>muscle skeletal receptor Tyr kinase</i> )
MVBs	cuerpos multivesiculares (del inglés: <i>multivesicular bodies</i> )
N2A	células de neuroblastoma 2A
NaCl	Cloruro de sodio
N-cadherina	cadherina neural
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fostato de sodio monobásico
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
NeuN	Marcador de núcleos neuronales. Del inglés <i>neuronal nuclei</i>
NeuroD1	del inglés: <i>Neuronal differentiation 1</i>
NF-AT	del inglés: <i>nuclear factor associated with T cells</i>
NF-κB	por: <i>NF-KappaB</i>
ng	nanogramo
NGF	factor de crecimiento nervioso (del inglés: <i>nerve growth factor</i> )
nM	nanomoles
nm	nanometro
NMDA	del inglés: <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NP-40	Del inglés: <i>Tergitol-type NP-40, nonyl phenoxyethoxyethanol</i> .
NSCs	células precursoras neurales. Del inglés: <i>neural-stem cells</i>
N-terminal	dominio extracelular amino terminal
O <sub>2</sub>	Oxígeno
p	valor P, es el nivel de significancia estadística

p38 MAPK	del inglés: <i>p38 mitogen-activated Protein kinases</i>
PAR-1	Proteína cinasa Serina/treonina PAR-1 (del inglés: <i>PKC-1-kinase</i> )
PB	amortiguador de fosfatos o buffer fosfatos. Del inglés: <i>phosphate buffer</i>
PBS	amortiguador fosfato salino o buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCP	polaridad celular planar (del inglés: <i>planar cell polarity</i> )
PDZ	acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas: proteína de densidad postsináptica (PSD95), proteína supresora de tumores en <i>Drosophila</i> (DlgA), y la proteína zonula occludens-1 (zo-1) - que fueron en las primeras en las cuales se descubrió el dominio.
PFA	paraformaldehído
pH	potencial de hidrógeno o potencial de hidrogeniones. Coeficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa.
PHF-1	anticuerpo que reconoce el epítipo alrededor de los sitios fosforilados Ser 396 y Ser 404 de la proteína Tau
PI3K	del inglés: <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i>
PIP2	fosfolípido, del inglés: <i>phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate</i>
PKA	Proteína cinasa A (del inglés: <i>Protein kinase A</i> )
PKC	Proteína cinasa C (del inglés: <i>protein kinase C</i> )
PLC	Fosfolipasa C (del inglés: <i>phospholipase C</i> )
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo. Del inglés: <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> . Un inhibidor de proteasas de serina
PP1	del inglés: <i>Protein phosphatase 1</i>
Prox1	del inglés: <i>prospero-related homeobox 1 gene</i>
PSD	Densidad postsináptica (del inglés: <i>postsynaptic density</i> )
PSD-95	Proteína de la densidad postsináptica 95 (del inglés: <i>postsynaptic density protein 95</i> )
PTK7	receptor con actividad intrínseca de cinasa de tirosina (del inglés: <i>protein Tyr kinase</i> )
RA	Ácido retinóico. Del inglés: <i>retinoic acid</i>
Rac	del inglés: <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RE	Retículo endoplasmático
Rho	del inglés: <i>Ras homologous member A</i>
RIPA	Del inglés: <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RLO	Tarea de reconocimiento de lugar de objeto
ROCK	del inglés: <i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase</i>
Ror	receptor de tirosina cinasa (del inglés: <i>receptor tyrosin kinase-like orphan receptor</i> )
Rpm	revoluciones por minuto
RPMI	medio de cultivo celular. Del inglés: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RR	rojo radiante
Rspo	de la familia <i>R-spondin</i>
Ryk	receptor de tirosina cinasa (del inglés: <i>receptor tyrosine kinase</i> )
SCF	complejo multiproteico de ubiquitina ligase E3, del inglés: <i>Skp/Cullin/F-box containing complex</i> .
SDS	o NaDS. Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Del inglés: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>

SEM	medida del error estándar de la media (llamado en inglés: <i>standard error of the mean</i> )
Ser	Serina, uno de los veinte aminoácidos componentes de las proteínas codificados mediante el genoma
SFRP-2	del inglés: <i>secreted Frizzled-related protein</i>
Sgy	Soggy. También conocido como: <i>Dickkopf-like protein 1, Dkk1</i>
SGZ	zona subgranular (del inglés: <i>subgranular zone</i> )
SNC	Sistema Nervioso Central
SV2	proteína de vesícula sináptica 2 (del inglés: <i>synaptic vesicle Protein 2</i> )
SVZ	zona subventricular (del inglés: <i>subventricular zone</i> )
SYP	Sinaptofisina
TBS	Del inglés: <i>Tris-buffered saline</i>
TCF	del inglés <i>T-cell factor</i>
TGF-β1	del inglés: <i>Transforming growth factor-β1</i>
TLE	del inglés: <i>transducin-like enhancer of Split</i> . Conocido como “Groucho” en la <i>D. melanogaster</i>
TLX	receptor nuclear también conocido como NR2E1
TMS	región transmembranal (del inglés: <i>transmembrane spanning</i> )
USAG-1	del inglés: <i>uterine sensitization-associated gene-1</i>
Vangl2	<i>VANGL Planar Cell Polarity Protein 2</i>
vGlut1	transportador vesicular de glutamato (del inglés: <i>vesicular glutamate transporter 1</i> )
Waif1/5T4	del inglés: <i>Wnt-activated inhibitory factor 1</i>
Wg	gen <i>Wingless</i> de la mosca de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i>
WIF-1	del inglés: <i>Wnt inhibitory factor-1</i> . Proteína secretable que actúa como inhibidor de la vía Wnt
Wise/SOSTDC1	del inglés: <i>sclerostin domain-containing 1</i>
Wnt	De <i>Wingless-type MMTV integration site</i> . Nombre de la vía que deriva del gen <i>Wingless</i> (Wg) y del gen <i>INT-1</i> de ratón. Puede pronunciarse como “wint”.

## RESUMEN

La señalización Wnt participa de manera importante en la función sináptica del cerebro adulto, y su desregulación se ha asociado con algunas enfermedades neurodegenerativas. A pesar del reconocido papel funcional de la vía de señalización Wnt en los circuitos neuronales del cerebro adulto, no hay evidencia sobre la relación entre la activación o inhibición de la señalización Wnt y su capacidad de inducir cambios estructurales y funcionales en el hipocampo *in vivo*. Por lo tanto, en este trabajo analizamos los efectos de la infusión crónica, (mediante una mini-bomba osmótica) de los agonistas Wnt7a (*Wingless-type MMTV integration site family member 7A*), Wnt5a (*Wingless-type MMTV integration site family member 5A*), y el antagonista Dkk-1 (del inglés: “Dickkopf-related protein 1”) en el hipocampo de la rata adulta, en diferentes marcadores de plasticidad neuronal como proteínas estructurales del citoesqueleto neuronal, MAP-2 y tau, proteínas sinápticas, Bassoon y PSD95 (del inglés: “postsynaptic density protein 95”), así como en el número y la morfología de las sinapsis. También se analizaron cambios en el desempeño de una tarea de memoria espacial. Observamos que, en comparación con el grupo control y el infundido con Dkk-1, Wnt7a y Wnt5a incrementaron el número de sinapsis perforadas y la densidad de proteínas pre- y postsinápticas asociadas con el ensamblaje sináptico como Bassoon y PSD-95. El incremento observado en la proteína PSD-95 fue consistente con los datos obtenidos por Western blot, y se produjo particularmente luego del tratamiento con Wnt5a. En contraste, la infusión de Dkk-1 se asoció con una disminución en el contenido de PSD-95. Por otra parte, los agonistas Wnt7a y Wnt5a tuvieron un efecto en la formación de neuronas granulares nuevas, evaluado mediante la inmunodetección de doblecortina (DCX) en el giro dentado (GD). Los tratamientos crónicos con Wnt7a y Wnt5a incrementaron el número de células DCX+ en la cresta del GD. Adicionalmente, las células DCX+ de los animales tratados con el agonista Wnt5a y el antagonista Dkk-1 mostraron patrones desorganizados en el crecimiento de neuritas. Más aún, la activación de la vía Wnt canónica, medida por los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina total y de su forma activa, se produjo por ambos agonistas en comparación con los animales control infundidos con PBS y con los que se les infundió Dkk-1. Aunado a lo anterior, Wnt7a y Wnt5a también produjeron una disminución en la fosforilación de tau en la Ser199/202, mientras que la aparición de la forma PHF-1 (fosfo-Ser396/404) de tau fue más notable en los sujetos tratados con Dkk-1. Por otra parte, en la tarea de campo abierto se observó que ambos agonistas redujeron las conductas de ansiedad, y en contraparte, el antagonista Dkk-1, incrementó la ansiedad de los sujetos e inhibió la evocación de la memoria espacial. Por lo tanto, el presente estudio aporta evidencia sobre la participación de la señalización Wnt en la remodelación de los circuitos hipocámpales que subyacen eventos de plasticidad *in vivo*, y sobre el efecto potencial de la infusión de Wnt7a para mejorar parámetros morfológicos y funcionales asociados con algunas afecciones neurodegenerativas.

## ABSTRACT

Wnt signaling plays a potential role in synapse function in the adult brain and its dysregulation has been implicated in some neurodegenerative diseases. Despite the functional role of the Wnt signaling pathway in adult neural circuits, there is currently no evidence regarding the relationships between exogenously Wnt signaling activation or inhibition and hippocampal structural changes *in vivo*. Thus, we analyzed the effect of chronic infusion of Wnt agonists, Wnt7a and Wnt5a, and antagonist, Dkk-1, through an osmotic mini-pump on the adult rat hippocampus, on different markers of neuronal plasticity such as MAP-2, tau, synapse number and morphology, and behavioral changes. We observed that Wnt7a and Wnt5a increased the number of perforated synapses and the density of pre-and postsynaptic proteins, such as Bassoon and PSD-95, associated with synapse assembly compared to control and Dkk-1 infusion. The observed increase in PSD95 protein was consistent with the data obtained by Western blot quantitation and was produced particularly after Wnt5a treatment. On the other hand, Dkk-1 infusion was associated with a decrease in PSD-95 content. Wnt7a and Wnt5a agonists also had an effect on the formation of new born granule neurons, assessed through doublecortin (DCX) immunodetection in the DG. The chronic treatment with Wnt7a and Wnt5a agonists increased the number of DCX-positive cells in the crest of the DG. Additionally, the DCX-positive cells of the animals treated with the Wnt5a agonist and the Dkk-1 antagonist exhibited a very disorganized neurite growth patterns. The activation of Wnt canonical pathway, measured by total  $\beta$ -catenin levels and its active form, was produced by both Wnt agonists compared with control PBS and Dkk-1 infused animals. Wnt7a and Wnt5a also produced a decrease in tau phosphorylation at the Ser199/202, while the appearance of the PHF-1 (phospho-Ser396/404) form of tau was more pronounced in the Dkk-1 group. Furthermore, the two agonists also reduced anxiety-like behavior. Conversely, the canonical antagonist, Dkk-1, increased anxiety and inhibited spatial memory recall. Therefore, the present study elucidates the potential participation of Wnt signaling in the remodeling of hippocampal circuitis underlying plasticity events *in vivo* and provides evidence of the potential benefits of Wnt agonists infusion for the treatment of some neurodegenerative conditions.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo del sistema nervioso las proteínas Wnt (*Wingless-type MMTV integration site*) regulan procesos celulares como la proliferación, la migración, la diferenciación neuronal, y participan en la morfogénesis dendrítica, la guía axonal y el ensamblaje de los sitios pre y postsinápticos para el establecimiento de circuitos neuronales funcionales<sup>1-5</sup>.

De los 19 ligandos Wnt, los más estudiados por sus efectos neuronales *in vitro* son Wnt3a, Wnt7a y Wnt5a. Uno de los efectos de la activación de la vía Wnt se refiere a su papel modulador de la morfología neuronal mediante la regulación de diferentes proteínas del citoesqueleto y proteínas asociadas a éste. En particular, Wnt3a y Wnt-7a actúan como señales extracelulares que participan en el desarrollo de axones y dendritas, promoviendo la orientación axonal así como la ramificación e incremento del cono de crecimiento<sup>6-8</sup>. Estos efectos son consistentes con su papel como señales que regulan la estructura presináptica.

Además de su papel en el establecimiento de la región presináptica, las proteínas Wnt también tienen funciones relevantes en la estructura postsináptica. Wnt-5a induce la formación de espinas dendríticas y promueve el aumento en el tamaño de las dendritas pre-existentes. Aunado a la regulación de la morfogénesis dendrítica, Wnt-5a también regula el ensamblaje postsináptico en neuronas hipocámpales en cultivo. Este efecto se da a través del incremento en las agrupaciones de la proteína de la densidad postsináptica, PSD-95, la cual, a su vez, interactúa con moléculas involucradas en el anclaje de receptores a glutamato, tipo AMPA (AMPA; del inglés: “Alpha amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor”) y otras proteínas que participan en la neurotransmisión. Adicionalmente, Wnt-5a promueve el agrupamiento de la proteína de vesículas sinápticas SV2 (del inglés: “synaptic vesicle Protein 2”), aumentando de esta manera el número total de contactos sinápticos<sup>9-11</sup>.

Más recientemente, se ha descrito la expresión de los ligandos Wnt y de los componentes de sus vías de señalización en el cerebro adulto<sup>12,13</sup>, y su desregulación se ha asociado con enfermedades mentales como la esquizofrenia, la depresión y algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y el Parkinson<sup>14-19</sup>.

De esta manera, se plantea que la vía de señalización Wnt puede ser un elemento importante en el mantenimiento y la función neuronal en etapas postnatales.



## 2. ANTECEDENTES

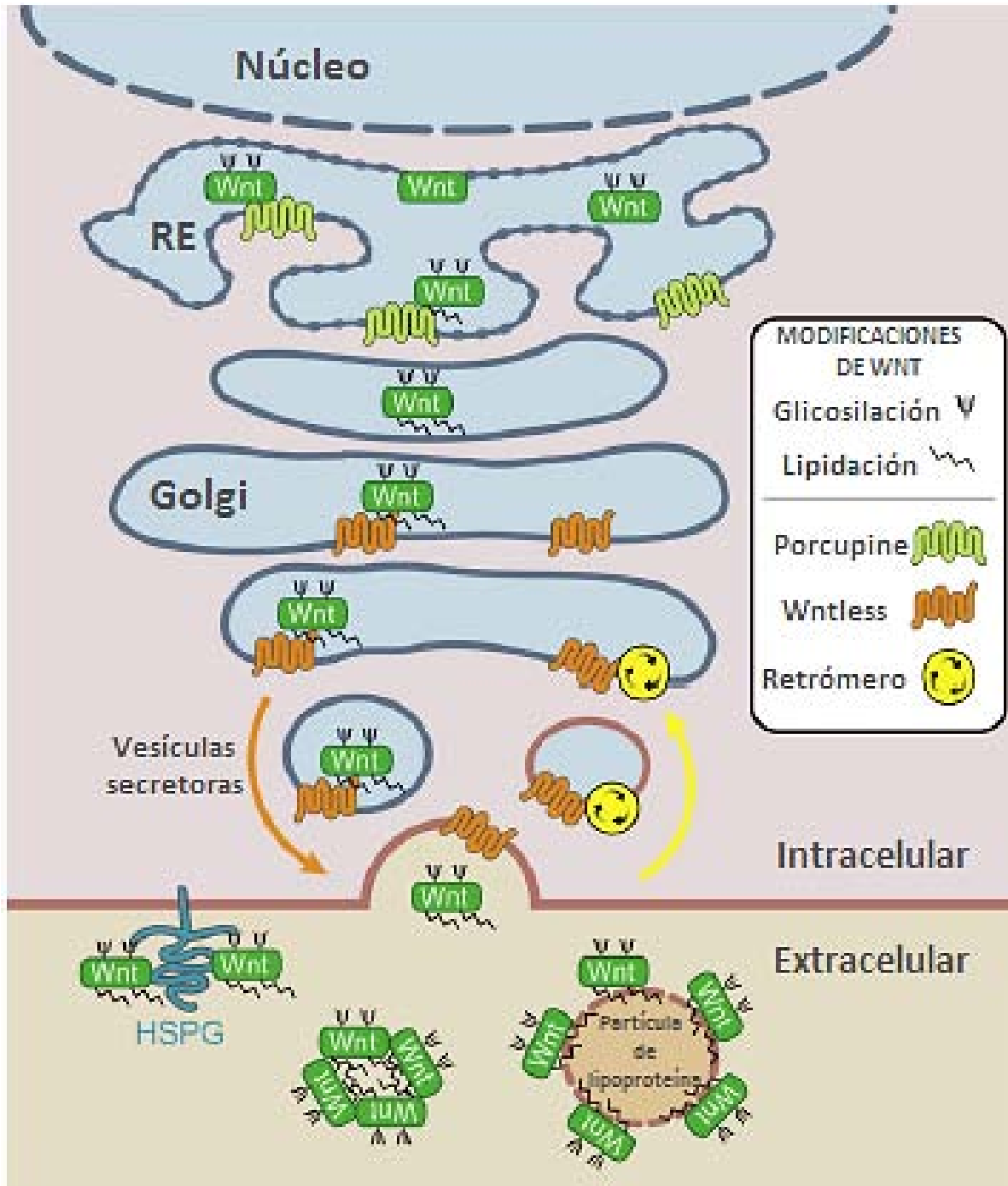
### 2.1. Vías de señalización Wnt

#### 2.1.1. La familia de proteínas Wnt

El nombre de la vía Wnt, que puede pronunciarse como “wint”, deriva de la combinación de los nombres de los genes homólogos: *Wg* (Wingless) de la *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y del gen *int-1* (integration-1) del ratón<sup>20</sup>; la señalización mediada por Wnt fue inicialmente caracterizada durante investigaciones sobre cáncer en ratones y estudios sobre el desarrollo embrionario en *Drosophila*, *Xenopus* y otros organismos<sup>21,22</sup>.

Los genes WNT codifican una extensa familia de glicoproteínas modificadas lipídicamente, que se secretan y actúan como señales intercelulares para una amplia gama de procesos fisiológicos y del desarrollo<sup>23</sup>. Todas las especies de metazoos expresan genes WNT. En el genoma de vertebrados se han identificado diecinueve genes independientes que codifican proteínas Wnt con secuencias de aminoácidos (aa) muy similares (de entre 350-400 aa) y con pesos que varían entre 39kDa (Wnt7a) y 46kDa (Wnt10a). Además, estas proteínas tienen un péptido señal (secuencia señal amino-terminal de aproximadamente 20 aa hidrofóbicos), varios sitios de glicosilación y acilación (S-palmitoilado en Cys77 y O-acilado con ácido palmítico en Ser209) potenciales, así como un dominio rico en cisteínas (patrones de 22 o 25 residuos de cisteína con espaciamientos altamente conservados). Dichas características y modificaciones lipídicas son esenciales para su adecuado plegamiento u oligomerización, procesamiento intracelular, secreción y función biológica. Además, las modificaciones postraduccionales que experimentan algunas de estas proteínas les confieren características específicas que les permiten actuar a corto alcance de manera autocrina o paracrina<sup>20,24-29</sup>.

La secreción de los ligandos Wnt es un proceso complejo que requiere de una maquinaria celular especializada que controla su exportación (Fig. 1). Dada la presencia de una cadena de ácidos grasos en las proteínas Wnt que incrementa su hidrofobicidad, la solubilidad de las proteínas Wnt en el espacio extracelular y su eficiente transporte requieren de moléculas o complejos que interactúen con las mitades hidrofóbicas<sup>29</sup>. Una vez secretadas, en la matriz extracelular las proteínas Wnt se asocian con glicosaminoglicanos (GAG) ligados a la superficie de la célula que modulan su distribución, difusión y su interacción con receptores de superficie celular para la transducción de señales<sup>15,30,31</sup>.



**Figura 1. Biogénesis y secreción de Wnt.** Las proteínas Wnt son glicosiladas y modificadas lipídicamente en el RE (Retículo endoplasmático), lo que involucra la función de Porcupine, una proteína de varios segmentos transmembranales. Wntless, otra proteína de múltiples segmentos transmembranales, guía a las proteínas Wnt desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática donde serán secretadas. Wntless es recuperada de las vesículas endocíticas y devuelta al aparato de Golgi mediante un complejo de cinco unidades conocido como retrómero. Luego de su secreción, las proteínas Wnt pueden acoplarse a HSPGs (del inglés: “Heparan sulfate proteoglycans”) y partículas de lipoproteínas o formar multímeros, los cuales pueden modular los gradientes de Wnt y facilitar su señalización. (Figura tomada y modificada de: <sup>32</sup>)

### 2.1.2. Receptores y correceptores de las proteínas Wnt

La recepción y transducción de las señales intracelulares de Wnt que desencadenarán una respuesta celular, requieren el acoplamiento de las proteínas Wnt a miembros de distintas familias de receptores de superficie celular como: la familia de genes Frizzled (Fz o Fzd), PTK7 (del inglés: “protein Tyr kinase”), MUSK (del inglés: “muscle skeletal receptor Tyr kinase”) y familias de proteoglicanos, así como también, a correceptores como: la familia de la proteína relacionada a receptor LDL (LRP)-5/-6 (del inglés: “low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6”), y receptores de tirosina cinasa Ryk (del inglés: “receptor tyrosine kinase”) o Ror (del inglés: “receptor tyrosin kinase-like orphan receptor”) <sup>33-39</sup>.

Las proteínas Fz son los principales receptores de superficie celular que median la señalización de los ligandos Wnt. Las estructuras primarias de estos receptores de membrana presentan varias características que incluyen: **1)** un gran dominio extracelular amino terminal (N-terminal) rico en cisteínas (CRD, del inglés: “Cistein rich domain”) con segmentos que, con o sin los co-receptores LRP5/6, participan en el acoplamiento de los agonistas (p.e. Wnt) o los antagonistas (p.e. miembros de la familia SFRP (del inglés: “secreted Frizzled-related protein”), WIF-1 (Wnt inhibitory factor-1), Cerberus, y miembros de la familia de ligandos Dkk-1; **2)** una estructura semejante a los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés: “G-protein-coupled receptors”), con una región transmembranal (TMS, del inglés: “transmembrane spanning”) central compuesta por siete segmentos alfa-hélice hidrofóbicos que abarcan la bicapa lipídica; **3)** tres asas intracelulares (iLoop1, iLoop2 e iLoop3, entre los segmentos TMS I-II, III-IV, y IV-VI) con orientación citoplásmica; y, **4)** un tallo citoplásmico corto que contiene un dominio de unión a PDZ en el extremo carboxilo (C-terminal) y que comunica con los elementos de señalización que se encuentran río abajo en el citoplasma celular; y tres asas extracelulares que participan en la palmitoilación y la glicosilación. En los genomas de los mamíferos se han identificado diez genes que codifican a los Fz. (Fz1-Fz10)<sup>40,41</sup>.

Se sabe que la interacción molecular entre los ligandos Wnt y los receptores Fz está mediada por residuos conservados en ambas familias. Además, los receptores Fz usan correceptores como la principal determinante reguladora que provee especificidad para transducir la señal río abajo a través de las diferentes vías de señalización Wnt. Los correceptores son proteínas de superficie que se asocian con un ligando y su receptor primario para incrementar la formación de complejos y la señalización río abajo <sup>33,39,42-44</sup>.

LRP-5 y LRP-6 son dos miembros de la familia de receptores de lipoproteínas LRP de un solo dominio transmembrana, un dominio largo extracelular y un dominio corto citosólico. Estos actúan como correceptores de Wnt y forman un complejo ternario con Wnt y Fz, favoreciendo la activación de la vía de señalización Wnt canónica<sup>45</sup>. Además de los receptores Fz y LRP-5/-6, existen otros receptores que pueden participar en la transducción de la señalización Wnt, como los receptores de tirosina cinasa Ror1, Ror2 y Ryk, que son aptos para unirse a los ligandos mediante un dominio CRD o WIF, respectivamente<sup>46-48</sup>. En la vía Wnt canónica o señalización dependiente de  $\beta$ -catenina, las proteínas Wnt acopladas a los receptores Fz forman un complejo ternario con LRP-5 o LRP-6; mientras que en las vías no canónicas Wnt/PCP (del inglés: “planar cell polarity”) o Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  (Calcio), se acoplan a Ror o PTK7. Por ejemplo, el ligando Wnt5a interactúa con el receptor Ror2 a través de su dominio CRD. Fz puede también interactuar con el receptor Ryk para activar las vías Wnt canónica y no canónicas. De esta manera, la activación de alguna de las cascadas de señalización por los ligandos Wnt, está determinada por la combinación de ligandos y receptores específicos en un contexto celular. un ejemplo de ello es la activación de las cinasas JNK (del inglés: “c-JUN-N-terminal kinase”) y Scr luego del acoplamiento de los ligandos Wnt a los receptores Ror2 y Ryk, respectivamente<sup>49</sup>.

Aunque se conoce poco sobre cómo es que la diversidad funcional de los ligandos Wnt está organizada a nivel estructural y molecular, estudios recientes han demostrado que las células endoteliales cerebrales tienen que expresar un complejo multiproteico de membrana compuesto por el receptor de adhesión GPCR (del inglés: “G protein-coupled receptor”) Gpr124 y la glicoproteína Reck anclada a glicosilfosfatidilinositol, para responder a Wnt7a derivado de un progenitor neuronal, y con ello activar la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. La selectividad del ligando es conferida por Reck, el cual media la unión específica a Wnt7a de manera independiente a Fz al acoplar su dominio de unión. La presencia de Gpr124 es necesaria para el anclaje de Wnt7a unido a Reck a los receptores Fz, mediante el ensamblaje de complejos Reck/Gpr124/Fz/LRP5/6. Dicha función de Gpr124 se basa en su capacidad para interactuar extracelularmente con Reck y reclutar, intracelularmente, a la proteína de andamiaje Dishevelled. Al unir Gpr124 y Fz, la proteína Dishevelled recluta a Wnt7a a través de su asociación con Reck en señalomas Wnt/Fz dinámicos, generando un aumento de las concentraciones locales de ligando disponibles para la señalización. Esto sugiere que las células tienen complejos que funcionan como módulos de decodificación Wnt que permiten

distinguir entre los múltiples ligandos de esta familia de proteínas <sup>50</sup>.

### *2.1.3. Señalización intracelular de la vía Wnt*

El acoplamiento de las glicoproteínas Wnt secretadas a complejos receptores específicos presentes en las membranas de las células blanco pueden activar a una de las tres vías de señalización intracelulares de Wnt descritas hasta el momento en las células de vertebrados: **1)** la vía canónica, también conocida como Wnt/ $\beta$ -catenina o T-cell factor [Tcf]/ $\beta$ -catenina; o alguna de las dos vías no canónicas: **2)** la vía no canónica de la polaridad celular planar (Wnt/PCP) o Wnt/JNK, y **3)** la vía no canónica Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  o vía dependiente de Wnt/PKC (del inglés: “protein kinase C”). El nombre que se les da, siendo menos generales que <<vía canónica y no canónicas>>, depende de la vía activada río abajo por ligandos Wnt específicos. La activación de una u otra cascada de señalización es altamente dependiente del tipo celular y los receptores expresados en las células, y cada una de ellas genera un conjunto diferente de respuestas en la célula receptora mediante la activación de proteínas o genes blancos determinados <sup>49,51,52</sup>. Aunado a lo anterior, se ha demostrado que las vías de señalización se antagonizan entre sí a distintos niveles <sup>53-56</sup>.

#### Vía Wnt canónica

##### *Activación mediada por receptores, correceptores y proteínas de andamiaje*

En algunos contextos celulares, un subconjunto de isoformas de Wnt activa la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, caracterizada por la activación de ciertos genes blanco responsivos a  $\beta$ -catenina, la proteína que es un efector clave de la vía Wnt canónica por ser la responsable de la transducción de la señal en el núcleo.

La activación de la vía canónica se produce cuando, en la superficie celular, las proteínas Wnt son reconocidas por el complejo de receptores Fz y LRP-5/-6. El CRD del receptor Fz es el principal módulo de interacción para el acoplamiento del ligando Wnt, con afinidades en el rango de los nanomoles (nM) <sup>57</sup>. Durante la señalización, los receptores Fz cooperan con el co-receptor LRP-5/-6, de tal manera que el acoplamiento de la proteína Wnt

promueve la dimerización de los dos receptores, lo que induce un cambio conformacional en éstos <sup>36</sup>.

La activación de los receptores Fz dependientes de Wnt, resulta en el reclutamiento subsecuente de Dishevelled (Dvl), un componente esencial en la transducción de la señalización Wnt que actúa como intermediario. En el humano existen tres homólogos, Dvl1 - Dvl3, que tienen tres dominios conservados: DIX (por: Dvl/Axina), PDZ (por: postsynaptic density 95, disc large, zona occludens-1) y DEP (por: DV, Egl-10, pleckstrin). La señalización Wnt induce la polimerización de Dvl en la membrana plasmática, lo que involucra a los dominios DIX y PDZ, de los cuales, PDZ media la interacción directa de Dvl con los receptores Fz y los efectores río abajo. La señalización Wnt induce la (hiper) fosforilación de Dvl por cinasas como: CK-1 (del inglés: “casein kinase”, p.e. CK-1 $\epsilon$  y CK-1 $\delta$ ), CK-2 y PAR-1 o MARK (del inglés: “microtubule-affinity-regulating kinase”) <sup>58-60</sup>. Aunado a lo anterior, ya que los receptores Fz muestran una gran semejanza con la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs), se ha sugerido que las proteínas G (específicamente las subunidades G $_{\alpha}$  y G $_{\beta\gamma}$ ) podrían ser el enlace entre los receptores Fz y la activación de Dvl <sup>40,61,62</sup>. La activación de Dvl es importante para la señalización Wnt tanto canónica como no canónica, mientras que, la selectividad en la señalización de entre una y otra vía parece depender principalmente del reclutamiento y/o activación del co-receptor LRP-5/-6, cuyo dominio extracelular media la interacción con Wnt y Fz, en tanto que, la fosforilación de su dominio intracelular es el principal mecanismo de regulación de su función. Dicho co-receptor es indispensable para la vía canónica, determinando así, la señalización río abajo en respuesta a un ligando Wnt.

La fosforilación de la proteína Dvl que promueve su interacción con el receptor Fz resulta en la formación de complejos Dvl/Fz que inducen la agregación de LRP-6 en la membrana, lo que, a su vez, genera complejos ternarios de señalización compuestos por Wnt/Fz/LRP5/-6 que se agrupan en polímeros de la proteína de andamiaje Dvl para formar señalosomas endocíticos, denominados “señalosomas”, los cuales facilitan la transducción de la señal extracelular al compartimento intracelular. La fosforilación del tallo citoplásmico de LRP-6 en residuos de serina/treonina en los motivos P-P-P-[S/T]-P-X-S (P: prolina, S: serina, T: treonina, X: residuo de aa variable) por CK1 $\gamma$  (del inglés: “casein kinase1” gamma) y, subsecuentemente, por GSK-3 $\beta$  (del inglés: “Glycogen synthase kinase 3”) promueve la formación de los señalosomas. Otras cinasas que pueden fosforilar y modular la actividad de

LRP-6 son: otros miembros de la familia caseína cinasa 1, PKA (del inglés: “Protein kinase A”), GRK (del inglés: “G protein-coupled receptor kinase”) 5/6, y en mitosis, CDK14 (del inglés: “cell-cycle-dependent kinase”) y la ciclina Y <sup>63-68</sup>.

### *Estabilización de $\beta$ -catenina*

Una de las consecuencias principales de la activación vía Wnt/ $\beta$ -catenina es la estabilización de la proteína multifuncional  $\beta$ -catenina, que es el elemento clave en la transducción de señales de la vía Wnt canónica y la activación de los genes blancos de algunos ligandos Wnt. En ausencia de ligandos Wnt específicos, los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina se mantienen bajos por su degradación constante mediada por lo que se conoce como “complejo de destrucción”, que consta de varias proteínas. En contraparte, la activación de la vía Wnt, previene la fosforilación de  $\beta$ -catenina y con ello su ubiquitinación y destrucción mediada por proteosoma.

El complejo de destrucción está constituido por dos proteínas de andamiaje: Axina y APC (del inglés: “adenomatous polyposis coli”) que facilitan la fosforilación de  $\beta$ -catenina por las cinasas GSK3 $\beta$  y CK-1 $\alpha$ , lo que a su vez, conlleva a su reconocimiento y ubiquitinación por la proteína E3 ubiquitina-ligasa  $\beta$ -TrCP (del inglés: “ $\beta$ -transducin repeat-containing protein E3 ubiquitin ligase”), que marca a  $\beta$ -catenina para su degradación proteosomal <sup>69</sup>. Dado lo anterior, el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina desempeña un papel central en la vía de señalización Wnt canónica al regular la expresión y localización celular de  $\beta$ -catenina y mantener bajos los niveles citosólicos de esta proteína citoplásmica, al promover su constante proteólisis en ausencia de la señal desencadenada por Wnt.

Si bien se desconoce el mecanismo que subyace la transducción de las señales percibidas por los receptores de Wnt río abajo, un modelo sugiere que la señalización Wnt modula el destino celular mediante la regulación negativa de GSK3 mediada por Wnt/LRP6, que promueve la retención de GSK3 $\beta$  en cuerpos multivesiculares (MVBs, del inglés “multivesicular bodies”) en los cuales el complejo de destrucción es retenido junto con LRP-6, lo que podría explicar la inhibición sostenida de la enzima, la disminución global en la actividad citosólica de GSK3 y, con ello, el decremento de la degradación mediada por fosforilación de un amplio número de proteínas celulares. La formación de los MVBs se da a partir de la maduración de endosomas tardíos (señalosomas) cuando una porción de la

membrana del endosoma se invagina, quedando el lado citoplásmico de la membrana al que GSK3 $\beta$  está unido en el lumen de los MVBs, separando así con dos bicapas lipídicas a la cinasa del citosol<sup>70-73</sup>. Dicho mecanismo de inhibición mediado por Wnt, difiere del mecanismo general mediante el cual otros factores de crecimiento inhiben a GSK3 al inducir su fosforilación en las Serinas 9/21<sup>74-76</sup>.

### *Transcripción de genes blanco Wnt/ $\beta$ -catenina*

La interferencia en la actividad del complejo de destrucción inducida por la activación de la vía Wnt canónica provoca que la degradación proteosomal constitutiva de la proteína citoplasmática  $\beta$ -catenina disminuya, lo que conlleva a la estabilización, y con ello, al incremento en su concentración intracelular que favorece su translocación al núcleo<sup>77</sup>. De esta manera, la localización celular de  $\beta$ -catenina que es regulada por un proceso complejo y dinámico, es modulada por la señalización extracelular de Wnt, que resulta en el incremento de la presencia nuclear de la proteína<sup>52</sup>. En el núcleo, la señalización canónica mediada por Wnt, induce la transcripción de genes a través de la activación de miembros de la familia de factores de transcripción LEF-1/TCF.

Se han identificado cuatro factores de transcripción LEF-1/TCF: LEF-1, TCF7, TCF7L1 y TCF7L2 (los tres últimos también conocidos como TCF-1, TCF-3 y TCF-4), que pertenecen a la familia del grupo de alta movilidad [muestran un dominio HMG (del inglés “high mobility”) casi idéntico] y se unen al mismo motivo de ADN. No obstante, cada cual puede mediar diversas funciones a través de la represión o activación de diferentes conjuntos de genes<sup>78-81</sup>.

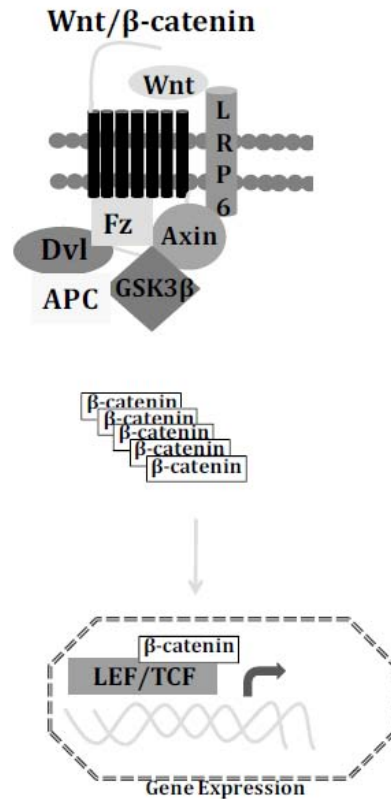
En ausencia de activación Wnt, los factores de transcripción TCF/LEF-1 están vinculados a los llamados elementos responsivos a WNT en el ADN, que actúan como supresores activos de la transcripción de genes. La represión de los genes blanco Wnt, requiere a TLE (del inglés “transducin-like enhancer of Split”, conocido como “Groucho” en la *D. melanogaster*) un represor de cromatina que funciona con desacetilasas de histonas (HDACs, del inglés “histone deacetylases”) para facilitar la compresión de la cromatina y la inhibición de la transcripción<sup>82,83</sup>. En el núcleo, la  $\beta$ -catenina activa (defosforilada en la N-terminal) desplaza a TLE/Groucho y forma un complejo con BCL9 (del inglés: “B-cell lymphoma 9 protein”), Pygopus, y el modificador de histonas CBP [del inglés: “CREB (cAMP response element-



binding)-binding protein”], así como con activadores transcripciones específicos de tejido, convirtiendo a TCF/LEF-1 en un activador transcripcional que da lugar a la expresión génica de manera específica, dependiendo del tipo celular <sup>84</sup>.

Los genes regulados por  $\beta$ -catenina/TCF/LEF-1 están involucrados en diversas funciones celulares importantes para el desarrollo embrionario y la homeostasis de tejidos. La amplia gama de genes blanco Wnt dependientes de  $\beta$ -catenina incluyen: varios factores de transcripción (p. e. miembros de la familia Sox, c-myc, n-myc, LEF-1 y TCF), proteínas reguladoras el ciclo celular (p. e. ciclina D1), factores de crecimiento (p. e. VEGF, TGF- $\beta$ , FGF18), proteínas de la matriz extracelular (p. e. versican y fibronectina), citocinas pro-inflamatorias y enzimas (p. e. IL-8 y COX-2), así como proteinasas, incluyendo varias metaloproteinasa de la matriz (p. e. MMP-2, MMP-7, MMP-12), entre otros como CamKIV (del inglés: “Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV”). Además, la señalización Wnt es una vía de señalización autorregulada, ya que también los moduladores positivos y negativos de la vía (p. e. Axin2, Wg, FDZ<sub>7</sub>, DKK-1 y SFRP-2) son genes blanco controlados por  $\beta$ -catenina y los factores de transcripción TCF/LEF-1 <sup>85</sup>.

En células no estimuladas por los ligandos Wnt,  $\beta$ -catenina es capturada eficientemente por la proteína de andamiaje Axina, la cual, además vincula y mantiene unidos a los otros componentes del complejo de destrucción: CK-1, GSK-3 y APC. Algunos sugieren que APC es un componente esencial que permite el reclutamiento y anclaje eficiente de  $\beta$ -catenina. Por su parte, Axina coordina la fosforilación secuencial de  $\beta$ -catenina en la Serina 45 por CK1 $\alpha$  y, del dominio N-terminal, en la Treonina 41, la Serina 37 y la Serina 33 por la proteína cinasa GSK3 $\beta$ . Además, GSK3 $\beta$  fosforila a Axina y APC, lo que permite el procesamiento adecuado de  $\beta$ -catenina en el complejo de destrucción. Una vez fosforilada en el extremo N-terminal,  $\beta$ -catenina es transferida por APC a la proteína ubiquitina E3  $\beta$ -TrCP, un miembro del complejo ubiquitina ligasa SCF (Skp/Cullin/F-box) que dirige a  $\beta$ -catenina para su rápida degradación mediada por proteosoma <sup>69,86</sup>. La supresión eficaz de los niveles de  $\beta$ -catenina citosólica permite que en el núcleo las proteínas TLE/Groucho se acoplen libremente a las proteínas TCF/LEF-1, con lo cual, estos complejos TCF/Groucho anulan la activación transcripcional de los genes blanco Wnt, silenciando una gran variedad de respuestas biológicas.



**Figura 2. Vía de señalización Wnt canónica.** Esquema simplificado que la **señalización Wnt canónica** o vía **Wnt/β-catenina**. El acoplamiento del ligando Wnt a los receptores Fz determina la activación de la vía canónica. La interacción Wnt-Fz requiere del co-receptor LRP5/6. Este complejo recluta a la proteína de andamiaje, Dvl. La inhibición de GSK3β por una serie de fosforilaciones permite la disociación de β-catenina del complejo de destrucción, el cual incluye a Axina, APC y a GSK3β. Esto conlleva a la acumulación de β-catenina en el citoplasma, y su subsecuente translocación al núcleo en donde interactúa con los factores de transcripción TCF/LEF, induciendo así, la expresión de genes blanco Wnt. La señalización canónica puede ser inhibida por la proteína Dkk-1 mediante su interacción con el co-receptor LRP5/6 a nivel extracelular. (Figura tomadas de <sup>90</sup>).

### Vías Wnt no canónicas

Existen consecuencias adicionales de la interacción de subconjuntos de isoformas de Wnt con sus receptores afines como la activación de las vías de señalización Wnt que no involucran el control de los niveles intracelulares de β-catenina, y que por ello se conocen como “vías Wnt no canónicas” o “independientes de la transcripción β-catenina/TCF”. La vía Wnt no canónica se subdivide en dos: **1)** la vía Wnt/PCP que río abajo señala a través de las GTPasas pequeñas de la familia Rho/Ras: Rho (del inglés “Ras homologous member A”) y Rac (del inglés “Ras- related C3 notulinum toxin substrate 1”) y, **2)** la vía Wnt/Calcio ( $Ca^{2+}$ ), que modula los niveles intracelulares del ión  $Ca^{2+}$  <sup>91-93</sup>.

### 1) Vía Wnt/PCP

El nombre de *polaridad celular planar* se refiere a la orientación uniforme de una población de células dentro de un plano epitelial. La vía se denominó así por los estudios pioneros en los que se empezaron a descubrir sus funciones. Por medio de esta vía de señalización no canónica, las proteínas Wnt, a través de la activación de las GTPasas, pueden conducir a la polimerización de actina y a la estabilización de los microtúbulos para regular procesos como la polaridad celular, los movimientos morfogénicos y la motilidad celular durante el desarrollo embrionario<sup>39,92,94-96</sup>. Aunque los mecanismos de señalización que dan lugar a estos resultados funcionales se conocen sucintamente, se sabe que las proteínas Wnt envían señales de polarización y/o de generación de fuerzas mecánicas dentro la célula, que se transducen a través del receptor Fz y co-receptores como PTK7 y ROR, que conllevan a la activación local de la proteína Dvl y de GTPasas pequeñas de la familia de proteínas Rho y Rac, que a su vez, activan río abajo a sus blancos, entre ellos, las cinasas ROCK (del inglés “Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase”) y JNK; por lo cual también podría identificarse como la “vía Wnt/JNK” en algunos casos<sup>39</sup>.

Las GTPasas cumplen una gama amplia de funciones que afectan distintos aspectos de la conducta celular al actuar como interruptores moleculares que ciclan entre conformaciones de actividad (forma unida a GTP) e inactividad (forma unida a GDP). Su ciclo entre los estados activo e inactivo está regulado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina GTP/GDP (GEFs, del inglés: “guanine nucleotide exchange factors”), proteínas estimuladoras de la actividad de GTPasa (GAPs, del inglés: “GTPase-activating proteins”) e inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (GDIs, del inglés: “guanosine nucleotide dissociation inhibitor”)<sup>97</sup>.

RhoA, Rac-1 y Cdc42 (del inglés “cell division cycle 42”) son tres de los miembros de la familia de GTPasas más estudiados. En las células eucariotas, estas proteínas, activadas por señales extracelulares, regulan el ensamblaje y dirigen la organización del citoesqueleto de actina para inducir cambios en la morfología y el movimiento celular, lo que requiere la formación de estructuras como lamellopodios y filipodios en la periferia celular, y fuerzas contráctiles de actomiosina. Específicamente, Rho controla el ensamblaje de filamentos de actina/miosina para generar fuerzas contráctiles, mientras que Rac y Cdc42 promueven la polimerización de actina en la periferia celular para generar fuerzas protrusivas que conducen a la formación de extensiones aplanadas de la célula que le permiten moverse o adherirse a una

superficie, y que son conocidas como lamellipodios. O bien, pueden generar filopodios, que son proyecciones citoplasmáticas largas, delgadas y afiladas que forman adhesiones locales que le permiten a la célula migrar o afianzarse a una superficie <sup>98,99</sup>.

La familia de proteínas Rho y Rac pueden también participar, río abajo de Fz/Dvl, en una vía distinta mediante la cual modulan respuestas nucleares, y pueden influir en las adherencias entre células o entre células y la matriz extracelular a través de las cinasas JNK/p38 MAPK (del inglés: “p38 mitogen-activated Protein kinases”) y los factores de transcripción Fos y Jun, que también generan cambios en el citoesqueleto <sup>100</sup>. Aunado a lo anterior, la organización polarizada del citoesqueleto de actina que resulta en cambios de la forma celular y permite el movimiento de las células, puede también ser modulada a través de la activación de otros factores de transcripción dependientes de JNK, como el factor de transcripción ATF2 (del inglés: “activating transcription factor 2”) y la concomitante activación de sus genes blanco <sup>92,94</sup>. Como se ha mencionado, los efectos que desencadenan las actividades de las GTPasas Rho y Rac en la vía no canónica son numerosos, entre ellos: el ensamblaje de F-actina, la organización de los microtúbulos, las cascadas de MAP cinasas (MAPK), y las adhesiones intercelulares o de las células con la matriz extracelular, u otros <sup>98</sup>.

Además de sus efectos sobre el citoesqueleto, la activación de esta vía no canónica ejerce un efecto antagónico sobre la vía Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina. La interferencia entre dichas vías puede ocurrir a través de distintos mecanismos, entre ellos, a nivel de ligando y receptor, ya que ligandos que activan preferentemente una u otra vía podrían competir por el mismo receptor. Por ejemplo, Wnt5a, que preponderantemente activa la vía PCP podría competir con, e inhibir, la unión del ligando “canónico” Wnt3 con el receptor Fz2, imposibilitando, por tanto, la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina <sup>43</sup>.

En contraparte e inesperadamente, trabajos experimentales recientes han identificado la participación de las GTPasas en la señalización Wnt canónica, independientemente de los cambios que pueden ejercer sobre el citoesqueleto de actina. Los resultados de estos trabajos indican que la activación constitutiva de Rac-1 podría potenciar la transcripción  $\beta$ -catenina/TCF, al facilitar la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina, por una secuencia similar a la de importación nuclear, cercana a su terminal carboxilo <sup>101</sup>. Además, la activación de JNK mediada por Rac-1, induce la fosforilación de  $\beta$ -catenina en dos sitios específicos que promueven su localización nuclear <sup>102</sup>. En conjunto, esto indica que podría existir una superposición entre los componentes de las vías canónica y no canónicas, río abajo de

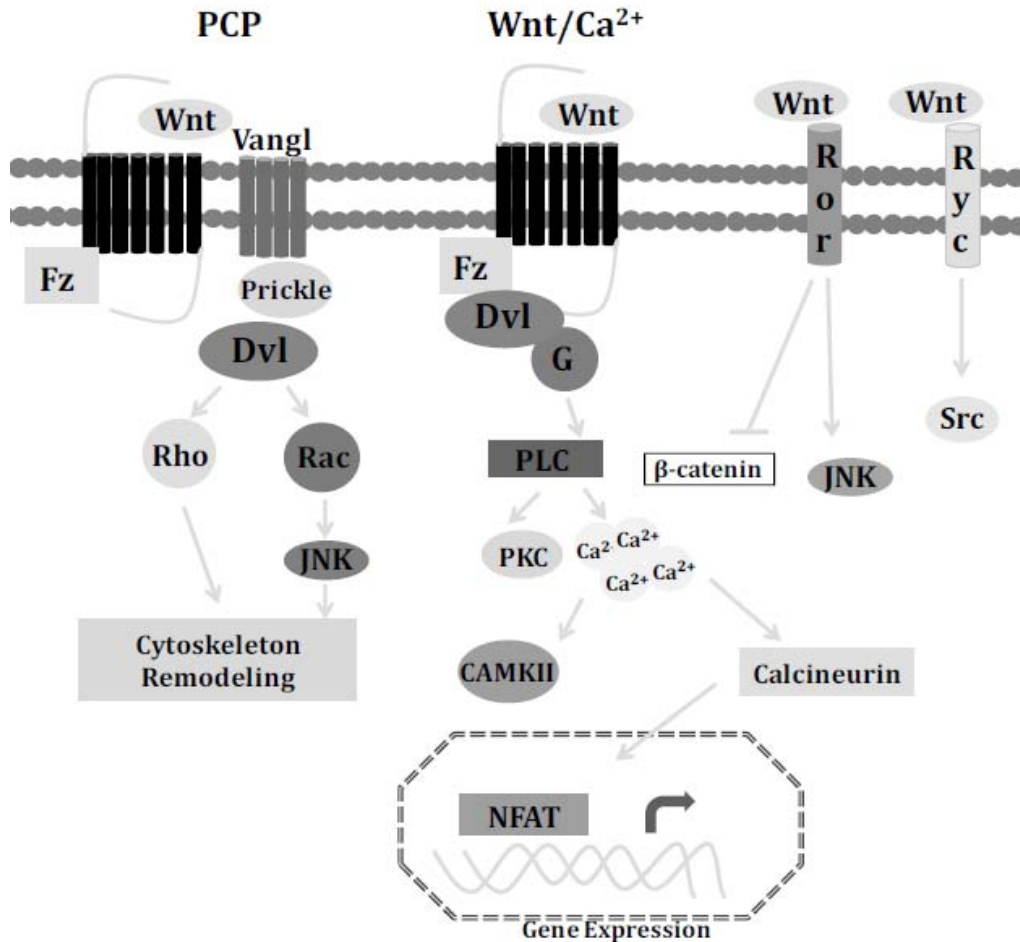
Fz/Dvl, que están involucrados en el control de la polaridad de los microtúbulos, evidenciado, una vez más, la complejidad y versatilidad de las vías de señalización a las que dan lugar los ligandos Wnt y sus componentes asociados, como las GTPasas.

## 2) Vía Wnt/Ca<sup>2+</sup>

Una segunda vía Wnt no-canónica es la vía conocida como “Wnt/Ca<sup>2+</sup>”. Su activación se da a partir del acoplamiento de ligandos Wnt específicos con sus respectivos receptores Fz, lo que desencadena la activación de proteínas G mediada por receptores Fzs que, a su vez, resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC del inglés: “phospholipase C”) localizada en la membrana plasmática, la cual actúa sobre el fosfolípido PIP2 (del inglés: “phosphatidyl inositol 4, 5-biphosphate”) para generar DAG (del inglés: “1,2, diacylglycerol”) e IP3 (del inglés: “Inositol-1, 4, 5-triphosphate”) <sup>93</sup>. El incremento en los niveles de segundos mensajeros induce a una alteración rápida en la función celular. IP3 se difunde a través del citosol e interactúa con los canales de calcio presentes en la membrana del RE. Así, la activación de IP3 resulta en la liberación de los iones de Ca<sup>2+</sup> concentrados en este reservorio intracelular y, por tanto, en el incremento de los niveles intracelulares de dicho catión. El Ca<sup>2+</sup> junto con la proteína calmodulina, expresada ubicuamente, activan a la proteína CamKII (del inglés: “Calmodulin-dependent protein kinase II”). Mientras que, el Ca<sup>2+</sup> y el DAG producido por la hidrólisis del PIP2, activan a isoformas de la proteína cinasa PKC <sup>93,103,104</sup>. Tanto CamKII como PKC pueden activar a proteínas reguladoras como: NF-κB (por: “NF-KappaB”) y CREB (del inglés: “cAMP-response element-binding protein”) que son factores de transcripción nucleares involucrados en procesos como la determinación del destino celular y la migración celular durante el desarrollo embrionario, o en enfermedades como las neurodegenerativas, la respuesta inflamatoria y el cáncer <sup>93</sup>. De manera similar, los iones de Ca<sup>2+</sup> movilizados del RE por IP3, pueden activar a la proteína calcineurina (CNA) que, a su vez, puede activar a la proteína citoplásmica NF-AT (del inglés: “nuclear factor associated with T cells”) por desfosforilación. Una vez activa, NF-AT puede incrementar la expresión de varios genes en neuronas, células musculoesqueléticas y cardiacas, así como genes pro-inflamatorios en linfocitos <sup>105,106</sup>.

Por otra parte, y de manera similar a la vía de la PCP, la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> puede regular de manera negativa a la vía Wnt canónica ejerciendo un efecto antagónico. Más aún, adicionalmente a las vías independientes de β-catenina descritas, existen eventos río abajo

generados por la señalización Wnt-Fz y determinados correceptores, que son tejido-específicos y no corresponden a estas categorías de vías no canónicas <sup>107</sup>.



**Figura 3. Vías de señalización Wnt no canónicas o independientes de  $\beta$ -catenina** En la vía **Wnt/PCP**, el reclutamiento de Dvl dependiente de la interacción Wnt-Fz activa a proteínas GTPasas pequeñas, como Rho y Rac que, a continuación, pueden activar a las cinasas ROCK y JNK que pueden modificar la estabilidad del citoesqueleto o translocarse al núcleo. En la vía **Wnt/Ca<sup>2+</sup>**, la señalización de Dvl estimula río abajo a proteínas G triméricas y a la enzima fosfolipasa PLC, la cual, incrementa la producción de DAG e IP<sub>3</sub>. Este último induce la liberación del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Como consecuencia, las proteínas dependientes de Ca<sup>2+</sup> como PKC y CAMKII, son activadas. Además, el Ca<sup>2+</sup> puede activar a la proteína calcineurina (CNA) que regula la expresión de genes mediante el factor de transcripción NF-AT. Los ligandos Wnt pueden también interactuar con otros receptores como Ryk, Ror u otros. (Figura tomada de <sup>90</sup>).

#### *Ligandos Wnt “no-canónicos”*

Como se ha mencionado, no es preciso clasificar a los ligandos Wnt como “canónicos” o “no-canónicos”, sin embargo, algunos ligandos activan preferentemente una u otro tipo de vía de señalización Wnt. Entre las proteínas Wnt que parecen señalizar a través de las vías no

canónicas de Wnt se encuentran: el ligando Wnt7a que parece estar involucrado en algunos aspectos de la PCP en mamíferos durante el desarrollo del oído interno <sup>108</sup> o los ligandos Wnt5a, Wnt4 y Wnt11, cuya sobreexpresión produce un incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular o un aumento en la activación de CAMKII y PKC <sup>109</sup>.

En particular, Wnt5a es uno de los ligandos de la familia de proteínas Wnt que en varios estudios se ha identificado como activador de la vía no-canónica. Así pues, Wnt5a podría considerarse como prototipo de la transducción de señales de la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> pues, se ha demostrado que este ligando puede activar la señalización por calcio en presencia de los receptores Fz2, 3, 4, 5 y 6 <sup>104,110,111</sup>. No obstante, Wnt5a puede también activar la vía que induce la transducción de genes blanco Wnt mediada por  $\beta$ -catenina en presencia de los receptores Fz5 o Fz4 junto con LRP5 <sup>112,113</sup>. Aunado a lo anterior, Wnt5a puede también acoplarse a otras proteínas como los receptores tirosina cinasa como Ror1/2, mediante los cuales activa la transducción de señales por la vía no-canónica, Ca<sup>2+</sup>/ CamKII, que tiene funciones primordiales en la guía axonal en el cerebro de mamíferos <sup>15,44,114</sup>. Por otra parte, Wnt5a puede participar en el establecimiento de la PCP y regular el desarrollo de extremidades al inducir la fosforilación de Vangl2 (VANGL Planar Cell Polarity Protein 2) luego de la activación del receptor Ror2 <sup>115</sup>.

#### *2.1.4. Moduladores negativos de la actividad de Wnt*

La actividad de la familia de glicoproteínas secretadas Wnt puede ser modulada a diferentes niveles por una amplia gama de efectores que funcionan como agonistas o antagonistas, actuando, intracelularmente modulando componentes de vía de señalización o, extracelularmente, regulando las interacciones ligando-receptor-correceptor. La función tanto de los agonistas como los antagonistas es de gran relevancia, ya que modulan la señalización dada por los ligandos Wnt, induciendo o bloqueando así mismo, los procesos biológicos en los que participa esta vía de señalización.

La señalización Wnt puede ser regulada por una amplia gama de proteínas que pueden actuar intracelularmente afectando la transducción de la señal (p.e. los receptores de Wnt pueden ser regulados intracelularmente por mecanismos de fosforilación) o, extracelularmente, tanto los receptores como los ligandos, pueden ser modulados por activadores como Norrin y la familia R-spondin (Rspo), que promueven el acoplamiento de Wnt a sus receptores o evitan algún mecanismo que conlleve a la inhibición de la señalización Wnt; o bien, pueden ser

modulados por inhibidores que pertenecen a familias de proteínas pequeñas, incluyendo: Dkk-1, SFRP, WIF-1, Wise/SOSTDC1 (del inglés: “sclerostin domain-containing 1”), también conocido como Ectodín o USAG-1 (del inglés: “uterine sensitization-asociated gene-1”), Cerberus, IGFBP-4 (del inglés: “insulin-like growth-factor binding protein 4”), u otros cuatro inhibidores transmembranales: Shisa, Waif1/5T4 (del inglés: “Wnt-activated inhibitory factor 1”), APCDD1 (del inglés: “adenomatosis polyposis coli down-regulated”) y Tiki. Dichos inhibidores tienen como característica en común antagonizar la señalización Wnt al interferir en las interacciones ligando-receptor o en la maduración de los receptores Wnt. Estas familias de proteínas no están relacionadas entre ellas y, además, algunas actúan específicamente sobre la vía Wnt canónica, mientras que otras, afectan tanto la vía canónica como las vías Wnt no canónicas<sup>39,116</sup>.

Entre los antagonistas endógenos de la señalización Wnt que previenen las interacciones ligando-receptor, hay dos principales cuyos mecanismos de acción son distintos. Uno de ellos pertenece a la familia de proteínas SFRP, las cuales se acoplan a las proteínas Wnt previniendo su interacción con el receptor. Otro tipo de antagonistas comprende a ciertos miembros de la familia Dkk, los cuales se unen al componente LRP-5/LRP-6 del complejo receptor de Wnt. De tal manera que, los antagonistas SFRP inhiben todas las vías Wnt, canónica y no canónicas, mientras que los antagonistas Dkk inhiben específicamente a la vía canónica<sup>117</sup>.

### La familia SFRP

Las SFRPs son una gran familia de proteínas solubles, estructuralmente relacionadas al CRD de los receptores Fz. Los CRDs de las SFRPs se encuentran en el extremo N-terminal, muestran del 30-50% de similitud en su secuencia con aquellos de los receptores Fz, y contienen diez residuos de cisteína conservados<sup>118</sup>. En humanos, la familia de proteínas SFRPs está constituida por cinco miembros, SFRP1 a SFRP5; con SFRP3 siendo el ortólogo del primer miembro descrito: Frzb (por el motivo Frizzled asociado con el desarrollo óseo; del inglés: “bone”). Las SFRPs inhiben la señalización Wnt al unirse competitivamente a los ligandos, previniendo así, su acoplamiento con los complejos de receptores activos<sup>116,117</sup>. Además, las SFRPs pueden acoplarse a los receptores mediante la dimerización de sus CRDs homólogos y, a concentraciones bajas y bajo ciertos contextos celulares, pueden activar la señalización Wnt<sup>119</sup>. Por otra parte, y aunado a su función como inhibidores de las vías Wnt



canónica y no canónica, los SFRPs pueden regular otras vías de señalización, además de proveer información para la guía axonal, interactuar con otros receptores o moléculas de la matriz extracelular y participar en la homeostasis de tejidos <sup>120-124</sup>.

El patrón de expresión de los SFRPs es variable a través del tiempo. Las SFRPs individuales pueden expresarse de manera parcialmente simultánea, que puede ser complementaria a la expresión de algunas proteínas Wnt, sugiriendo que en algunos casos hay cierta redundancia en su actividad como inhibidores de Wnt. En otros casos, su expresión parece ser independiente de la distribución de las proteínas Wnt. Y además, su expresión está alterada en diferentes tipos de cáncer y en patologías óseas <sup>47,125-127</sup>.

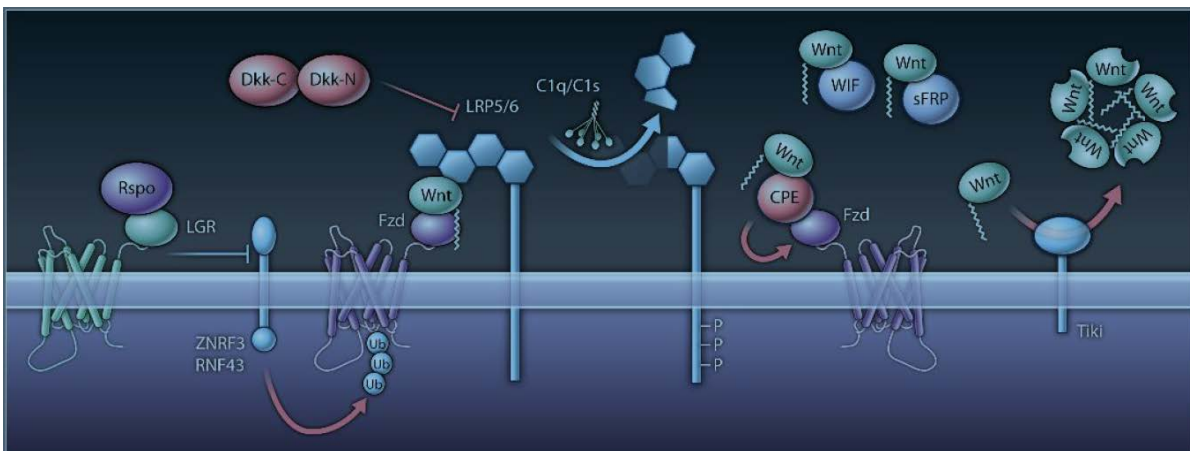
### La familia Dickkopf

La familia de glicoproteínas secretadas Dkk está constituida por cuatro miembros, Dkk-1 a Dkk-4; con Dkk-3 que parece ser un miembro divergente que comparte homología en su secuencia con Soggy (Sgy; también conocido como: “Dickkopf-like protein 1, Dkk11) un miembro distante de la familia Dkk <sup>128</sup>. Las proteínas Dkk consisten en 255-350 aa, con dos CRDs conservados. Mientras que el CRD amino-terminal (Dkk\_N) es único a los Dkk, el CRD carboxilo-terminal muestra homología con un dominio encontrado en una amplia gama de proteínas funcionalmente no relacionadas. Dkk-1 es uno de los inhibidores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mejor caracterizados. Además de que, por sí mismo, Dkk-1 es un gen diana de esta vía de señalización, estableciendo, por tanto, una retroalimentación negativa <sup>129-131</sup>.

Dkk-1 se acopla al correceptor LRP-5/-6, inhibiendo así la activación de la vía Wnt y con ello la estabilización y la transcripción dependiente de  $\beta$ -catenina/Tcf <sup>132-134</sup>. Además de unirse a LRP-5/-6, Dkk-1 se acopla con alta afinidad a Kremens 1 y 2 (Krm1/2), otra clase de receptores de un solo dominio transmembranal, que potencia la habilidad de Dkk-1 para inhibir la señalización Wnt <sup>135</sup>. El mecanismo dominante por el cual Dkk-1 actúa es previniendo la interacción Wnt-LRP-5/-6, interrumpiendo así la formación del complejo Fz-LRP-5/-6 inducida por Wnt <sup>134</sup>. Además, cuando Krm está presente, Dkk-1 forma un complejo ternario con Krm2 y LRP-5/-6 e induce la endocitosis y la remoción de LRP-5/-6 de la membrana plasmática <sup>135</sup>. La internalización de LRP-5/-6 mediada por Krm y Dkk-1 inhibe el reclutamiento de la proteína Axina a la membrana plasmática lo que favorece la degradación del efector transcripcional de la vía Wnt Wnt canónica,  $\beta$ -catenina, regulado por el complejo de destrucción, del cual Axina es uno de los componentes. En general, las proteínas Krm no

se requieren para la función de Dkk-1, sin embargo, esta interacción es fisiológicamente relevante en ciertos tejidos <sup>116</sup>.

En cuanto a otros miembros de la familia Dkk, Dkk-3 no se acopla al correceptor LRP-5/-6, ni los receptores Krm se acoplan a Dkk-3, por lo que este miembro de la familia no afecta la señalización Wnt. En contraste, se sabe que Dkk-2 tiene la capacidad de actuar como inhibidor o activador de la vía Wnt, dependiendo del contexto celular <sup>116</sup>. Por otra parte, se han descrito más funciones de Dkk-1, entre las cuales está su papel como modulador durante el desarrollo, en procesos como la formación de los huesos, los ojos y las extremidades, en el último de los cuales, Dkk-1 puede controlar diferentes pasos de la señalización de ligandos Wnt-3a y Wnt7a durante el desarrollo de las extremidades en el ratón. En contraparte, se han observado alteraciones en la expresión de Dkk-1 en varios modelos de cáncer y en procesos de neurodegeneración e inducción de apoptosis por daño neuronal <sup>116,136-138</sup>.



**Figura 4. Señalización Wnt en la membrana: agonistas y antagonistas Wnt.** La ubiquitina E3 ligasa de un solo dominio transmembrana ZNRF3 y su homólogo RNF43 poliubiquitan a Fzd, promoviendo así la internalización del complejo del receptor Wnt y regulando negativamente la abundancia de Fz y de los coreceptores LRP5/6 en la superficie celular. Rspodin (Rspo) se une a receptores LGR (del inglés: “leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors”) y a ZNRF3 y media la eliminación de ZNRF3 en la membrana. Las proteínas Wnt se unen tanto a Fz como a LRP. La interacción entre Fz y Wnt está, al menos en parte, mediada por la modificación lipídica de la proteína Wnt. Las proteínas Dkk compiten con los ligandos Wnt por la unión a LRP5 / 6, probablemente a través de distintas interfaces C-terminal (Dkk-C) y N-terminal (Dkk-N). Un complejo de complemento que consiste en C1q y C1s se une a Fzd (no representado) y corta LRP6, lo que lleva a la fosforilación de LRP y la acumulación de  $\beta$ -catenina. La carboxipeptidasa E (CPE) se une a Wnt y Fzd y regula negativamente la señalización de  $\beta$ -catenina a través de un mecanismo que aún no está completamente caracterizado. Factores solubles, como las proteínas SFRP y WIF interactúan directamente con los ligandos Wnt y, se cree, que los retienen. La proteasa ligada a la membrana, Tiki escinde las proteínas Wnt, lo que induce la agregación de Wnt en oligómeros solubles en agua. Las interacciones o reacciones que finalmente regulan negativamente la señalización Wnt/  $\beta$ -catenina se indican en rojo, mientras que las acciones de activación se muestran en azul. Figura tomada de <sup>139</sup>.

## 2.2. Vía Wnt y sus efectos sobre Sistema Nervioso

La señalización mediada por miembros de la familia de proteínas Wnt, que se diversifica en las vías: Wnt/  $\beta$ -catenina, Wnt/PCP y Wnt/ $Ca^{2+}$ , y sus respectivos componentes, son reguladores importantes de la comunicación celular y son cruciales para el desarrollo embrionario normal en varios sistemas, incluyendo el sistema nervioso. La vía Wnt modula de manera importante: el desarrollo del cerebro, la espina dorsal y la extensión de subpoblaciones de neuronas sensoriales y motoras, así como los procesos de apoptosis temprana y tardía en distintas poblaciones celulares. En particular, durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), la señalización Wnt está implicada en: el establecimiento de patrones del eje anteroposterior, la especificación del tipo celular, la proliferación celular y el crecimiento axonal <sup>140-150</sup>.

Durante el desarrollo, las proteínas Wnt regulan el patrón de áreas telencefálicas específicas, como el hipocampo, a lo largo del eje dorsoventral. Proteínas Wnt como: Wnt2b, Wnt3a, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b y Wnt8b, junto con sus receptores y antagonistas, se expresan en el área que rodea la fimbria, una estructura que es crítica para la formación del hipocampo <sup>145,151</sup>. No obstante, *Wnt3a* es el único que se expresa exclusivamente en la fimbria, lo que resalta su importancia en el desarrollo del hipocampo. En este sentido, análisis de ratones mutantes de *Wnt3a*<sup>-/-</sup> y *lef1*<sup>-/-</sup> revelan la pérdida de la región hipocampal <sup>143,145</sup>. Y, de manera similar, un mutante condicional de  $\beta$ -catenina, en el cual  $\beta$ -catenina es deletado específicamente en el telencéfalo dorsal, también muestra defectos en la formación del hipocampo. En estos modelos no se encontraron afectadas ni la sobrevivencia ni la diferenciación celular, en contraste, se encontró un decremento en la proliferación de un conjunto de células precursoras que generan el hipocampo. Dichos hallazgos indican que la señalización Wnt canónica participa en la formación del hipocampo, posiblemente a través del control de la determinación del destino celular y la coordinación de la proliferación celular <sup>152,153</sup>.

### 2.2.1. Función de Wnt en el desarrollo de axones y dendritas

Además de su función durante la especificación de patrones y la modulación del destino celular durante el desarrollo embrionario, hay evidencias del papel de la señalización Wnt en la formación de conexiones neuronales, que resultan de la especialización morfológica de las neuronas y la participación de células no neuronales, lo que, en conjunto, permite el funcionamiento adecuado del sistema nervioso.

Las neuronas son células altamente polarizadas, característica que permite el flujo

unidireccional de la información <sup>154</sup>. Luego de su nacimiento, estas células nerviosas experimentan un proceso de diferenciación con el cual se generan dos compartimentos: los axones y las dendritas, los cuales tienen composiciones moleculares, morfologías y funcionamientos claramente distintos. La polarización está controlada por factores intrínsecos y programas de expresión génica, pero también, por moléculas que provienen de la matriz extracelular y que actúan como reguladores potenciales de la formación y el mantenimiento de las sinapsis. Entre las moléculas que funcionan como factores extracelulares que participan en la diferenciación inicial, el crecimiento y la conducta de los axones y las dendritas, están distintos miembros de la familia Wnt.

En mamíferos, Wnt tiene una función relevante en el crecimiento y la remodelación axonal. En el cerebelo, por ejemplo, los ligandos Wnt modulan la dinámica de los axones. Más específicamente, en el cerebelo del ratón, *Wnt7a* se expresa en las células granulares en el momento en el que sus aferencias: las fibras musgosas, establecen contactos con ellas. La interacción entre ambos tipos celulares induce cambios notables en la morfología de las fibras musgosas como: el incremento en el diámetro axonal, la extensión de áreas a lo largo del eje axonal y el incremento en la complejidad del cono de crecimiento. Inversamente, en análisis ultraestructurales del cerebelo de ratones mutantes de *Wnt7a* se observa afectada la remodelación axonal. Mientras que, la adición de Wnt7a incrementa la remodelación de los axones de las fibras musgosas. Evidencias que sugieren la participación de Wnt7a como señal retrógrada en la guía y la remodelación axonal previo a la formación de sinapsis en el cerebelo <sup>155</sup>. De manera similar, en neuronas motoras la proteína Wnt3a funciona como una señal retrograda que promueve la ramificación axonal y la remodelación del cono de crecimiento en neuronas espinales sensoriales <sup>7,8</sup>. Los efectos inducidos por la expresión de Wnt7a y Wnt3a hacen notable su función como señales procedentes de las células blanco que regulan la arborización de la terminal axonal <sup>6</sup>.

Por otra parte, la señalización inducida por Wnt5a es importante para el crecimiento y la ramificación axonal que depende del factor neurotrófico NGF (del inglés: “Nerve growth factor”). Pues, además de que NGF promueve la expresión de Wnt5a en las neuronas simpáticas, Wnt5a funciona como un efector río abajo de NGF para el desarrollo de neuronas simpáticas mediante la activación local de PKC. En contraparte, las neuronas de ratones nulos (*knockout* o KO) para Wnt5a muestran deficiencias en el desarrollo axonal que depende de NGF <sup>156</sup>.

Aunado a lo anterior, existe evidencia de que Wnt induce la remodelación del axón mediante cambios en la organización y la dinámica del citoesqueleto, ya que, la exposición a distintas moléculas Wnt o la expresión de Dvl, el primer efector río debajo de la señalización Wnt, incrementan la desagregación y estabilidad de los microtúbulos. Dvl puede regular la extensión de neuritas mediante la modulación de la estabilidad de los microtúbulos. En los axones, un conjunto de proteínas Dvl puede acoplarse a los microtúbulos, afectar su dinámica y, además, puede protegerlos de la despolimerización inducida por nocodazol<sup>157-159</sup>. Otros estudios han mostrado que Dvl es un regulador clave de la remodelación neuronal. En células de neuroblastoma 2A (N2A), por ejemplo, la expresión de Dvl1 promueve el crecimiento de neuritas e induce la diferenciación de estas células, un efecto que depende de su dominio DIX<sup>160</sup>. Más aún, Dvl puede promover la diferenciación axonal al regular directamente a aPKC (del inglés: “atypical PKC”) en neuronas hipocampales en cultivo, en las que, la regulación negativa de Dvl abole la diferenciación axonal, la sobreexpresión induce la formación de múltiples axones, y la expresión de un dominante negativo de aPKC previene el efecto de Dvl. Adicionalmente, Dvl puede formar un complejo con las proteínas PAR: PAR3, PAR6 y aPKC, que conduce a la estabilización y activación de aPKC. Además, el tratamiento con Wnt5a puede inducir la activación de aPKC y promover la diferenciación del axón de neuronas hipocampales en cultivo<sup>161</sup>.

Existen evidencias de que Wnt, mediante los componentes asociados a su señalización, como Dvl, puede modular el citoesqueleto y participar en la diferenciación neuronal inicial al señalar a través de una vía canónica en la que inhiben a GSK-3 $\beta$ , lo que, a su vez, cambia el estado de fosforilación de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs, del inglés: “microtubule-associated proteins”) que son blancos directos de dicha cinasa. Entre ellas están: MAP1B, tau y MAP2, que se expresan en las neuronas en desarrollo donde funcionan como estabilizadores de los microtúbulos al modular su dinámica y organización<sup>162</sup>. APC, es otra de las proteínas que pueden ser fosforiladas directamente por GSK-3 $\beta$ , y la cual, además de ser uno de los componentes del complejo de destrucción en la vía de señalización Wnt canónica, es una proteína de unión al extremo positivo creciente de los microtúbulos que se acumula en el cono de crecimiento<sup>163</sup>. Durante la remodelación del axón, Wnt3/3a señala mediante Dvl para inhibir a GSK-3 $\beta$ , que resulta en la pérdida de APC en el extremo positivo de los microtúbulos, lo que genera una pérdida de la direccionalidad del crecimiento de los microtúbulos, y la subsecuente formación de microtúbulos en bucle dentro del cono de

crecimiento<sup>8</sup>. Por lo que, la fosforilación de APC por GSK-3 $\beta$ , altera su función como modulador en la dinámica de microtúbulos al modificar su capacidad para acoplarse a estos.

Aunado a lo anterior, se ha visto que las alteraciones en la organización de los microtúbulos mediadas por Wnt podrían generar cambios en la dinámica axonal. Diversos estudios han propuesto que la señalización Wnt podría regular la dinámica del axón mediante cambios en la direccionalidad del crecimiento de los microtúbulos causada por una disminución en los niveles de APC en el extremo positivo de éstos, pues se ha visto que en presencia de Wnt, los microtúbulos forman bucles en los conos de crecimiento axonales de células granulares<sup>6-8,164</sup>. Los microtúbulos en bucle son un mecanismo estructural que permiten la captura de moléculas necesarias para la diferenciación presináptica y la transformación del cono de crecimiento móvil en un botón terminal presináptico<sup>165</sup>.

De manera similar a la regulación de la arborización de las terminales axónicas, el desarrollo y refinamiento del árbol dendrítico es un proceso altamente dinámico que requiere también de una fina regulación mediada por mecanismos moleculares y celulares, de forma que, cada neurona adquiere un patrón dendrítico preciso a través de rearrreglos en el citoesqueleto mediados por la activación de vías de señalización que pueden cambiar la actividad, localización y estabilidad de factores reguladores del citoesqueleto<sup>166-169</sup>.

Entre las moléculas que pueden regular el crecimiento y la morfogénesis de las dendritas neuronales están las proteínas Wnt que modulan la arquitectura de los árboles dendríticos mediante la activación de distintas vías de señalización o algunos de sus componentes asociados. Entre ellos, la proteína  $\beta$ -catenina, constitutivamente activa, parece modular de manera importante la morfología dendrítica pues, su sobreexpresión incrementa la arborización dendrítica en neuronas hipocampales mediante un mecanismo independiente de la transcripción de genes que involucra su interacción con proteínas asociadas a procesos de adhesión celular como: N-cadherina (cadherina neural) y  $\alpha$ N-catenina (catenina neural). En contraparte, la captura de la proteína  $\beta$ -catenina endógena resulta en una disminución de la complejidad dendrítica inducida por la actividad neuronal [despolarización con una concentración alta de potasio ( $K^+$ )]. De manera similar, el tratamiento con el antagonista extracelular de Wnt, Dkk-1, bloquea el efecto en la dendritogénesis producida por la despolarización con una concentración alta de  $K^+$ , sugiriendo que la actividad neuronal regula la expresión y la liberación de Wnt y que los niveles endógenos de  $\beta$ -catenina son importantes para la inducción y regulación de la arborización dendrítica mediada por Wnt<sup>170</sup>.

Aunado a lo anterior, se ha observado que la actividad neuronal incrementa la expresión de Wnt2, el cual estimula la arborización dendrítica en neuronas hipocampales durante el desarrollo, además de que, el crecimiento y la ramificación de las dendritas que dependen de la actividad en cultivos de neuronas hipocampales, es mediado por la activación de la vía de señalización dependiente de  $Ca^{2+}$  <sup>171</sup>.

Por su parte, *Wnt7b* que se expresa en el hipocampo de ratón, ha mostrado participar en el incremento de las arborizaciones dendríticas durante la dendritogénesis. Efecto que es mimetizado por la expresión de Dvl, y que es crucial para el desarrollo de dendritas pues, en ratones mutantes de Dvl1, se ha visto que las neuronas hipocampales desarrollan dendritas más cortas y menos complejas en comparación con los ratones silvestres. Estos efectos parecen estar mediados por la vía Wnt no-canónica, pues ni la inhibición de GSK-3 $\beta$  o el dominante negativo de  $\beta$ -catenina bloquean la función de Dvl en la dendritogénesis. Por el contrario, se ha encontrado que, en neuronas hipocampales, Dvl se asocia con la GTPasa pequeña Rac, que puede ser activada por Wnt7a y Dvl. Mientras que, la expresión de un dominante negativo de Rac bloquea la función que Dvl ejerce en las dendritas. Aún más, la inhibición de la vía Wnt por Sfrp1 disminuye la activación de Rac desencadenada por Wnt7a, lo que bloquea su efecto sobre el desarrollo dendrítico el cual, además, se ha demostrado estar mediado por la señalización de JNK. Así, la inhibición de JNK bloquea la función de Dvl en las dendritas, mientras que su activación inducida farmacológicamente, aumenta el desarrollo dendrítico <sup>159</sup>. De esta manera, la señalización Wnt/Rac/JNK puede modificar la morfogénesis de las dendritas a través de cambios en el citoesqueleto neuronal.

En conjunto, estos datos demuestran que los factores Wnt y sus efectores modulan positivamente el desarrollo y el crecimiento de los axones y las dendritas mediante cambios en la dinámica del citoesqueleto, afectando su organización y estabilidad para el establecimiento de la polaridad neuronal.

### *2.2.2. Función de Wnt en la formación de sinapsis*

El arreglo polarizado de las neuronas les permite funcionar de manera que las señales electroquímicas se propagan y se reciben en sitios específicos, de manera que, una neurona madura tiene una arquitectura distintiva en la que un axón distal, largo y ramificado, transmite la señal, mientras que, un árbol dendrítico muy complejo y con un patrón determinado recibe e integra las señales. Tanto la polarización como la maduración neuronal están controlados

por programas genéticos intrínsecos, factores extrínsecos y la actividad neuronal, que en conjunto actúan como reguladores potenciales de la formación y el mantenimiento de las sinapsis.

La formación de sinapsis o sinaptogénesis surge del establecimiento del contacto entre los axones con sus células blanco, un proceso que requiere la coordinación precisa de eventos pre- y post-sinápticos. La señalización Wnt ha mostrado ser uno de los factores que participa en procesos de sinaptogénesis en el SNC al modular el ensamblaje de las regiones pre-y post-sinápticas durante el desarrollo. Estudios en el cerebelo de ratones han mostrado que los axones de las fibras musgosas son notablemente remodelados al contactar con las células granulares, proceso que contribuye a la formación de lo que se conoce como rosetas glomerulares, que son estructuras sinápticas formadas por una fibra musgosa presináptica y varias células granulares postsinápticas <sup>155</sup>. Wnt7a funciona como una señal retrógrada desde las células granulares que induce la diferenciación presináptica en las fibras musgosas, actuando como un factor sinaptogénico pues, durante el proceso de sinaptogénesis, Wnt7a contribuye a la remodelación para el establecimiento de contacto entre ambas células de manera que incrementa el área de contacto induciendo la propagación axonal e incrementando el tamaño y la ramificación del cono de crecimiento, lo que permite la acumulación de proteínas sinápticas. En este sentido, Wnt7a/b y Wnt3/3a incrementan el número de sitios presinápticos excitadores en cultivos de neuronas hipocámpales y estimulan la acumulación de proteínas presinápticas funcionalmente diversas, como: sinapsina I, sinaptofisina, sinaptotagmina, Bassoon, el transportador vesicular de glutamato (vGlut1; del inglés: “vesicular glutamate transporter 1”) y la proteína de vesículas sinápticas SV2 <sup>5,6,164,172-174</sup>. Por el contrario, el bloqueo de la señalización mediada por Wnt con antagonistas como SFRPs o Dkk-1 inhibe la capacidad de Wnt7a/b para inducir el agrupamiento de proteínas presinápticas. Y de manera similar, los ratones con mutaciones que carecen de Wnt7a/b o Dvl1 desarrollan defectos en el agrupamiento de proteínas presinápticas y una maduración sináptica demorada <sup>6,164,173</sup>. Lo que sugiere su participación en el ensamblaje presináptico y la formación de las zonas activas

A pesar de que los efectos generados por Wnt7a/b correlacionan con la estabilización en los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina, no se requiere la expresión de genes blanco Wnt, por lo que, parece que Wnt señala a través de una vía canónica divergente para estimular el ensamblaje presináptico. Además, los factores Wnt incrementan rápidamente el número de



sitios presinápticos funcionalmente activos sin modificar los niveles totales de las proteínas sinápticas, lo que sugiere que Wnt induce el ensamblaje presináptico al promover el reclutamiento de las proteínas y las vesículas sinápticas existentes <sup>164,172</sup>.

A nivel de los receptores en la superficie celular, hay evidencias de que Wnt3a y Wnt7a se acoplan a Fz1 y Fz5, respectivamente, para promover la organización presináptica estimulando el agrupamiento de componentes de la zona activa y de vesículas sinápticas. De manera que, la pérdida de la función de ambos receptores bloquea el ensamblaje presináptico mediado por Wnt <sup>175,176</sup>. Además, Wnt puede modular el ensamblaje presináptico mediante otros receptores. Tal es el caso de Wnt5a, que se acopla a los receptores Ror para inducir el agrupamiento de sinaptofisina en neuronas de hipocampo en cultivo <sup>177</sup>.

La señalización Wnt también tiene funciones relevantes en las dendritas promoviendo el reclutamiento de componentes para el ensamblaje de los sitios postsinápticos en donde, distintas isoformas de Wnt, pueden modular el ensamblaje de sinapsis excitadoras o inhibitoras. Wnt7a estimula la aposición de marcadores pre- y post-sinápticos, y el reclutamiento de PSD-95, una proteína de andamiaje de la densidad postsináptica que consiste en un complejo multiprotéico que interactúa con moléculas involucradas en la regulación de la movilidad del receptores a glutamato y proteínas importantes para la neurotransmisión <sup>174,178</sup>. Además, Wnt7a promueve, exclusivamente, la formación de sinapsis excitadoras sin afectar a las sinapsis inhibitoras, al inducir la formación y el crecimiento de espinas dendríticas, estructuras que, a su vez, reciben estímulos excitadores. Los efectos positivos de Wnt7a en la densidad y maduración de las espinas dendríticas están mediados por un mecanismo dependiente de CamKII pues, en las espinas Wnt7a puede activar rápidamente a CamKII, mientras que, la inhibición de esta cinasa bloquea el efecto inductor de Wnt7a para el crecimiento de las espinas disminuyendo la fuerza sináptica excitadora, lo que podría implicar a la vía Wnt/Ca<sup>2+</sup> en los efectos de Wnt sobre las sinapsis <sup>174</sup>.

La proteína Dvl puede también inducir el crecimiento de espinas postsinápticas. Ratones mutantes para *Wnt7a* y *Dvl1* muestran deficiencias en el número y la morfología de espinas de las regiones CA1 (*Cornu Ammonis 1*) y CA3 (*Cornu Ammonis 3*) del hipocampo, además de que, en ese modelo, hay una reducción en la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas excitadoras miniatura (mEPSCs; del inglés: “miniature excitatory postsynaptic currents”) mediadas por los receptores AMPA <sup>174</sup>.

Por otra parte, se ha reportado que Wnt5a induce la formación transitoria de

protrusiones dendríticas e incrementa el tamaño de las preexistentes, lo que conduce a un incremento neto de espinas dendríticas maduras. Por el contrario, el tratamiento con la región CRD soluble de Fz2 que actúa como un bloqueador de Wnt disminuye la densidad de espinas dendríticas de neuronas en cultivo. Aunado a lo anterior, Wnt5a induce un aumento de  $Ca^{2+}$ , que a su vez induce la fosforilación de CamKII, mecanismo que podría indicar la activación de la vía Wnt/ $Ca^{2+}$ <sup>9</sup>. Todo lo que, en conjunto, sustenta la participación de Wnt en la región postsináptica para la maduración de las espinas.

A pesar de que, a veces se desconoce la fuente de la que provienen los factores Wnt, existe evidencia de que algunos pueden señalar de manera retrógrada o anterógrada para modular la formación y función de las sinapsis. En cerebelo, Wnt7a/b es liberada de las células postsinápticas para modular el ensamblaje y la remodelación presinápticos. Por otra parte, en las sinapsis hipocampales Wnt7a puede actuar bidireccionalmente en los axones y las dendritas, en los que induce el agrupamiento de vGlut1 y la proteína PSD95, respectivamente<sup>6,174</sup>.

De manera similar, Wnt5a actúa como un factor que tiene efectos tanto en las sinapsis excitadoras como las inhibitoras, pues estimula el agrupamiento de PSD-95 a través de JNK en sinapsis excitadoras, y promueve el agrupamiento del receptor GABA<sub>A</sub> (del inglés; “ $\gamma$ -aminobutyric acid type A”) mediante la señalización de CaMKII en sinapsis inhibitoras<sup>10,11</sup>. Además, en cultivos de neuronas hipocampales, el tratamiento con Foxy-5 (hexapeptido formilado), un derivado de la secuencia de Wnt5a que puede mimetizar su actividad, a corto tiempo induce el agrupamiento de PSD-95, y a tiempos más extensos la acumulación de SV2, incrementando con ello, el número total de contactos sinápticos<sup>179</sup>. Todos estos efectos, muestran que Wnt puede señalar a través de sus distintas vías y mediante la activación de varios componentes para coordinar el ensamblaje de ambas regiones de la sinapsis. Además de que puede señalar de manera bidireccional, para coordinar el ensamblaje sináptico, aunque de manera no coordinada y con tiempos distintos de respuesta para una u otra región.

### 2.2.3. *Efectos de Wnt en la función sináptica*

Distintos componentes de Wnt participan en la función presináptica. En neuronas de hipocampo, la activación de la señalización Wnt canónica por la expresión de Wnt3a, modula el reciclamiento y la exocitosis de vesículas sinápticas, incrementando la frecuencia de las mEPSCs a través de un mecanismo que implica la movilización de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular.

Así mismo, en secciones de hipocampo, Wnt-7a incrementa la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP; del inglés: “field excitatory postsynaptic potentials”) en las sinapsis entre CA3-CA1. Además de que, se ha demostrado, que Wnt7a estimula el reciclamiento y acelera la exocitosis de vesículas sinápticas, facilitando con ello, la dinámica de liberación de neurotransmisores <sup>164,172,180</sup>. Consistentemente, se ha visto que Dvl se acopla directamente a la proteína sinaptotagmina que es necesaria para eventos de neurotransmisión, y que, Dvl parece regular la exo- y endo-citosis en células PC12 <sup>181</sup>.

Con el uso de modelos de ratones con mutaciones en *Wnt7a*, *Dvl*, se ha podido demostrar que Wnt7a requiere a Dvl1 para mediar la tasa normal de reciclamiento de vesículas sinápticas pues, la deficiencia de ambos reduce notablemente la frecuencia de las mEPSCs en las sinapsis entre fibras musgosas y células granulares, un indicador de defectos en la liberación de neurotransmisores <sup>164</sup>. Aunado a lo anterior, se ha visto que Wnt7a junto con la proteína APC, participan en la movilización de receptores incrementando el número y el tamaño de agrupamientos del receptor presináptico  $\alpha 7$ -nAChR en las terminales nerviosas de neuronas de hipocampo <sup>10</sup>. Estudios que, en conjunto, demuestran que la señalización Wnt está involucrada en la funcionalidad de los sitios presinápticos.

Por otra parte, se ha demostrado que la vía Wnt tiene también funciones relevantes en la postsinapsis. En secciones de hipocampo, el tratamiento con Wnt5a incrementa la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores de campo (fEPSP; del inglés: “field excitatory postsynaptic potentials”) y aumenta las corrientes sinápticas mediadas por el receptor NMDA (del inglés: “N-methyl-D-aspartate”), alterando la neurotransmisión glutamatérgica y facilitando la inducción de la potenciación a largo plazo o LTP (del inglés: “long-term potentiation”). El incremento en la amplitud de las respuestas del receptor NMDA mediadas por Wnt5a, deriva de una potenciación rápida que depende de PKC, y de una potenciación lenta dependiente de JNK., de manera que, el bloqueo de la señalización Wnt impide la LTP <sup>9,182,183</sup>. Por otra parte, Wnt5a puede asimismo regular las sinapsis inhibitoras al inducir la expresión y el agrupamiento del receptor GABA<sub>A</sub> en la membrana de neuronas hipocámpales, incrementar la amplitud de las corrientes GABAérgicas e inducir el reciclamiento de receptores GABA<sub>A</sub> mediado por la activación de CamKII <sup>11</sup>. Hallazgos que hacen evidente el papel de Wnt en la modulación de ambos tipos de sinapsis, excitadoras e inhibitoras, resaltando la función de esta vía de señalización en el ensamblaje de sitios pre- y post-sinápticos funcionalmente activos.

#### 2.2.4. *Wnt y actividad neuronal*

Además de que se ha demostrado que la señalización Wnt puede regular la diferenciación sináptica mediante la promoción de cambios morfológicos, el reclutamiento de diversas proteínas y componentes de la estructura sináptica, y la modulación de propiedades electrofisiológicas funcionales, existe evidencia de que la actividad neuronal misma puede alterar los niveles de Wnt. En cultivos de neuronas hipocampales jóvenes, la despolarización mediante estimulación tetánica que activa NMDARs, estimula la liberación de Wnt3a que conduce a la activación de la vía Wnt canónica<sup>182</sup>. De manera similar, y también en cultivos de neuronas de hipocampo, Wnt2 es modulado por actividad a través de un mecanismo que requiere la activación de NMDAR y la transcripción mediada por CREB (del inglés: “cAMP response element-binding protein”), lo que promueve la arborización de dendritas<sup>171</sup>.

Por otra parte, se ha visto que la liberación de factores Wnt dependiente de actividad, también afecta la localización de receptores Fz en las sinapsis. En cultivos de neuronas hipocampales, la estimulación de alta frecuencia que induce la LTP, promueve que el receptor para Wnt7a, Fz5, se transloque a la superficie celular y a los sitios sinápticos. Efectos que son bloqueados en presencia de antagonistas SFRPs o del CRD de Fz5 que captura a los ligandos Wnt que son afines a este receptor, lo que, a su vez, previene el ensamblaje de sinapsis mediada por estimulación de frecuencia alta (HFS, del inglés: “High-frequency stimulation”). Esto sugiere que la actividad neuronal promueve la expresión y liberación de algunos factores Wnt necesarios para la movilización de receptores, como Fz5, hacia la superficie celular de los sitios sinápticos. Todo ello resalta la función de la señalización mediada por Wnt-Fz en la formación de sinapsis inducida por actividad, ya sea en neuronas en desarrollo o maduras<sup>176</sup>.

#### 2.2.5. *Función de Wnt en neuronas maduras*

El papel de la señalización Wnt en la transmisión sináptica y la liberación de los ligandos Wnt dependiente de actividad, sugieren que esta vía de señalización modula eventos de neurotransmisión en etapas tardías del desarrollo y en neuronas maduras. En relación con esto, se ha visto que tanto las moléculas Wnt como distintos componentes de su señalización, continúan expresados en el sistema nervioso maduro, lo que sugiere que los ligandos Wnt podrían tener funciones relevantes durante etapas postnatales. Ensayos por *hibridación in situ*, han mostrado que tanto los ligandos Wnt como distintos elementos asociados a su señalización, se expresan en áreas del cerebro adulto como: el bulbo olfatorio, la neocorteza, el

tálamo y la formación hipocampal. Más aún, se ha demostrado que diferentes elementos Wnt están elevados en regiones en donde las neuronas se renuevan constantemente como: el bulbo olfatorio y el GD del hipocampo. Específicamente, en el hipocampo de roedores adultos jóvenes, se expresan ligandos Wnt como: Wnt1, Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a/b, Wnt8b y Wnt11. De entre ellos, la expresión de Wnt2 se restringe a las áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo hasta la tercera semana postnatal, durante el desarrollo de las dendritas. Mientras que, otros como Wnt5a, Wnt7a y Wnt8, se expresan en una de las regiones en donde puede ocurrir la neurogénesis en etapas postnatales, como es el caso del GD <sup>12,171,172</sup>.

También existe evidencia de la expresión postnatal de otros elementos de la vía como los receptores Fz, los cuales se expresan ubicuamente tanto en las células granulares del hipocampo como en la capa de células piramidales del hipocampo, y en la corteza entorrinal, una de las aferencias principales de formación hipocampal y que, al igual que esa región, es crítica para procesos de memoria. El receptor Fz7 se expresa de manera diferencial en distintos momentos postnatales: a P0 en la capa piramidal, a P7 en CA1 y CA3 y, a P20 en CA3 y la corteza entorrinal. Otros receptores como: Fz1, Fz2, Fz8, Fz9 y Fz10 se expresan ubicuamente en la neocorteza y el hipocampo hasta la edad adulta. Y de entre ellos, Fz1, Fz2 y Fz9, se expresan en las regiones neurogénicas como el bulbo olfatorio y el GD <sup>12</sup>. Los patrones de expresión de distintos componentes de Wnt en distintas áreas del cerebro, en especial aquellas involucradas en procesos de memoria, como el hipocampo, y las consideradas como nichos neurogénicos, como el GD, hacen notar la función potencial de Wnt en el sistema nervioso maduro en procesos cognitivos superiores que dependen de actividad y de procesos de plasticidad neuronal.

Diferentes estudios han mostrado que Wnt se libera durante la actividad neuronal basal. Por ejemplo, se ha comprobado la secreción de cantidades medibles de Wnt en cultivos de líneas de células hipocampales <sup>170</sup>. Y, en cultivos primarios de neuronas de hipocampo, se ha demostrado una disminución significativa en el número de arborizaciones dendríticas luego del tratamiento con SFRP1 <sup>159</sup>. Además, la aplicación de dicho inhibidor reduce las corrientes basales de NMDA. Y, más aún, inhibidores de otros elementos de la señalización como PKC y JNK, reducen la neurotransmisión glutamatérgica. De manera similar, SFRP1 reduce la amplitud de los fEPSP evocados en secciones de hipocampo <sup>184</sup>. La presencia de Wnt en células en cultivo y secciones de cerebro, así como los efectos negativos de su inhibición, sustentan que estos factores se liberan de manera continua en condiciones normales para

mantener la actividad sináptica basal.

Otros trabajos experimentales evidencian el papel de Wnt en el mantenimiento de conexiones en neuronas maduras pues, el bloqueo de la señalización Wnt con el antagonista Dkk-1 elimina sinapsis previamente establecidas al desensamblar componentes de las estructuras pre- y post-sinápticas de células hipocampales estables. Efecto que se acompaña de una disminución de los sitios de reciclamiento de vesículas sinápticas, y de cambios ultraestructurales como zonas activas presinápticas y densidades postsinápticas más pequeñas<sup>185</sup>. Es así como la vía Wnt parece ser necesaria para el mantenimiento de las conexiones ya formadas o bien, que puede ser parte de los factores que se requieren para preservar la estabilidad de las sinapsis que dependen de actividad.

Hasta el momento, existen pocas evidencias de modelos *in vivo* que respalden la función de la señalización Wnt en los procesos fisiológicos de un organismo adulto. Entre los trabajos que se han realizado, se han encontrado incrementados los niveles de Wnt-7a y Wnt-5 en las células granulares del GD de animales entrenados en una tarea de memoria de tipo espacial como el laberinto de agua de Morris con la plataforma oculta, en comparación con los animales entrenados en la misma tarea, pero con la plataforma visible. Además, los animales entrenados con la plataforma oculta, muestran mayor tiempo de retención de la memoria, evidente hasta los 30 días posteriores a la adquisición de la tarea, periodo que correlaciona con los niveles de expresión elevados de Wnt7a<sup>186</sup>. Aunque no se determinó si el incremento de esta proteína era necesario para que las ratas aprendieran la tarea, esta evidencia sugiere la participación de la señalización Wnt en regiones involucradas con el establecimiento de memorias de tipo espacial a largo plazo. En este sentido, un trabajo que sugiere que los ligandos Wnt son necesarios para procesos de memoria, mostró que la infusión del antagonista de la vía canónica Dkk-1 en la amígdala basolateral de ratas bloquea la evocación de memorias de miedo condicionado cuando se administra en la fase previa al entrenamiento en una tarea de condicionamiento aversivo<sup>187</sup>. En conjunto, estos trabajos indican que, aunado a su importante participación en la regulación del desarrollo y la función sinápticos a través de la formación y maduración de los sitios pre- y post-sinápticos, la señalización de las proteínas Wnt podría participar de manera importante en eventos de plasticidad sináptica necesarios para la regulación de procesos cognitivos y el funcionamiento normal del sistema nervioso adulto.

### 2.2.6. *Wnt* y neurogénesis

Como se ha descrito, la señalización Wnt puede modular los circuitos neurales preexistentes promoviendo cambios en la organización del citoesqueleto que generan modificaciones en la complejidad de las dendritas y los axones, cambios en la eficacia de la transmisión sináptica excitadora e inhibitoria, y alteraciones en el número de sinapsis. Aunado a lo anterior, existen evidencias que sustentan su función en la neurogénesis pues, se ha visto que algunos factores Wnt participan en la modulación de procesos como: la auto-renovación, el mantenimiento y la diferenciación de células progenitoras neurales, en varias especies de mamíferos. La neurogénesis es un evento de plasticidad neuronal que se refiere a la capacidad del cerebro para generar continuamente neuronas nuevas. En el cerebro adulto, este proceso puede ocurrir en dos regiones especializadas o “nichos neurogénicos”: la zona subventricular (SVZ, del inglés: “subventricular zone”) de los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ, del inglés: “subgranular zone”) del GD en el hipocampo <sup>188,189</sup>.

En particular, el hipocampo se ha reconocido como un componente primordial del sistema límbico con funciones en procesos de aprendizaje y memoria principalmente, pero también con importancia biológica en otros procesos como la cognición, la memoria de tipo espacial, la regulación de las emociones, y con una función crucial en la neurogénesis de la SGZ <sup>190,191</sup>. La neurogénesis en el hipocampo adulto de algunos mamíferos se ha relacionado con funciones como el aprendizaje y la memoria, la separación de patrones y la conducta emocional <sup>192-198</sup>.

La neurogénesis es un proceso secuencial estrictamente regulado que implica la activación de las células troncales o progenitoras neuronales quiescentes, la proliferación, diferenciación, especificación del destino neuronal, maduración e integración de las neuronas nuevas a un circuito. Existen factores intrínsecos que coordinan la preservación de un grupo de células troncales neurales y la progresión apropiada de la neurogénesis, lo que requiere un balance entre la auto-renovación, la diferenciación a neuronas y el mantenimiento de las células troncales <sup>199</sup>. Además, la neurogénesis puede ser influenciada por estímulos fisiológicos y patológicos como: el aprendizaje dependiente de hipocampo, la actividad neuronal, la exposición a un ambiente enriquecido, el ejercicio, el estrés, la hipoxia y el envejecimiento <sup>192,200-205</sup>.

En términos generales, durante la neurogénesis en la SGZ, las células precursoras neurales (NSCs; del inglés: “neural-stem cells”), radiales o no radiales, activadas (GFAP+; del

inglés: “Glial fibrillary acidic protein”), dan lugar a los progenitores de amplificación transitoria (células de proliferación rápida) que, luego de un número limitado de divisiones celulares se comprometen a un linaje neuronal generando a los neuroblastos, que son proliferativos y expresan la proteína DCX, los que a su vez, se convierten en neuronas inmaduras que extienden sus dendritas hacia la capa molecular y proyectan sus axones a través del hilus hacia la región CA3. De manera que, progresivamente, las neuronas recién nacidas se diferencian en neuronas granulares maduras y se integran en circuitos hipocampales preexistentes, localizándose principalmente en la capa interna de células granulares del GD, en donde realizarán funciones relevantes para la plasticidad de dicha región <sup>206–208</sup>.

En la SGZ, las NSC originan a las células granulares que están presentes en el límite entre el hilus y la capa de células granulares. Las células de tipo glía radial, que expresan GFAP y extienden un solo proceso radial hacia la capa molecular, se han propuesto ser las células troncales o los precursores indiferenciados que generan las neuronas granulares del giro dentado <sup>188,209,210</sup>. Las neuronas nuevas tienen características morfológicas y de excitabilidad distintas que les permiten tener funciones únicas en la codificación de la memoria y el aprendizaje. Además, en el microambiente circundante constituye un <<nicho>> rico en señales moduladoras y factores de crecimiento que dirigen el desarrollo y la función de las neuronas nuevas tanto en condiciones normales como en patológicas <sup>192,199,204,211–214</sup>. En este sentido, se ha demostrado que Wnt participa en el mantenimiento de las células troncales, la maduración neuronal, el remodelamiento de axones, la morfogénesis dendrítica y la homeostasis de tejidos en adultos <sup>15,38,153,159</sup>.

Células como los astrocitos maduros hipocampales pueden regular la proliferación de células troncales neurales y promover el compromiso de un destino neuronal, mediante la liberación de Wnt3a. Además de que se ha demostrado, que algunos componentes que forman parte de la señalización Wnt se expresan en el GD adulto, y que la expresión de Wnt genera cambios en la neurogénesis <sup>215</sup>. Diversos estudios en animales han mostrado que la manipulación dirigida de la función de miembros de la vía Wnt canónica como: Wnt3a,  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$ , SFRP3 y Dkk-1, puede inducir cambios en la trayectoria de desarrollo de neuronas recién nacidas en el giro dentado y alterar conductas como: la ansiedad, la memoria de trabajo y de tipo espacial, la hiperactividad y la depresión <sup>216–221</sup>. De entre los componentes, los agonistas SFRP3 y Dkk-1, son factores que regulan de manera importante la neurogénesis en el adulto, la ansiedad y algunos procesos cognitivos <sup>216,221</sup>.



Varios estudios han mostrado que, durante la generación continua de neuronas nuevas en el hipocampo adulto, los ligandos Wnt ejercen una modulación fina de las etapas secuenciales que conforman la neurogénesis. De manera que, la señalización Wnt puede mantener la auto-renovación y estimular la proliferación de células troncales neurales mediante Wnt7a o el receptor nuclear TLX (o NR2E1), este último, un regulador importante del mantenimiento y la auto-renovación de células troncales neurales<sup>219</sup>. La delección inducida de *Tlx* induce una reducción notable en la proliferación de las células troncales neurales y la neurogénesis en el giro dentado, e impide selectivamente el aprendizaje de tipo espacial<sup>222</sup>.

La señalización Wnt puede también activar factores esenciales para la generación de células granulares en el hipocampo y el cerebelo como NeuroD1 (del inglés: “Neuronal differentiation 1”), y coordinar de esta manera la transición entre la auto-renovación y la diferenciación del linaje neuronal. En un modelo de ratones cKO (conditional knockout) para  $\beta$ -catenina y *NeuroD1*, se comprobó que la expresión de NeuroD1 mediada por Wnt puede mejorar la sobrevivencia y la maduración de las neuronas nacidas en el adulto<sup>223,224</sup>. Por otra parte, GSK3 $\beta$  es otro elemento involucrado en la regulación de la sobrevivencia y la apoptosis de precursores inmaduros<sup>225,226</sup>. Y, entre los blancos de la vía Wnt canónica, se ha visto que Prox1 (del inglés: “prospero-related homeobox 1 gene”) tiene funciones en etapas específicas de la neurogénesis del hipocampo adulto, región en la que tiene una expresión elevada y se asocia con la señalización TCF/LEF. En el giro dentado del ratón la sobreexpresión de Prox1 aumenta la diferenciación de neuronas recién nacidas<sup>227</sup>.

Durante la neurogénesis en el hipocampo adulto, las neuronas inmaduras migran a la capa de células granulares, extienden sus dendritas a la capa molecular y sus axones hacia la región CA3, para incorporarse a circuitos neuronales existentes. En este contexto, tanto  $\beta$ -catenina como GSK3 $\beta$ , tienen funciones importantes para el desarrollo dendrítico de neuronas nacidas postnatalmente *in vivo* pues, en el giro dentado, las neuronas recién nacidas que carecen de  $\beta$ -catenina muestran un número reducido de dendritas y ramificaciones, no maduran totalmente, ni sobreviven más de un mes luego de su nacimiento.

Por otra parte, la delección de HIF1 $\alpha$  (del inglés: “Hypoxia inducible factor 1 alpha”), que estimula la proliferación de células neuronales troncales durante la hipoxia, puede inducir la disminución del crecimiento dendrítico de neuronas nacidas en el adulto, debido a una reducción de la señalización Wnt. De manera similar, los antagonistas SFRP3 y Dkk-1 regulan el desarrollo de dendritas al modular la vía de señalización Wnt pues, la delección de Dkk-1 y el

modelo KO de SFRP3 causan un incremento en la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas inmaduras. Más aún, la delección inducible de Dkk-1 en el cerebro adulto genera un incremento en la renovación de los progenitores neurales y un incremento en la generación de neuronas inmaduras. Y la delección de SFRP3 en el giro dentado con lentivirus, incrementa la señalización Wnt y la proliferación de progenitores neurales <sup>216,221,226,228,229</sup>. En conjunto, los trabajos experimentales mencionados indican que la señalización Wnt y los componentes asociados desempeñan funciones relevantes no solo durante el desarrollo del sistema nervioso, sino en el cerebro adulto en el que pueden modular el desarrollo de neuronas nuevas, al intervenir de manera crítica en el mantenimiento y la auto-renovación de células troncales neurales, así como en el compromiso y la proliferación de neuronas generadas *de novo*.

#### 2.2.7. *Wnt en enfermedades neurodegenerativas*

Se ha descrito la relación entre la vía de señalización Wnt y distintas enfermedades neurodegenerativas. En el apartado de *Anexos*, se incluye la publicación “*Role of Wnt Signaling in the Control of Adult Hippocampal Functioning in Health and Disease: Therapeutic Implications*” <sup>230</sup>, en donde se detallan aspectos del papel de Wnt en el hipocampo adulto en condiciones fisiológicas y patológicas.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A pesar de que se han descrito las funciones de la señalización Wnt en el establecimiento de los circuitos neuronales y su implicación en la neuroprotección, aún no hay evidencia sobre la relación entre la modulación de la señalización Wnt y los cambios estructurales en regiones como el hipocampo derivados de la exposición crónica *in vivo* a moduladores de la vía. Efectos que podrían tener implicaciones en el tratamiento de distintas condiciones neurodegenerativas para las que se podría considerar a la vía Wnt como un blanco terapéutico. Dado lo anterior, el enfoque del presente proyecto es analizar los efectos de la infusión crónica *in vivo* de dos agonistas, Wnt7a y Wnt5a, y un antagonista, Dkk-1, en la organización de proteínas del citoesqueleto neuronal, el contenido de proteínas asociadas a la sinapsis, el número y la morfología de las sinapsis hipocámpales, la generación de neuronas en el giro dentado y la arquitectura de sus neuritas, así como la correlación entre estos cambios y el rendimiento en conductas asociadas al hipocampo.

### **4. HIPÓTESIS**

- I. La infusión *in vivo* de agonistas y antagonistas Wnt en el hipocampo inducirá cambios en el número y la morfología sináptica, distribución de proteínas de citoesqueleto y formación de nuevas neuronas.
  
- II. La infusión de agonistas Wnt tendrá un efecto positivo en el desempeño de conductas asociadas con el hipocampo (ansiedad y memoria espacial), mientras que el antagonista Dkk-1 tendrá un efecto negativo en el desempeño de las mismas.

### **5. OBJETIVOS GENERALES**

Estudiar los efectos de la aplicación *in vivo* de los agonistas Wnt7a (canónico) y Wnt5a (no canónico) y del antagonista Dkk-1, en el contenido y distribución de proteínas asociadas al citoesqueleto y proteínas sinápticas en el hipocampo, así como en el número de neuronas nuevas en el giro dentado de la rata adulta, y su efecto sobre la conducta de ansiedad y el desempeño en una tarea de memoria espacial.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

### *In vitro*

- Verificar el funcionamiento del sistema de infusión basado en la cánula bilateral conectada a una minibomba osmótica, y la funcionalidad de las proteínas recombinantes, mediante el estudio de la morfología y la organización de las proteínas del citoesqueleto F-actina y  $\alpha$ -tubulina en cultivos de células de neuroblastoma humano diferenciadas.
- Estudiar de la morfología y la organización de las proteínas del citoesqueleto F-actina y  $\alpha$ -tubulina en cultivos de células de neuroblastoma humano diferenciadas para corroborar que las proteínas recombinantes preservan su actividad biológica hasta el final de las infusiones crónicas *in vivo*.

### *In vivo*

- Estudiar el efecto de la infusión crónica de los agonistas Wnt7a, Wnt5a y del antagonista Dkk-1 sobre el contenido y distribución de proteínas asociadas al citoesqueleto: MAP-2, tau total y fosforilada en epítopes específicos.
- Estudiar el efecto de la infusión crónica de los agonistas Wnt7a, Wnt5a y del antagonista Dkk-1 sobre el contenido y distribución de las proteínas presinápticas, sinaptofisina y Bassoon, y postsináptica, PSD-95.
- Estudiar el efecto de la infusión crónica de los agonistas Wnt7a, Wnt5a y de Dkk-1 sobre la ultraestructura sináptica (morfología y número).
- Estudiar el efecto de la infusión crónica de Wnt7a, Wnt5a y de Dkk-1 en el número de neuronas doblecortina positivas en el giro dentado y la arquitectura de sus neuritas.
- Estudiar el efecto de la infusión crónica de los moduladores de la vía Wnt sobre el desempeño en campo abierto y en memoria espacial.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. *Sujetos experimentales*

Se trabajó con ratas Wistar macho adultas de aproximadamente tres meses de edad, con pesos de 250-300 g al momento de la cirugía; las cuales fueron mantenidas en cajas de acrílico en grupos de 3 a 4 ratas por caja, con agua y comida *ad libitum*, bajo un ciclo de 12 h luz-12 h oscuridad invertido (luces apagadas 07:00 h y encendidas 19:00 h).

Todos los animales empleados para el proyecto se manipularon con las precauciones necesarias para disminuir su sufrimiento, y de acuerdo a los lineamientos para investigación en materia de salud en México, así como con la aprobación del comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL; protocolo No.77) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

En la figura 5 se muestra un esquema del protocolo experimental que se llevó a cabo para este trabajo.



**Figura 5. Línea de tiempo del protocolo experimental.**

Cada uno de los procedimientos del protocolo experimental se describe a detalle en las secciones posteriores. RLO: tarea de “Reconocimiento de lugar de Objeto”.

### 7.2. *Cirugía estereotáxica para el implante de cánulas bilaterales e infusión de fármacos.*

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de 1-2% de isoflurano y carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), y se colocaron en el aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) con la barra de la nariz situada a -0.3 mm. En esta posición, se expuso el cráneo para ubicar las coordenadas concernientes al área CA1 del hipocampo: anteroposterior (AP) -3.6; dorsoventral (DV) -3.1 y mediolateral (ML)  $\pm 2.0$ , relativas a bregma. Las coordenadas se basaron en el atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (<sup>270</sup>). De acuerdo a las coordenadas AP y ML se hicieron trépanos para después introducir una cánula con filamentos de 3.5 mm

de longitud y 0.5 mm de diámetro a través de la cual se administraron de manera crónica (11 días *in vivo*) y bilateralmente el vehículo o los diferentes tratamientos (PBS 1X, Wnt-7a 300ng/lado, Wnt-5a 300ng/lado o Dkk-1 200ng/lado) a un flujo continuo de 0.25  $\mu$ L/h mediante el uso de una mini-bomba osmótica Alzet (modelo 2004; Durect Corp., Cupertino, CA) con una capacidad aproximada de 250  $\mu$ L. La minibomba osmótica se colocó subcutáneamente en el dorso de la rata y se conectó con la cánula mediante una sonda de plástico con un diámetro interno de 0.69mm y una longitud de 3.5 cm. La cánula se fijó al cráneo con acrílico dental y tornillos de joyero. Finalmente, se suturó la incisión de la piel, se colocó a los sujetos en su caja-habitación y se les permitió que se recuperaran durante 6 días antes de iniciar su entrenamiento y evaluación en las pruebas conductuales.

### 7.3. Pruebas conductuales

#### 7.3.1 Tarea de reconocimiento de lugar de objeto (RLO)

El paradigma conductual que se describe a continuación es una tarea de memoria espacial modulada por el hipocampo que se basa en dos características de los roedores: la tendencia natural de estos animales a explorar un objeto novedoso y la preferencia innata a investigar un objeto colocado en una ubicación novedosa por sobre un objeto en una ubicación familiar <sup>231</sup>. En general, la tarea se compone de tres fases: una sesión de habituación a la arena de entrenamiento vacía, una fase de adquisición para explorar dos objetos idénticos, y una fase de prueba (evocación) en la que se reubica uno de los objetos en un sitio nuevo dentro de la arena. Se espera que los sujetos se aproximen a los objetos y los exploren observándolos, oliéndolos y/o tocándolos mediante el contacto con sus patas delanteras, vibrisas y nariz. Y que, durante la fase de evocación, los sujetos inviertan más tiempo explorando el objeto en una ubicación novedosa, lo que permite inferir que han notado un cambio en el contexto.

#### *Aparato y objetos*

El aparato o arena para la prueba de RLO consistió en una caja de acrílico negro de 60 cm de largo X 60 cm de ancho y 30 cm de alto, a la que se le colocó en la pared posterior interna, una tira de papel con líneas verticales blancas y negras como pista visual. Los objetos utilizados fueron dos frascos de vidrio de color verde, con forma parecida a un foco (de 12 cm de altura) y rellenos de cemento blanco para evitar su desplazamiento.

### *Prueba conductual*

El desempeño de los sujetos en la prueba de RLO se evaluó durante la fase de oscura del ciclo invertido. Previo a la adquisición y evocación de esta tarea de memoria espacial, se realizó la habituación de los animales, la cual se llevó a cabo a partir del séptimo día después de la cirugía, y consistió en tres sesiones independientes por tres días consecutivos durante las cuales se manipuló a los animales durante 10 min (cada uno), para familiarizarlos con el experimentador. Así mismo, se colocó a los sujetos individualmente dentro de la *arena* durante 10 min, para habituarlos al aparato que se utilizaría para la tarea de RLO. En cada sesión de habituación las ratas se introdujeron a la arena por el lado sur, colocándolas frente a la pared sur (como sucede durante la prueba) y se les permitió explorar la arena sin objetos. Luego de las tres sesiones de habituación (séptimo, octavo y noveno días post cirugía) las ratas se expusieron a la *fase de adquisición* de la tarea de RLO, en la cual se colocaron dos objetos idénticos (limpios) en esquinas contrapuestas de la caja experimental (a 25 cm de cada esquina). Las ratas se introdujeron individualmente a la caja por el lado sur y se les permitió explorar durante 20 min. La memoria a largo plazo se evaluó 24 h después con la *fase de evocación* para la cual los objetos se limpiaron y se colocaron nuevamente en la arena, pero uno de ellos se cambió de ubicación colocándolo en una esquina contigua (a 25 cm de la esquina). A continuación, se introdujo al sujeto por el lado sur de la caja experimental y se le permitió explorar durante un periodo de 10 min. Las sesiones de adquisición y evocación de la tarea se videograbaron para su análisis posterior.

### *Análisis de datos*

Se analizaron las videograbaciones de la actividad exploratoria de los sujetos para cuantificar el tiempo invertido en cada uno de los objetos, el de la ubicación familiar y el de la ubicación novedosa, en cada fase de la prueba. Para determinar la cantidad de tiempo que invirtió cada sujeto explorando los objetos se estableció como exploración la acción de orientar su cabeza hacia el objeto a una distancia de un centímetro o cuando su nariz tocara el objeto. El *índice de discriminación* de lugar de objeto se calculó dividiendo el tiempo invertido en el objeto en la ubicación novedosa entre la suma del tiempo total de exploración de ambos objetos, multiplicado por cien.

### 7.3.2 Campo abierto

El noveno día post cirugía, luego de la tercera y última sesión de habituación y manipulación, se evaluaron: la actividad motora espontánea y la ansiedad de los sujetos en la arena de campo abierto. Para ello se utilizó una caja de formaica negra, de 80 x 80 cm de ancho y 30 cm de alto, dividida con líneas blancas en 16 cuadrantes de 20 x 20 cm. Para esta prueba, los sujetos se colocaron individualmente en el centro de la arena y se les permitió desplazarse libremente para videgrabar su locomoción durante 5 min. Posteriormente, se cuantificaron el número de cruces totales y de cruces hacia el centro de la arena o hacia los cuadrantes laterales.

### 7.4. *Obtención del tejido para histología.*

Después de la prueba de memoria, se anestesió a algunos de los sujetos con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente, para luego perfundirlos intracardiamente con 250 mL de solución salina al 0.9% fría seguida de 250 mL de paraformaldehído (PFA) frío al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (PB; del inglés: “phosphate buffer”) 0.1M, pH 7.4 para fijar el tejido. A continuación, se obtuvo el cerebro y se conservó durante 48h en PFA 4% a 4°C para su postfijación. Posteriormente, se deshidrató el tejido con diferentes gradientes de sacarosa (10, 20 y 30 %; 24h en cada uno). Con el criostato, se obtuvieron secciones coronales de hipocampo de 34µm de grosor. Una de cada cinco secciones se colocó en portaobjetos gelatinizados para su tinción con violeta de cresilo. El resto de las secciones se colectaron en cajas de 12 pozos (Corning, NY, USA) con solución de crioprotección (25% de glicerol, 25% de etilenglicol y 50% de PB 0.2M, pH 7.4) para su preservación a 4°C hasta su procesamiento mediante técnicas de inmunohistoquímica con diaminobenzidina o por fluorescencia.

### 7.5. *Tinción con violeta de Cresilo*

Para la evaluación citoarquitectónica de los hipocampos de sujetos control y experimentales, laminillas con secciones coronales de cerebros se sumergieron en agua destilada, y a continuación, en gradientes de 70, 95, 100, 95 y 75% de etanol (2 veces respectivamente) durante 3-5 minutos para su deshidratación. Luego, se sumergieron en agua destilada y, enseguida, en violeta de cresilo al 0.1% durante 5 min para teñir los ácidos nucleicos presentes en los cuerpos de Nissl (cúmulos de retículo endoplásmico rugoso) y poder así detectar la estructura de las células. A continuación, las laminillas se sumergieron en agua, se deshidrataron en gradientes de 70, 95 y 100% de etanol y, por último, se sumergieron en



xileno. Finalmente, se les colocó medio de montaje histológico (Permount, Fisher Scientific) y un cubreobjeto para la preservación de los tejidos. Para garantizar la uniformidad en las condiciones de tinción de las secciones de todos los grupos de sujetos, cortes coronales de cada grupo se procesaron simultáneamente. La adquisición de las imágenes para la reconstrucción de los hipocampos se realizó en el microscopio Olympus BX51-WI, DSU (Disk Scanning Unit).

#### 7.6. *Inmunohistoquímica*

Las secciones coronales de cerebro se colocaron en flotación en pozos con fosfato salino 1X (PBS 1X; del inglés: “phosphate buffered saline”), tritón 0.3% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.2%, durante 30 minutos y en agitación moderada para permeabilizar las membranas y bloquear las endoperoxidasas del tejido. En seguida, se incubaron las secciones con solución de bloqueo PBS1X, albúmina de suero bovino (BSA) al 5% durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron a 4°C por 24 h con diferentes anticuerpos primarios diluidos en PBS/5%BSA: anti-synaptophysin, clone SY38 (1:500, Millipore, Temecula, CA, USA); Tau mouse mAb (tau46; 1:500; Cell Signaling Technology, MA, USA) y mouse monoclonal anti-PSD-95 (1:500, Chemicon, Temecula, USA). Para los controles negativos, la incubación con los anticuerpos primarios se omitió del procedimiento. Posteriormente, las secciones se lavaron tres veces (5 min cada vez) con PBS para después incubarlas con los anticuerpos secundarios (biotinilados) diluidos en PBS1X-BSA al 5%, durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se les hicieron dos lavados con PBS 1X y se incubaron con la mezcla ABC del kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 1h a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las secciones se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con la mezcla del Kit DAB (diaminobencidina, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) hasta que se observó una coloración marrón en el tejido. Enseguida se lavaron con PBS tres veces para retirar la solución y detener la reacción. Las secciones de cerebros de sujetos distintos se procesaron en paralelo para asegurar homogeneidad en las condiciones de inmunotinción entre grupos. Una vez teñidas, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar y 24h después se rehidrataron en gradientes de etanol al 80, 95 y 100%, y xileno al 100%. Finalmente, se les colocó Permount y un cubreobjeto para su posterior observación en el microscopio Olympus BX51-WI, DSU (Disk Scanning Unit) y la adquisición de imágenes para el análisis de las tinciones.

### 7.7. *Procesamiento del tejido para inmunofluorescencia*

Las secciones coronales de hipocampo se colocaron en flotación en pozos con PB 0.1M y se lavaron con agitación moderada para retirar la solución de crioprotección en la que se conservaron. A continuación, se permeabilizaron con PB 0.1 M-Tritón X-100, 0.3% durante 30 minutos, para después incubarlas con la solución de bloqueo [PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3% y BSA al 5%] toda la noche a 4°C. Posteriormente, las secciones se incubaron a 4°C por 24 h con diferentes anticuerpos primarios: rabbit polyclonal anti-MAP2 (1:500; Millipore, Temecula, CA, USA); goat polyclonal anti-Bassoon (1:300; Abcam, Cambridge, MA, USA); polyclonal rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000; Dako, Glostrup, Denmark); mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) monoclonal antibody (1:500; Millipore, Temecula, CA, USA); y goat polyclonal anti-doublecortin (DCX; 1: 250, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Para los controles negativos, la incubación con los anticuerpos primarios se eliminó del procedimiento. Posteriormente, las secciones se lavaron tres veces (5 min cada vez) con PB 0.1 M-Tritón X-100, 0.3%, para después incubarlas por 2 h con anticuerpos secundarios fluorescentes acoplados a Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), incluyendo: Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:500), 647 donkey anti-rabbit (1:500), y 633 donkey anti-goat (1:500); o el anticuerpo Dylight 594 donkey anti-goat (1:250; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA). Los núcleos celulares se tiñeron con rojo radiante (1:1000; Bio-Rad Laboratories, CA, USA) o Hoechst (Hoechst 33342, Trihydrochloride Trihydrate, 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). Finalmente, las secciones se lavaron con PB 0.1M con Tritón X-100 0.3% (3 veces, 5 min cada vez), se colocaron en portaobjetos silanizados y se cubrieron con medio de montaje (DAKO, Carpinteria, CA, USA). La observación de las muestras y la adquisición de imágenes se realizaron con microscopía confocal (Zeiss LSM 5 Pascal o Nikon A1R+STORM).

### 7.8. *Análisis de imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia*

Para los análisis densitométricos de los experimentos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, se analizaron de 4 a 6 secciones coronales por sujeto de cada condición experimental (n= 3-4 ratas/grupo). Se analizaron diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3 y/o GD) a partir de microfotografías confocales de los experimentos de inmunofluorescencia, o de imágenes en campo claro de las inmunohistoquímicas con diaminobencidina. Para ello, se utilizó el software ImageJ (version 1.51d,<sup>232</sup>). Las imágenes en

campo claro se convirtieron a escala de grises y luego se realizó un análisis por umbral (*threshold*). Las imágenes confocales primero se separaron en los distintos canales de interés (rojo, verde, azul y/o coral) y luego se llevó a cabo el mismo procedimiento para el análisis de umbral. En todos los casos se calcularon los porcentajes de áreas inmunomarcadas, con los cuales se realizaron los análisis estadísticos.

#### 7.9. *Conteo celular*

Para el conteo de células DCX positivas (DCX+), se utilizaron de 4 a 6 secciones coronales por animal (n= 3-4 por condición experimental). Para ello se adquirieron imágenes confocales, con un aumento de 40X, de la cresta y la lámina suprapiramidal del GD del hipocampo. Se utilizó el software Image J para el análisis y conteo de las células de ambas regiones del GD. El número de células DCX+ por región se contó en cada sección coronal, y se obtuvo un promedio para cada grupo experimental. Se realizó un análisis estadístico para evaluar las diferencias significativas entre los grupos infundidos con PBS y los moduladores de Wnt. Un total de, aproximadamente, 12 secciones por condición fueron consideradas para el análisis. El trazado semi-automático de las neuritas de las células DCX+ del GD se realizó a partir de proyecciones en Z de las inmunofluorescencias adquiridas por microscopía confocal, y con ayuda del complemento “Simple Neurite Tracer”<sup>233</sup>.

#### 7.10. *Procesamiento del tejido para Western-blot*

Después de las tareas conductuales, algunos de los animales se decapitaron para extraer sus cerebros, los cuales se colocaron inmediatamente en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF; 126 mM NaCl, 3.5 mM KCl; 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>; 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>; 11 mM D (+) glucosa; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; H<sub>2</sub>O) durante 1 min para estabilizar el tejido. A continuación, se disecaron los hipocampos para obtener regiones enriquecidas del área CA1. Tejido al cual se le agregó solución buffer de lisis RIPA (HEPES 50 mmol/L, pH 7.7; NaCl 100 mmol/L; PMSF 2 mmol/L; NP-40 1%) e inhibidor de proteasas (complete inhibitor cocktail, Roche Diagnostics. Indianapolis, IN, USA) para sonificarlo con 3 pulsos de 10s a 4°C. Enseguida, los homogenados se centrifugaron durante 30 min a 14000 rpm y se colectaron los sobrenadantes para determinar la concentración de proteína por ensayo colimétrico con el kit BCA (Kit Bio-Rad DC protein assay). Finalmente, las muestras se prepararon con 25 µg de proteína y amortiguador de carga (Laemmli buffer: 125mM Tris/HCl; 2.5% 4% SDS; 20% glicerol, 2%

ditiotreititol, 5%  $\beta$ - mercaptoetanol, 0.05% azul de bromofenol; pH 6.8), y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en ensayos por Western-Blot.

### *Immunoblot*

Para los ensayos por western-blot, las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 min y se colocaron en un gel SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida-tris-glicina para la separación de las proteínas por electroforesis. Luego se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Hybond ECL, Buckinghamshire, England), que posteriormente se bloqueó con 5% leche libre de grasa, 0.1% de Tween, TBS 1X (2mM Tris base y 13.7mM NaCl) toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (PBS-BSA 3%) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron tres veces (10 min cada lavado) para retirar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa diluido en solución de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces (10 min cada lavado) y se visualizaron por quimioluminiscencia (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate. Millipore, Billerica, MA, USA) y se revelaron en placas fotográficas (Kodak X-OMAT film). Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-synaptophysin, clone SY38 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); mouse monoclonal anti-PSD-95 (1:500; Chemicon, Temecula, USA); rabbit anti-p-tau S199/202 polyclonal antibody (1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); anti-tau PHF-1 (1:100; donado por P. Davies); mouse monoclonal anti-active- $\beta$ -catenin (anti-ABC), clone 8E7 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); mouse monoclonal anti- $\beta$ -catenin (1:1000; E-5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); and mouse monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Clone 6C5; 1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA). Los anticuerpos secundarios que se usaron son: 1: 15,000; anti-mouse IgG o anti-rabbit IgG-HRP (horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

### *Análisis de datos*

Los análisis densitométricos de las bandas se hicieron con el software *ImageJ* (versión 1.51d). Para normalizar los datos, los valores obtenidos para cada banda se dividieron entre su respectivo control de carga (GAPDH) con lo que se obtuvo una proporción. Posteriormente, se compararon con el control y se expresaron como porcentaje.

### 7.11. *Microscopía electrónica*

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas transcardialmente con 250 mL de PBS seguido por 250 ml de PFA al 4% y Glutaraldehído al 1% en amortiguador fosfato 0,1 M (pH 7,4). Después de la perfusión, los cerebros se retiraron del cráneo para diseccionar bloques de hipocampo dorsal que incluyeran los subcampos CA1 y CA3, y se mantuvieron en solución fijadora (PFA al 4% y glutaraldehído al 1%). A continuación, las muestras se deshidrataron con distintas concentraciones de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) a 4°C. Se embebieron en resina (EPON), se polimerizaron a 40°C en una estufa de polimerización, y se cortaron en secciones de 70 nm con una navaja de diamante en el ultramicrotomo (ULTRACUT-Reichert Jung). Las secciones se colocaron en rejillas de Nikel recubiertas de colodión y se contrastaron con acetato de uranilo/citrato de plomo. Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II, Jeol, y se adquirieron microfotografías para su análisis posterior. Se obtuvieron y analizaron entre 15-20 fotografías de 4 muestras distintas por cada grupo experimental. Para los análisis de densidad sináptica, se incluyeron ambos tipos de sinapsis: excitadoras (tipo I) e inhibitoras (tipo II)<sup>234</sup>. Se realizaron conteos del número de sinapsis y de sinapsis perforadas. Todos los conteos se realizaron en doble ciego para muestrear la información.

### 7.12. *Análisis estadísticos*

Se utilizó el software GraphPad Prism 4 para hacer los análisis estadísticos y la elaboración de las gráficas. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM. Las comparaciones entre grupos realizaron con la prueba *t* de Student no pareada o la prueba de ANOVA, como se indica en cada pie de figura. Las  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativas.

### 7.13. *Cultivos de células de neuroblastoma humano*

Para verificar el sistema de infusión basado en la cánula bilateral conectada a una minibomba osmótica, así como la funcionalidad de las proteínas recombinantes (Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1) que se infundirían *in vivo*, utilizamos cultivos de células de neuroblastoma humano de la línea celular SMS- MSN<sup>235</sup> como un modelo *in vitro* que nos permitiría estudiar los efectos de la activación de la vía Wnt mediados por los agonistas y el antagonista sobre el citoesqueleto y la morfología neuronal. La utilización de estas células se determinó con base en experimentos

previos en los que observamos cambios notables en la morfología y distribución de las proteínas actina y tubulina luego del tratamiento con un agonista de la vía Wnt (Ortiz-Matamoros, et al., *datos no publicados*).

Las células de esta línea de neuroblastoma humano MSN se conservaron en viales con glicerol congelados en nitrógeno líquido para su preservación. Las células que serían utilizadas en los experimentos se descongelaron dos semanas antes de su uso para después sembrarlas en cajas de Petri de 100 mm con cubreobjetos a una confluencia de medio millón de células por caja y se mantuvieron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%/ O<sub>2</sub> 95%, a 37 °C. Para su conservación y crecimiento, las células se incubaron en medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con aminoácidos no esenciales y 10% de suero fetal bovino. El medio se reemplazó dos veces por semana o más frecuentemente si la tasa de crecimiento celular era alta u ocurría la acidificación del medio.

Con la finalidad de inducir un fenotipo neuronal maduro en las células de neuroblastoma humano, el medio de cultivo se reemplazó por medio de cultivo neurobasal RPMI 1640 adicionado con ácido retinoico (10µM; RA del inglés: “retinoic acid”) y factor de crecimiento nervioso (NGF; 50 ng/mL) 24h después de sembrarlas. Tres días después de inducir su diferenciación, las células de neuroblastoma fueron tratadas con: el agonista Wnt7a (600 ng), el agonista Wnt5a (600 ng), el antagonista Dkk-1 (200 ng), o se les agregó la solución vehículo PBS 1X. Los tratamientos se añadieron a los cultivos directamente y de manera aguda (Fig. 3) o por varios días mediante el uso de mini-bombas osmóticas (Alzet, modelo 2004; Durect Corp., Cupertino, CA) con una capacidad aproximada de 250 µL y una tasa de flujo de 0.25 µL/h. Para este último procedimiento, se introdujeron mini-bombas osmóticas recuperadas al final de los experimentos *in vivo* a las cajas de Petri con las células de neuroblastoma humano (Fig. 4) con la finalidad de verificar la actividad de los agonistas y el antagonista luego de 11 días de tratamiento. Después de 4 días de exposición a los tratamientos o el vehículo, se determinaron los cambios morfológicos en las células mediante técnicas de inmunofluorescencia contra proteínas del citoesqueleto.

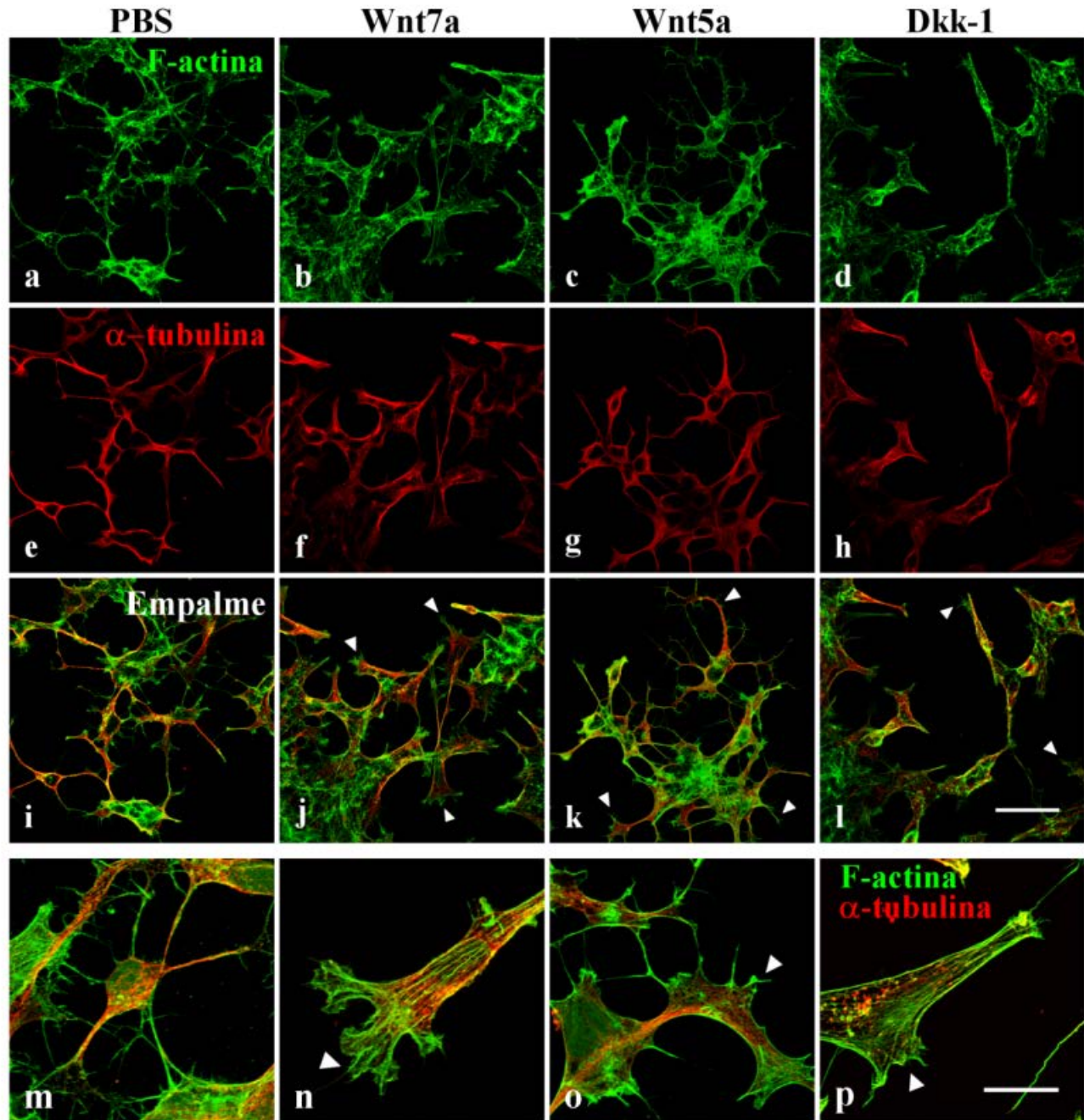
Para los ensayos de inmunocitoquímica, al finalizar el tratamiento las células de cada grupo, experimentales y testigo, se fijaron con PFA 4% disuelto en PB por 10 min. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados (de 5 min c/u) con PB 0.1M/Tritón X-100 al 0.3% a 4°C. A continuación, las células se permeabilizaron con PB 0.1M/ Tritón X-100, 0.3% durante 10 min a temperatura ambiente y se incubaron con la solución de bloqueo (PB

0.1M/Tritón X-100 0.3% y BSA al 5%) durante 24h a 4°C. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con el anticuerpo primario contra  $\alpha$ -tubulin (1:500; monoclonal antibody, mouse anti- $\alpha$ -tubulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por una noche a 4° C. Se hicieron dos lavados de 3 minutos c/u con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%, para después incubar a las células con el anticuerpo secundario acoplado a Alexa fluor 555 (1:700, donkey anti-mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces (cada lavado de 5 min) con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%. Para la tinción de F-actina las células se incubaron con Faloidina (1:50, Alexa Fluor 488 phalloidin, Invitrogen, Eugene, OR, USA) durante 20 minutos. Transcurrido este periodo se hicieron tres lavados (3 min c/u) con PB 0.1M/ Tritón X-100 0.3%. Finalmente, los cubreobjetos con células se montaron sobre portaobjetos silanizados utilizando el medio de montaje para inmunofluorescencia Dako (Dako fluorescent mounting médium. North America, Inc, Carpinteria, CA, USA). La captura de imágenes de alta resolución apiladas en el eje Z se realizó en el microscopio confocal (Nikon A1R<sup>+</sup>).

## 8. RESULTADOS

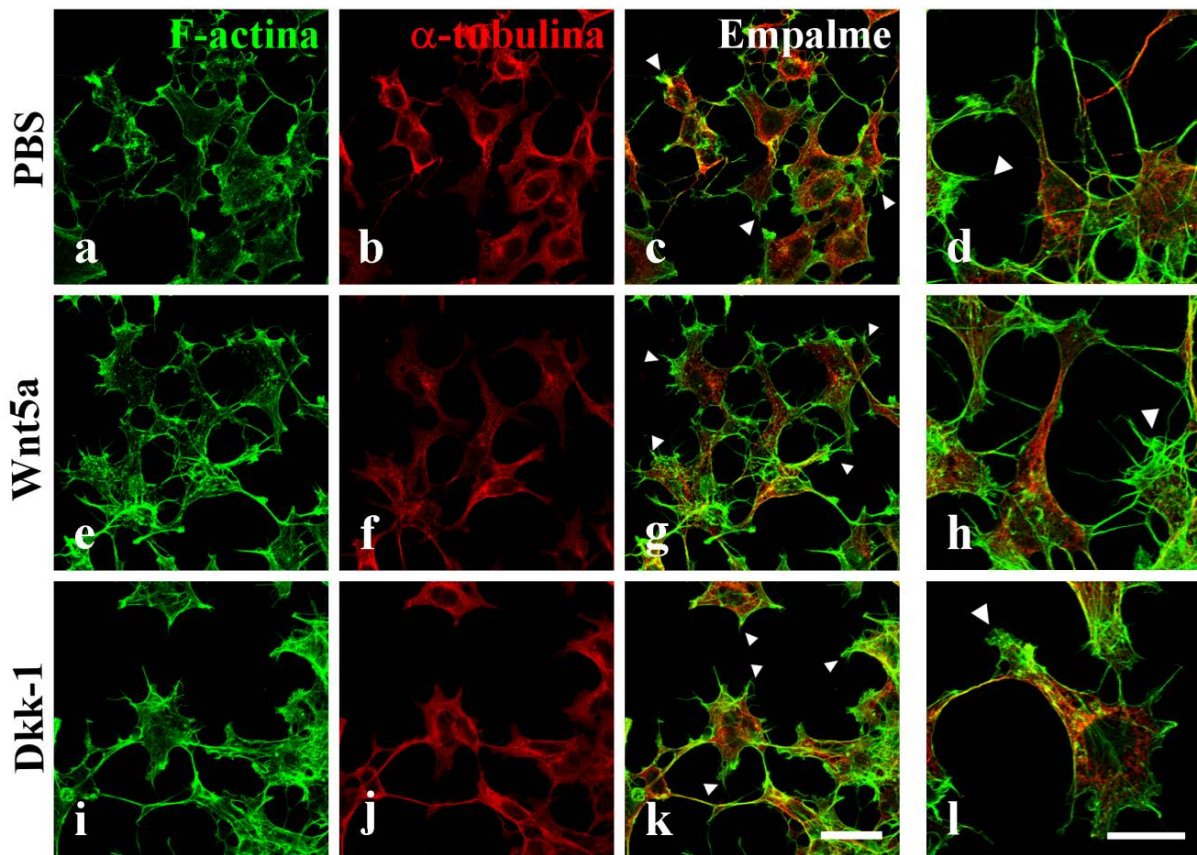
### 8.1. Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1 inducen cambios en las proteínas del citoesqueleto de células de neuroblastoma humano *in vitro*.

Como se mencionó en los Materiales y Métodos, primero confirmamos que el sistema de infusión era capaz de liberar los ligandos, y evaluamos la eficacia de las proteínas recombinantes humanas antes de su uso para los experimentos *in vivo* (Fig. 6). Así mismo, nos aseguramos de que dichas proteínas preservan su actividad biológica hasta el final de las infusiones crónicas *in vivo* (Fig. 7). Para ello, las células de neuroblastoma humano diferenciadas fueron tratadas con: Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1 en las mismas concentraciones a las que se emplearían para las microinfusiones *in vivo*. Las incubaciones con Wnt7a o Wnt5a incrementaron la formación de filopodios y lamelipodios de actina (Fig. 6 j, k, n, o, *flecha*). La distribución de  $\alpha$ -tubulina también cambió de forma consistente con la remodelación del citoesqueleto de actina (Fig. 6f, g). De manera interesante, el antagonista de la vía Wnt canónica, Dkk-1, produjo un acortamiento y una reducción en el crecimiento de las neuritas en las células de neuroblastoma humano, asociados con la reorganización de la actina y la tubulina (Fig. 6d, h, l, p).



**Figura 6. La modulación de la vía de señalización Wnt induce cambios en el citoesqueleto y la morfología de la línea de células de neuroblastoma humano MSN.** Imágenes de microscopía confocal de células tratadas con PBS (a, e, i), Wnt7a (b, f, j), Wnt5a (c, g, k) y Dkk-1 (d, h, l), y teñidas con Faloidina, un marcador de F-actina (*verde*) e inmunomarcadas con  $\alpha$ -tubulina (*rojo*). Se observan cambios en la distribución de actina y tubulina, así como la presencia de filodia y lamellipodia, indicados por *puntas de flecha*. Los acercamientos (m-p) muestran la presencia de estos cambios morfológicos. Todas son imágenes representativas de 5-7 campos de 4 cultivos celulares distintos sembrados por triplicado para cada condición. Barras de escala=50  $\mu$ m y para acercamientos = 25  $\mu$ m.



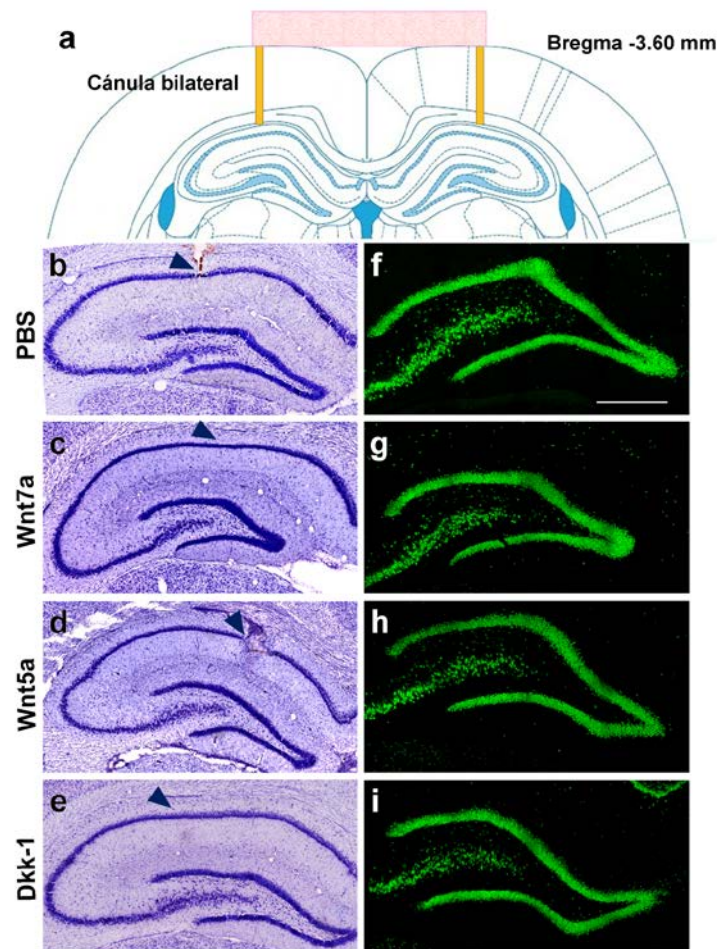


**Figura 7.** El agonista Wnt5a y el antagonista Dkk-1 permanecen activos y continúan liberándose de las minibombas osmóticas recuperadas el día 11, al final de los experimentos *in vivo*. Imágenes de microscopía confocal de células de neuroblastoma humano MSN diferenciadas, tratadas con PBS (a-c), Wnt5a (e-g) y Dkk-1 (i-k), y teñidas con Faloidina (*verde*) y  $\alpha$ -tubulina (*rojo*). Los empalmes de las dos señales (actina/tubulina) se muestran en c, g y k. Las magnificaciones (d, h y l) muestran la presencia de los cambios morfológicos. Las *puntas de flecha* indican la presencia de filopodios y lamelipodios. Las imágenes son representativas de 5 campos de 3 cultivos celulares distintos por condición. Barras de escala=50  $\mu$ m y para acercamientos = 25  $\mu$ m.

Aunado a lo anterior, se observaron cambios morfológicos similares a los observados cuando las células de neuroblastoma humano se trataron con Wnt5a o Dkk-1 infundidos de manera controlada por cánulas conectada a las mini-bombas osmóticas recuperadas el día 11 al final de los experimentos *in vivo* (Fig. 7). Estos resultados sugieren que la exposición a las proteínas humanas recombinantes Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1, por un largo plazo y a las concentraciones empleadas, inducen modificaciones morfológicas derivadas de cambios en la organización de las proteínas del citoesqueleto. Además, permiten confirmar que el sistema de infusión es eficaz para los tratamientos crónicos *in vivo* y sustentan que las proteínas recombinantes continúan activas luego de 11 días.

## 8.2. Efecto de los agonistas y el antagonista Wnt en la viabilidad neuronal

En el modelo *in vivo*, primero estudiamos los efectos de Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1 en la viabilidad neuronal en el GD mediante ensayos de violeta de cresilo e inmunofluorescencias contra NeuN luego de 10 días de la infusión de los moduladores de Wnt. Como se muestra en la Fig.8, ninguno de los tratamientos indujo muerte neuronal o algún cambio en el grosor de la capa de células granulares del GD, pues en comparación con los GD de sujetos control, tanto la morfología del GD, como el grosor de la capa de células granulares, son muy similares en todas las condiciones experimentales, además de que en las micrografías no hay evidencias de daño en el tejido.



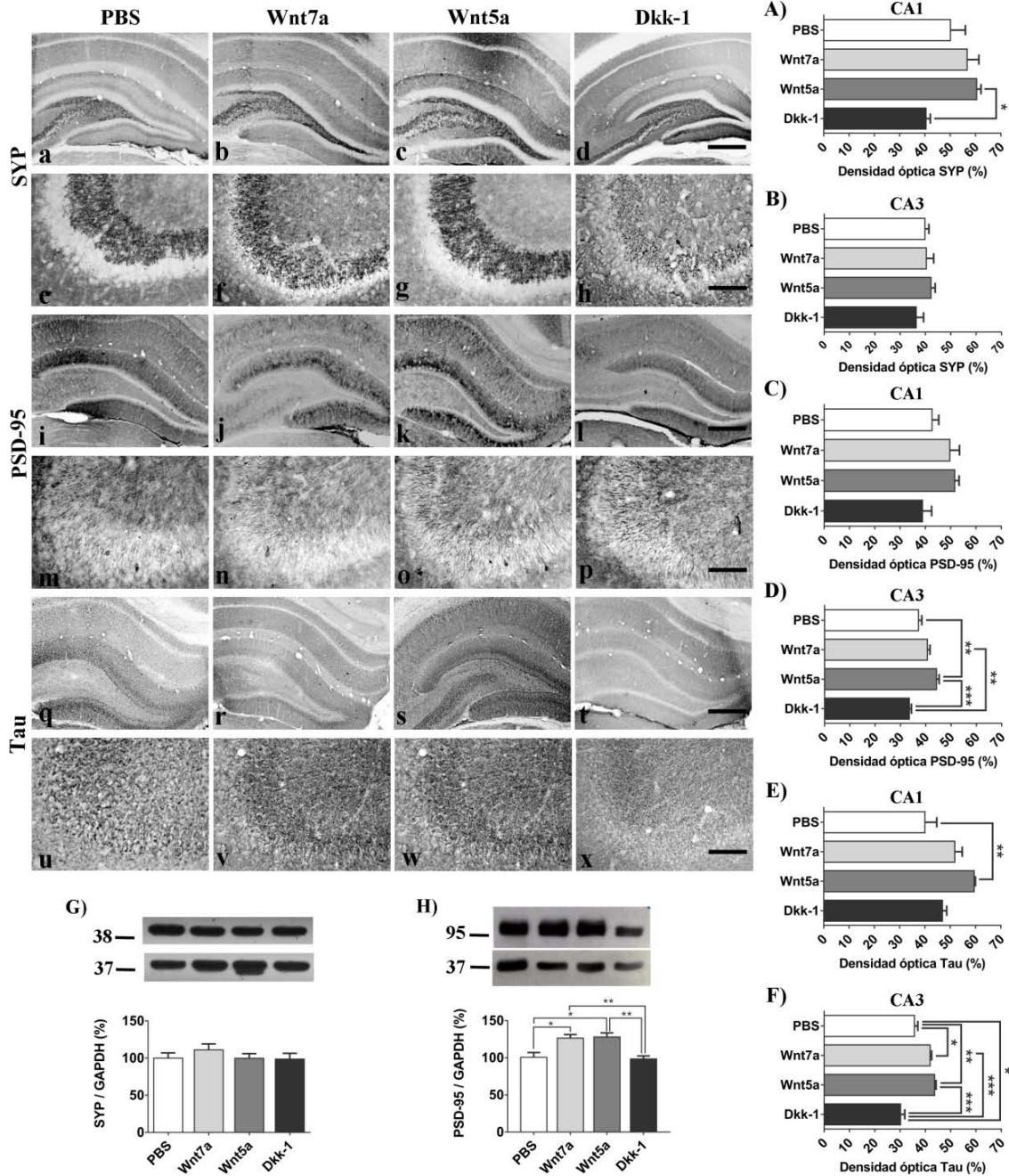
**Figura 8.** Representación esquemática de una sección coronal del hipocampo de la rata adulta, en la cual, se ejemplifica el sitio de colocación de la cánula bilateral (A). Reconstrucciones de secciones coronales de hipocampos representativos de cada condición experimental: PBS (B), Wnt7a (C), Wnt5a (D) y Dkk-1 (E) y teñidos con violeta de cresilo. Cada *punta de flecha* indica el tracto de la cánula en el hipocampo dorsal. Las imágenes se adquirieron a 4x. Los paneles a la derecha muestran inmunofluorescencias contra el marcador de núcleos de neuronas maduras, NeuN (*verde*) en los GDs de secciones coronales de hipocampos de animales infundidos con: PBS (F), Wnt7a (G), Wnt5a (H) y Dkk-1 (I). Barra de escala=500  $\mu$ m

### **8.3. Efectos del tratamiento a largo plazo con Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 en marcadores pre- y post-sinápticos.**

Para evaluar el efecto de la exposición crónica *in vivo* a agonistas y antagonista de la vía Wnt en la plasticidad estructural, analizamos el contenido de las proteínas presináptica y postsináptica, sinaptofisina (SYP) y PSD-95, respectivamente en el hipocampo de las ratas luego de 11 días de exposición a estos compuestos. Mientras que no se observaron cambios en la densidad de SYP en la subregión CA3 después de cualquiera de los tratamientos, en comparación con los individuos del grupo control (Fig. 9e-h; B), el tratamiento con el agonista Wnt5a indujo un incremento significativo en el contenido de SYP en la subregión CA1 del hipocampo en comparación con los sujetos tratados con Dkk-1 (Fig. 9c, A). Por otra parte, aun cuando la activación o inhibición de Wnt no indujo cambios en la distribución de la proteína de la densidad postsináptica PSD-95 en la región CA1 en comparación con la infusión crónica en los grupos control y Dkk-1 (Fig. 9i-l; C), la infusión crónica de Wnt5a produjo un incremento notable de PSD-95 en la subregión CA3 del hipocampo (Fig. 9m, o, p; D). El incremento en la densidad de PSD-95 en CA3 fue también significativamente mayor en los animales infundidos crónicamente con el agonista Wnt7a en comparación con los animales infundidos con Dkk-1 (Fig. 9n, p; D). Por el contrario, la infusión del antagonista Dkk-1, indujo una disminución en la densidad de PSD-95 en dicha región. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos mediante ensayos por Western blot, en los que claramente se observó un incremento en el contenido de PSD-95 en el hipocampo, particularmente, después del tratamiento con Wnt5a, así como una disminución en dicha proteína de la densidad postsináptica luego de la infusión con el antagonista Dkk-1, sin notar cambios en los niveles totales de la proteína de vesículas sinápticas, SYP (Fig. 9G, H).

También encontramos diferencias significativas en la densidad de la proteína asociada a microtúbulos, tau, en la subregión CA1 del hipocampo, entre los sujetos tratados con Wnt5a y los del grupo control PBS. De manera similar, en comparación con los sujetos control, las infusiones con los agonistas Wnt7a y Wnt5a también indujeron un incremento significativo en la densidad de tau en la subregión CA3 (Fig. 9q-x; E, F). Por el contrario, el tratamiento con Dkk-1 disminuyó de manera significativa la densidad de la proteína tau en dicha región. Estos resultados sugieren que la activación o inhibición de la vía Wnt modula diferencialmente a las proteínas pre- y post-sinápticas en el hipocampo, observando los cambios más prominentes en la subregión CA3.





**Figura 9. Cambios en proteínas sinápticas inducidas por la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.** Las imágenes son representativas de la inmunoreactividad contra SYP (a-h), PSD-95 (i-p), y tau total (q-x) en el GD, CA1 (a-d, i-l, q-t) y CA3 (e-h, m-p, u-x). Las densidades ópticas analizadas se representan como el porcentaje de área teñida para cada región, a partir de 3-4 animales distintos por grupo (A-F). Se realizaron pruebas de ANOVA y tests de comparaciones múltiples de Tukeys. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Barra de escala=500  $\mu\text{m}$  para GD y CA1, e =250  $\mu\text{m}$  para CA3. Los niveles de las proteínas SYP y PSD-95 también se analizaron por Western blot (G, H). Las barras representan los análisis densitométricos de las proteínas normalizadas con GAPDH y representan la media  $\pm$  SEM de 4-6 experimentos independientes. Prueba *t* de Student \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

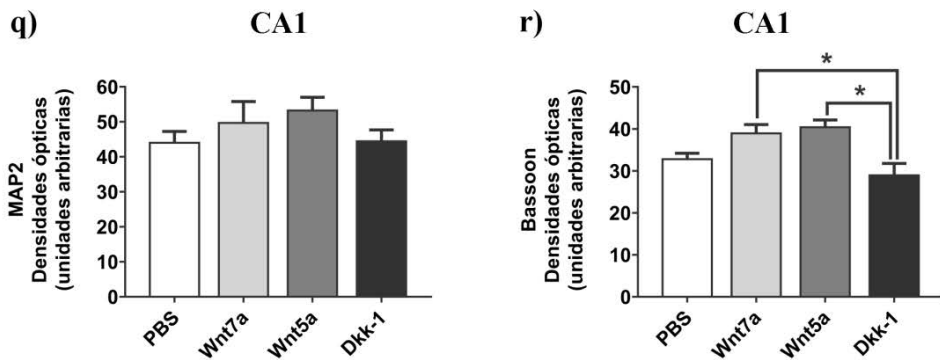
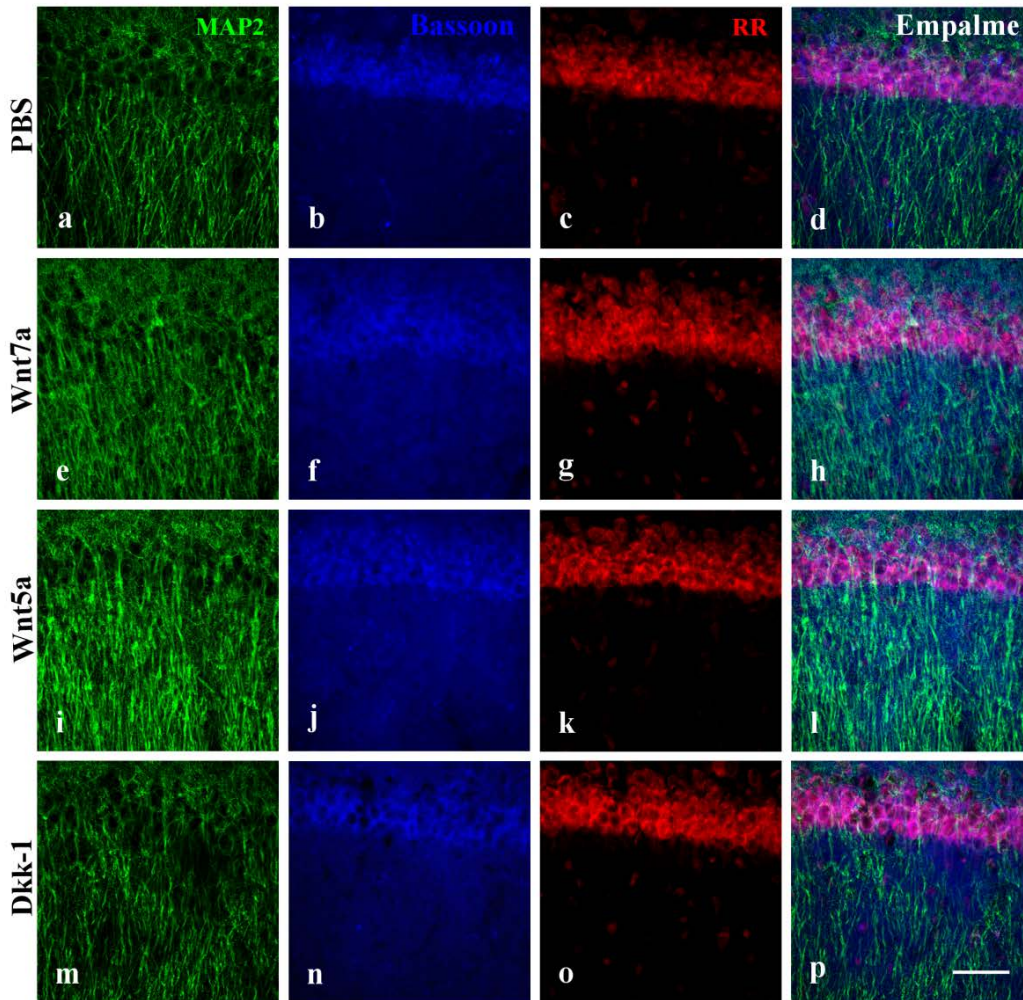
#### **8.4. Cambios en la densidad del marcador presináptico, Bassoon, inducidos por la modulación de Wnt**

Dado el incremento en la proteína de la densidad postsináptica PSD-95, quisimos evaluar los efectos de la activación o la inhibición de la vía Wnt en uno de los componentes presinápticos de las zonas activas, usando múltiples marcadores inmunofluorescentes y análisis por microscopía confocal para la proteína asociada a microtubulos-2 (MAP-2) y la proteína relacionada con la organización de la zona activa de la presinápsis, Bassoon. Los análisis de densidad de marca revelaron que no existen cambios significativos en la proteína del citoesqueleto MAP-2 en las dendritas de las neuronas piramidales de CA1 y CA3 (Figs. 10-11 q), ni en las células granulares del GD del hipocampo (Fig. 12q), en ninguna de las condiciones experimentales. No obstante, los análisis de densidad de Bassoon, mostraron un incremento significativo tanto en CA3 como en el GD de sujetos infundidos con el agonista Wnt5a, en comparación con los grupos control y tratado con Dkk-1 (Figs. 10-11 r).

De manera similar, la densidad de la proteína Bassoon incrementó ligeramente en las subregiones CA1 y CA3 luego del tratamiento con Wnt7a, particularmente al compararlos con los sujetos tratados con Dkk-1 (Figs 10 y 11 r). Además, el tratamiento con este agonista indujo un incremento significativo en la región del GD en comparación con el grupo control (Fig. 12r). En conjunto, estos datos sugieren que la activación de la señalización Wnt en el hipocampo adulto incrementa las zonas activas en las sinapsis, principalmente con la señalización mediada por Wnt5a, aunque no genera la acumulación de vesículas sinápticas, tal como lo sugieren los análisis de densidad de SYP.

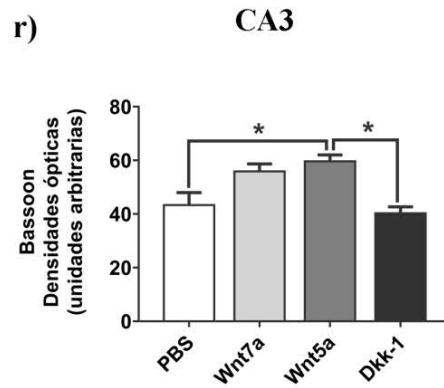
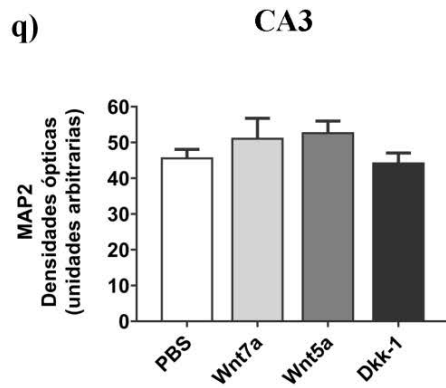
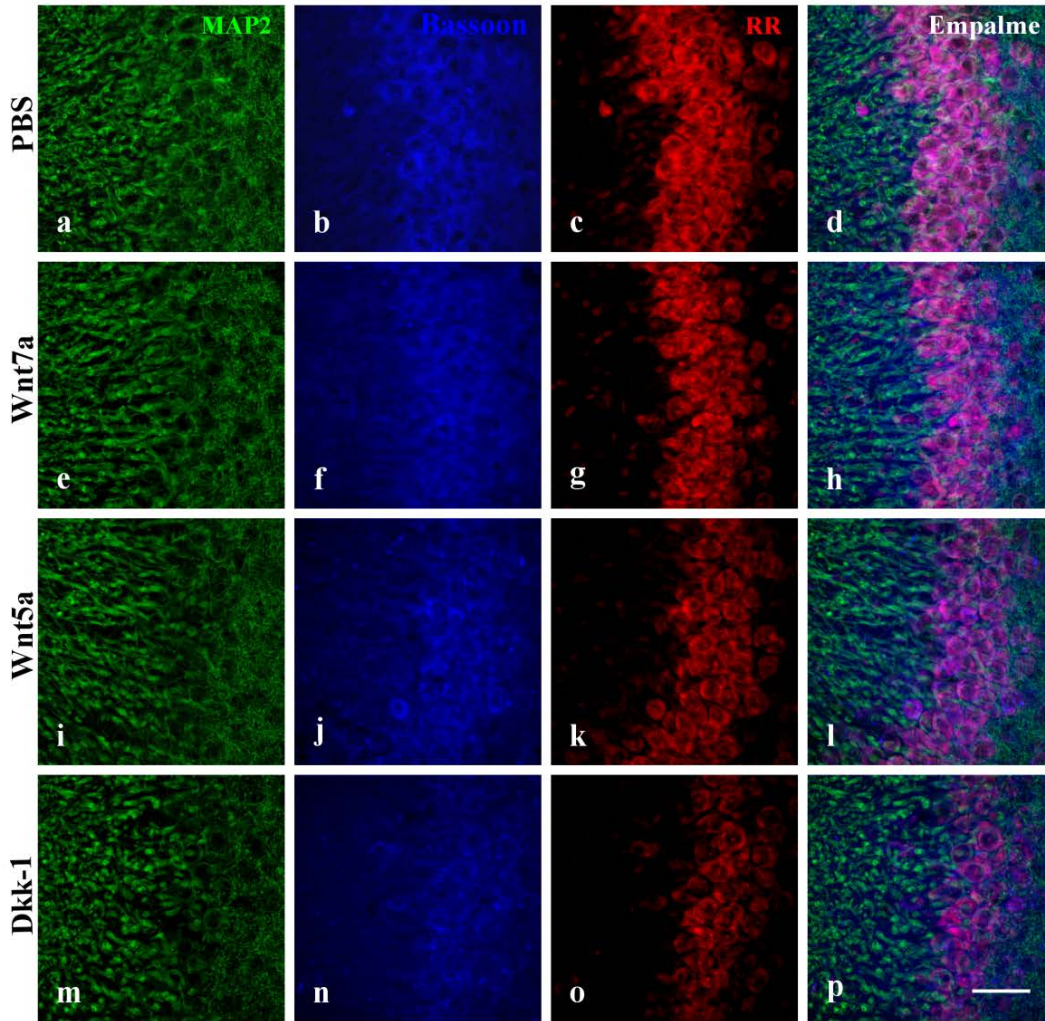
#### **8.5. Efecto neurogénico de la infusión crónica de Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1 en el hipocampo.**

La señalización Wnt modula la proliferación de neuroblastos y la diferenciación en el hipocampo adulto (revisado por <sup>199</sup>). Por ello, decidimos evaluar los efectos de los agonistas (canónico y no canónico) y el antagonista de la vía Wnt canónica en la proliferación neuronal y la respuesta glial.

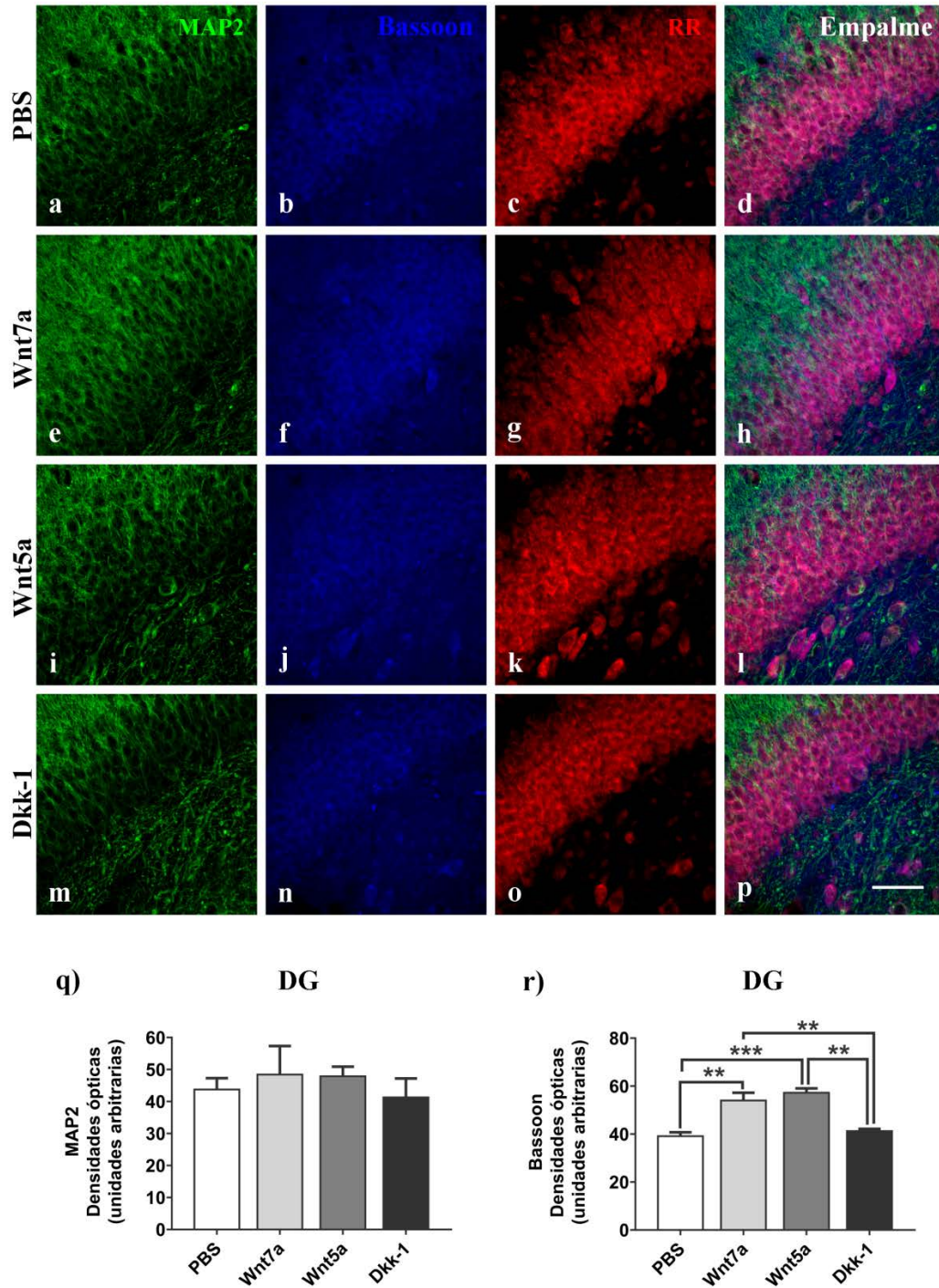


**Figura 10. Cambios en MAP2 y Bassoon en la subregión CA1 después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.** Se realizaron triples inmunomarcajes contra MAP2 (*verde*), Bassoon (*azul*) y núcleos celulares (*rojo radiante*; RR) (d, h, l, p) en secciones coronales de hipocampo. Las imágenes son representativas de 4-6 secciones provenientes de 3-4 animales distintos por cada grupo experimental: PBS (a-d), Wnt7a (e-h), Wnt5a (i-l) y Dkk-1 (m-p). Los análisis de las densidades ópticas de las marcas de MAP2 y Bassoon se representan como el porcentaje de área teñida (q, r). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Pruebas estadísticas: ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. \* $p < 0.05$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.





**Figura 11. Cambios en MAP2 y Bassoon en la subregión CA3 después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1.** Se realizaron triples inmunomarcajes contra MAP2 (*verde*), Bassoon (*azul*) y núcleos celulares (*rojo radiante*) (d, h, l, p) en secciones coronales de hipocampo. Las imágenes son representativas de 4-6 secciones provenientes de 3-4 animales distintos por cada condición: PBS (a-d), Wnt7a (e-h), Wnt5a (i-l) y Dkk-1 (m-p). Los análisis de las densidades ópticas se representan como el porcentaje de área teñida (q, r) y representan la media  $\pm$  SEM. Pruebas estadísticas: ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. \* $p < 0.05$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.

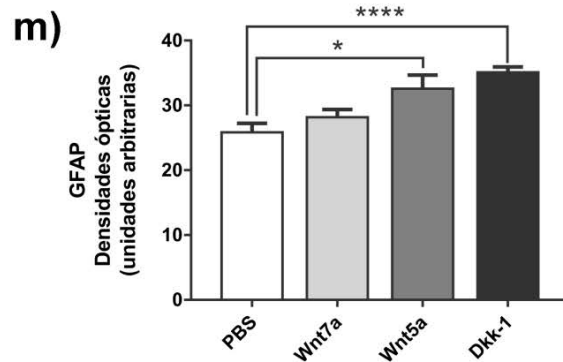
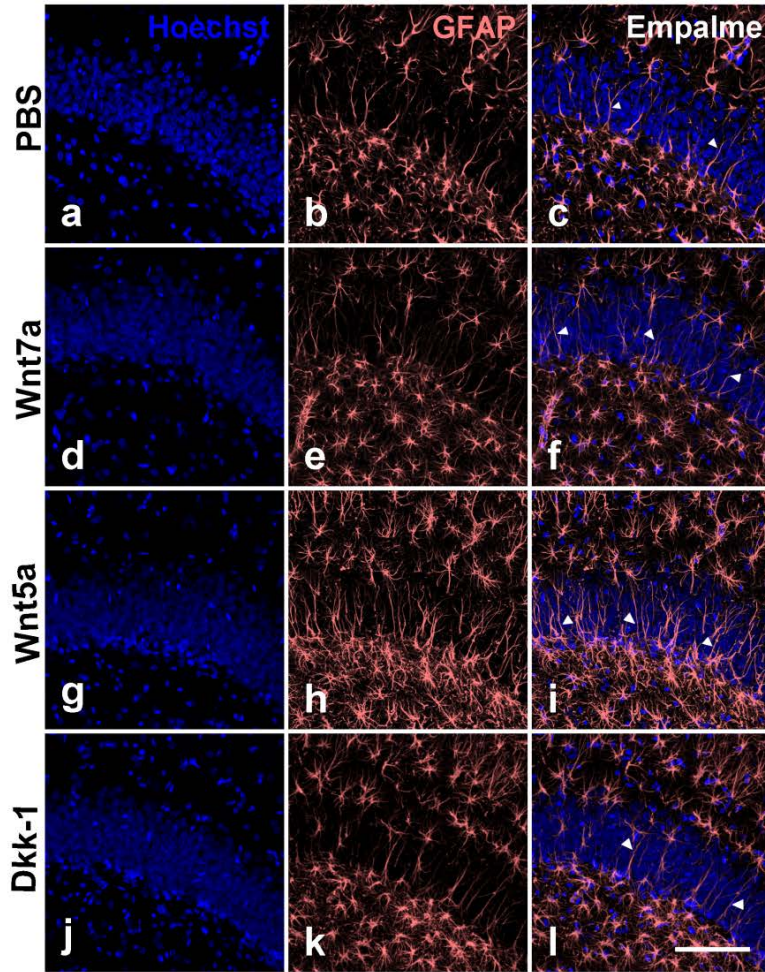


**Figura 12.** Cambios en MAP2 y Bassoon en el giro dentado después de la exposición a largo plazo a Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1. Se muestran triples inmunofluorescencias contra MAP2 (*verde*), Bassoon (*azul*) y núcleos celulares (*rojo radiante*) (d, h, l, p) en secciones coronales de hipocampo. Las imágenes son representativas de 4-6 secciones provenientes de 3-4 animales distintos por cada grupo de animales tratados: PBS (a-d), Wnt7a (e-h), Wnt5a (i-l) y Dkk-1 (m-p). Los análisis de las densidades ópticas de las marcas de MAP2 y Bassoon se representan como el porcentaje de área teñida (q, r). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Pruebas estadísticas: ANOVA y test de comparaciones múltiples de Tukey. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m.

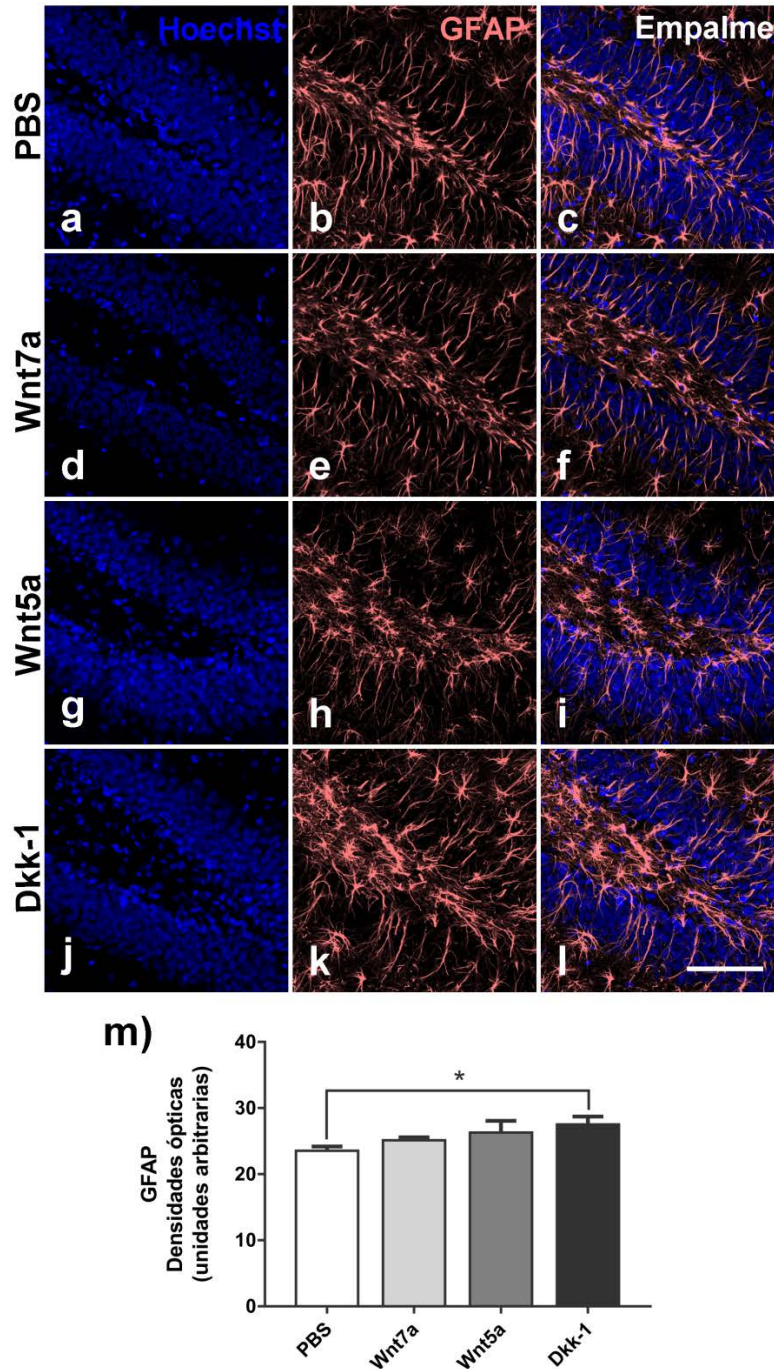


Para cuantificar cambios en GFAP, se realizaron análisis densitométricos de la lámina suprapiramidal y la cresta del GD del hipocampo. Los análisis de densidad de células inmunoreactivas GFAP+ de animales tratados crónicamente con Wnt7a mostraron un número y una morfología similar en comparación con aquellos del grupo control (Figs. 13 y 14 e, f comparados con b, c y m), indicando que la activación de la vía Wnt canónica mediada por Wnt7a, no generó respuestas gliales en el hipocampo adulto. Por otra parte, la exposición al agonista Wnt5a, mayormente conocido como activador de la vía Wnt no-canónica, y al antagonista canónico, Dkk-1, incrementaron significativamente la densidad de las células inmunomarcadas contra GFAP en el GD (Fig. 13 y 14h, i y k, l, m). De manera interesante, en los animales tratados con Wnt5a, se observaron gran cantidad de células subgranulares GFAP+ con procesos extendidos verticalmente en la capa granular del GD, lo que, basados en la morfología y ubicación, pareciera indicar que son células gliales radiales (Fig. 13i, *flecha*).

Para analizar si la modulación de la vía Wnt podía afectar el número de neuronas generadas *de novo* en el hipocampo adulto, se realizó una inmunotinción doble. La inmunotinción contra el marcador de neuronas maduras, NeuN, mostró un patrón de distribución similar en los GD de animales tratados con Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1 en comparación con los de animales infundidos con el vehículo (Figs. 15 y 16). No obstante, en comparación con los sujetos control, los animales expuestos a la infusión crónica de Wnt5a, mostraron un incremento de aproximadamente tres veces, en la generación de neuronas recién nacidas, evaluadas mediante el inmunomarcaje contra DCX, tanto en la cresta (Fig 15h, i, m) como en las láminas dorsal y ventral del GD (Figs. 16h, i, m). De manera similar, el tratamiento crónico con el agonista Wnt7a produjo un incremento de más del doble en el número de células DCX+, principalmente agrupadas en la cresta del GD (Figs. 16e, f y m). Por otra parte, en comparación con los sujetos del grupo control, los animales infundidos con Dkk-1 no mostraron variaciones significativas en el número de células DCX+ en el GD (Figs. 15 y 16k, l, m). Aunado a lo anterior, observamos que las células DCX+ de animales tratados con Wnt7a mostraron dendritas más largas y con una arborización más compleja en comparación con el grupo de sujetos infundidos con el vehículo (Fig 17b, b' y f, f').

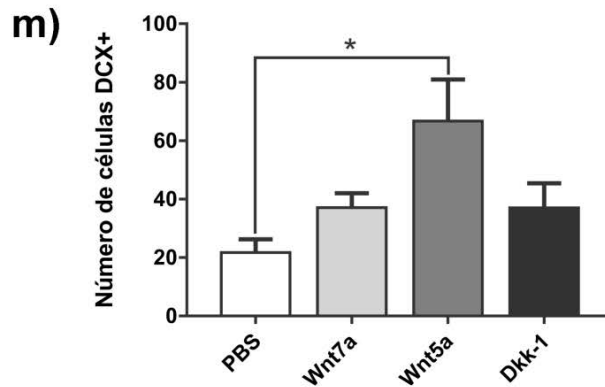
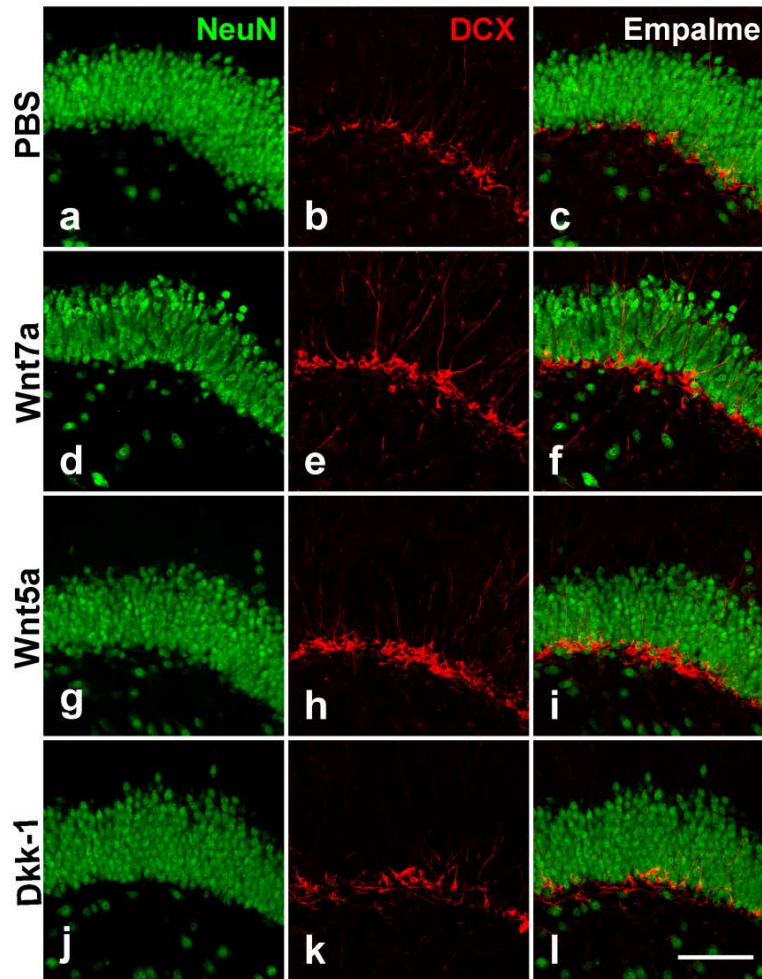


**Figura 13. Inmunofluorescencia contra GFAP (*coral*) en la lámina suprapiramidal del GD luego de la exposición a largo plazo a: Wnt7a, Wnt5a, Dkk-1.** El núcleo celular se tiñó con Hoechst (*azul*). Las imágenes que se muestran representan de 4-6 secciones provenientes de 3-4 animales diferentes por cada grupo: PBS (a-c), Wnt7a (d-f), Wnt5a (g-i), y Dkk-1 (j-l). La gráfica inferior muestra los análisis de densidad representados como el porcentaje del área reconocida por el anticuerpo contra la proteína GFAP (m). Se observa un incremento estadísticamente significativo en la densidad de GFAP de las secciones de animales infundidos con Wnt5a y Dkk-1, comparados con las secciones de animales infundidos con PBS. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los *asteriscos* denotan las diferencias estadísticamente significativas. Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$ . Barra de escala=50  $\mu$ m

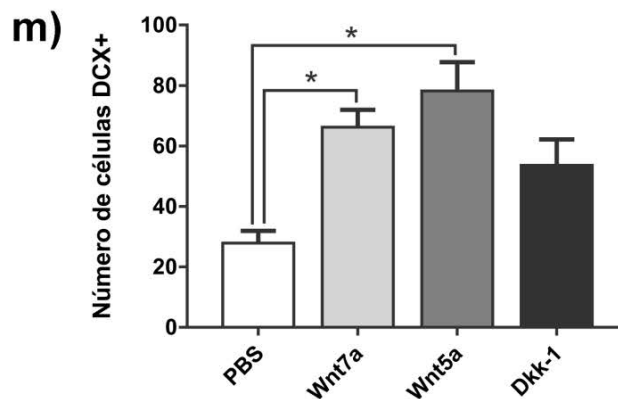
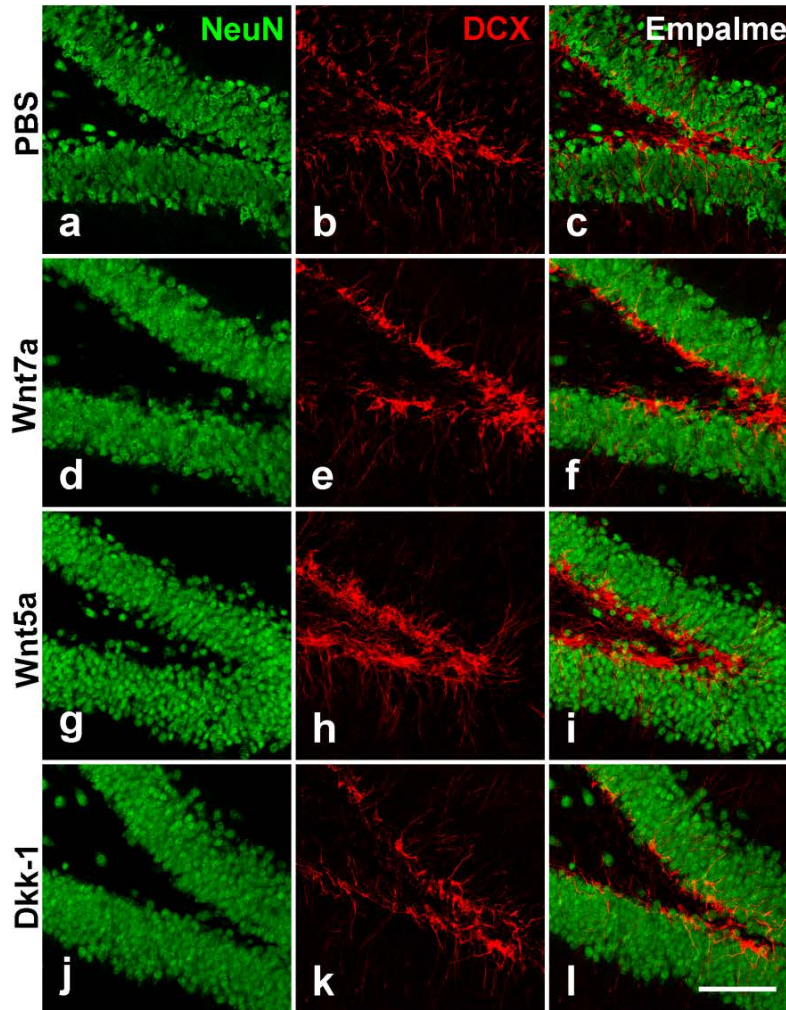


**Figura 14.** Inmunofluorescencia contra GFAP (*coral*) en la cresta del GD luego de la exposición a largo plazo a: Wnt7a, Wnt5a, Dkk-1. El núcleo celular se tiñó con Hoechst (*azul*). Las imágenes son representativas de 4-6 secciones provenientes de 3-4 animales diferentes por cada grupo: PBS (a-c), Wnt7a (d-f), Wnt5a (g-i), y Dkk-1 (j-l). La gráfica inferior muestra los análisis de densidad representados como el porcentaje del área del tejido reconocida por el anticuerpo contra GFAP (m). Se observa un incremento significativo de GFAP en esta región en las secciones de animales infundidos con Dkk-1. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los *asteriscos* denotan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo PBS. Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ . Barra de escala=50  $\mu$ m





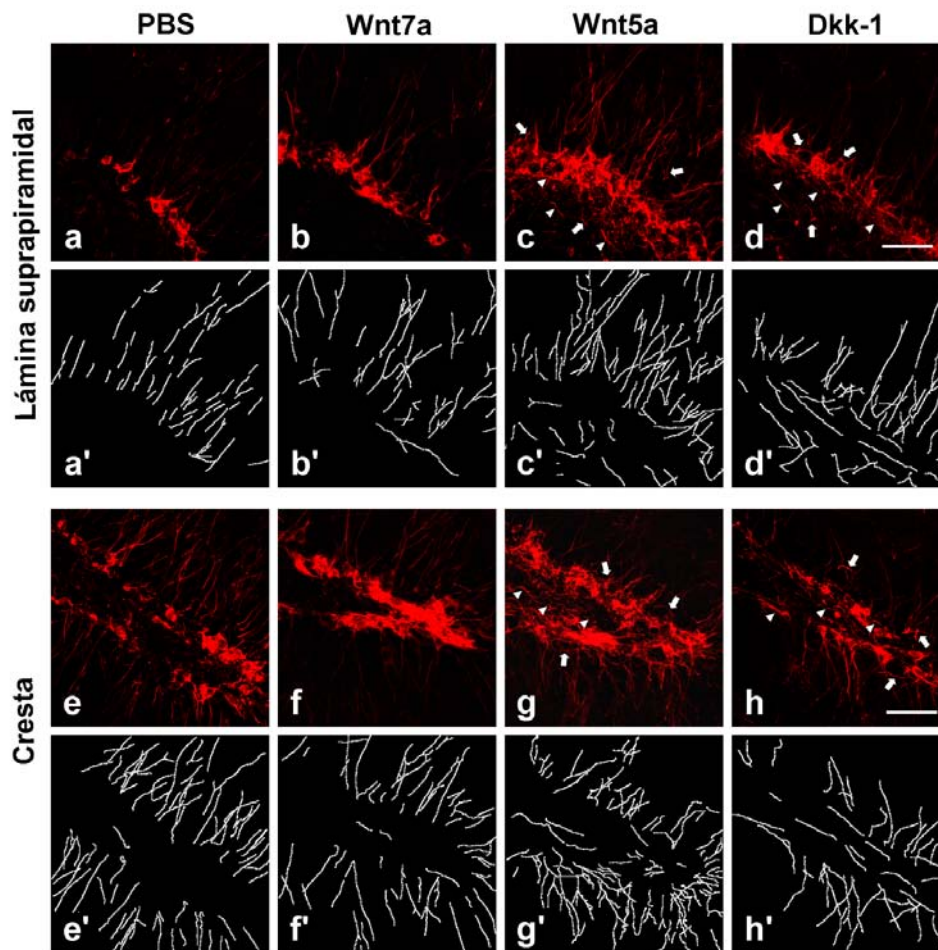
**Figura 15. Efectos de la modulación de la señalización Wnt en la tasa de neurogénesis en la lámina suprapirámida del GD.** Las secciones de hipocampo fueron inmunomarcadas contra el marcador de núcleos de neuronas maduras, NeuN (*verde*), y el marcador del citoesqueleto de células nuevas, DCX (*rojo*), después del tratamiento con: PBS (a-c), Wnt7a (d-f), Wnt5a (g-i), o Dkk-1 (j-l). Las imágenes son representativas de 4-6 secciones de 3-4 sujetos distintos por grupo. En m se muestra el número de células DCX+ por condición experimental. Se observa un incremento significativo de células DCX+ en las secciones de animales infundidos con Wnt5a en comparación con el grupo infundido con el vehículo. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los *asteriscos* denotan las diferencias significativas. Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ . Barra de escala=50  $\mu$ m



**Figura 16. Efectos de la modulación de la señalización Wnt en la tasa de neurogénesis en la cresta del GD.** Las secciones de hipocampo fueron inmunomarcadas contra NeuN (*verde*) y DCX (*rojo*), luego del tratamiento con: PBS (a-c), Wnt7a (d-f), Wnt5a (g-i), o Dkk-1 (j-l). Las imágenes son representativas de 4-6 secciones de 3-4 sujetos distintos por grupo. El número de células DCX+ por condición experimental se muestran en la gráfica (m). Se observan diferencias significativas en las células DCX+ en las secciones de animales infundidos con Wnt7a y Wnt5a en comparación con con los sujetos infundidos con el vehículo PBS. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los *asteriscos* denotan las diferencias significativas. Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ . Barra de escala = 50  $\mu$ m

Sin embargo, luego del tratamiento con Wnt5a, se observaron cambios en la arborización y la orientación de las neuritas desarrolladas en las células recién nacidas. Dichos cambios consistieron en un patrón desorganizado en el crecimiento de neuritas, y en la presencia de muchos procesos ectópicos que se proyectaron horizontalmente hacia la SGZ e incluso hacia la región del hilus (Fig 17c, c' y g, g').

En comparación con las neuronas DCX+ de los hipocampos de los sujetos infundidos con el vehículo, las neuronas nuevas de sujetos tratados crónicamente con Dkk-1 presentaron dendritas de una menor longitud, así como una disminución en el número de ramificaciones, y aún más, algunas de ellas se orientaron hacia la región del hilus (Fig. 17d, d' y h, h').



**Figura 17. Cambios en el patrón de crecimiento y la orientación de las neuritas de células nuevas inducidos por los moduladores de Wnt.** En las células DCX+ se observa la presencia de dendritas basales (*puntas de flecha*) y dendritas apicales con orientaciones distintas (*flechas*), luego de las infusiones crónicas con Wnt5a y Dkk-1. Imágenes confocales de la lámina suprapiramidal (a-d) y la cresta (e-h) del GD. Trazos de las dendritas inmunomarcadas por el anticuerpo contra DCX en la lámina suprapiramidal (a'-d') y la cresta (e'-h') de imágenes representativas de 4 sujetos tratados por grupo experimental. Barra de escala=50  $\mu$ m.

### **8.6. Activación de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina en el hipocampo.**

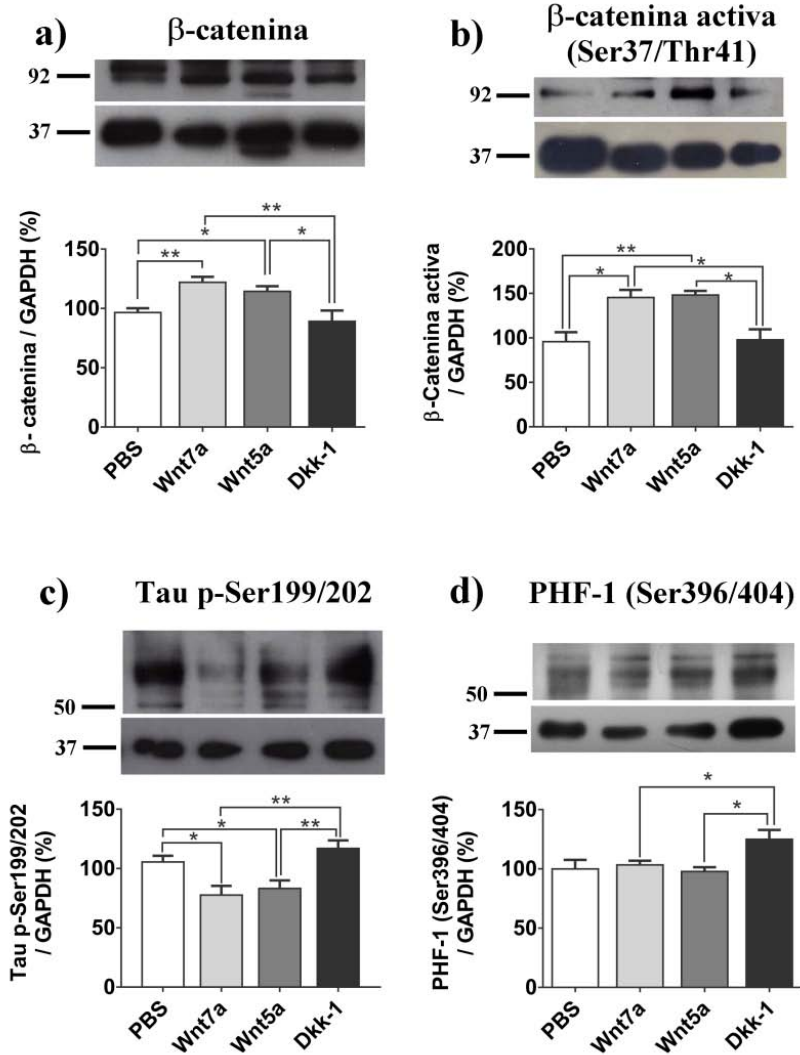
Los ensayos por Western blot se utilizaron para estudiar los niveles de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina total y la forma activa de la misma, la cual es el efector nuclear clave de la señalización Wnt canónica, luego de la infusión a largo plazo de agonistas o el antagonista de Wnt. Como se muestra en la Figura 18, en comparación con la infusión control de PBS, las infusiones de Wnt7a y Wnt5a indujeron un incremento significativo en los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina total después de 11 días de exposición (Fig. 18a). Este incremento se observó también en los niveles de la forma activa de  $\beta$ -catenina (Ser37/Thr41 no fosforiladas) (Fig. 18b), lo que sugiere que ambos agonistas pueden activar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el hipocampo *in vivo*. En comparación con la infusión del vehículo, el tratamiento con Dkk-1 no modificó de manera significativa los niveles de  $\beta$ -catenina (Fig. 18b).

Debido a que la activación o inhibición de la vía señalización Wnt puede regular la fosforilación de proteínas a través de actividad de la cinasa GSK3 $\beta$ , analizamos el estado de fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos, tau, en un sitio blanco controlado por dicha proteína cinasa <sup>236</sup>. Como se esperaba, en comparación con los grupos infundidos con PBS o Dkk-1, los grupos de sujetos infundidos con los agonistas Wnt7a o Wnt5a exhibieron un decremento significativo en estado de fosforilación de tau en la Ser199/202 (Fig. 18c). Por otra parte, no se observaron cambios en el contenido de este fosfo-epítipo en los sujetos del grupo tratado con Dkk-1 en comparación con el grupo control, no obstante, la presencia de la forma PHF-1 (Ser396/404 fosforiladas) de tau, fue significativamente mayor en este grupo tratado con el antagonista que en los grupos infundidos con los agonistas Wnt7a y Wnt5a (Fig. 18d).

### **8.7. Cambios ultraestructurales en las sinapsis inducidos por Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1**

Para evaluar si la infusión crónica de PBS, Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1 (Fig. 19 a-d) en el hipocampo dorsal afecta la morfología ultraestructural de las sinapsis, analizamos regiones enriquecidas del hipocampo mediante microscopía electrónica. Cada sinapsis se identificó esencialmente basándonos en la presencia de vesículas cercanas a la zona activa de la región presináptica, y a la presencia de la densidad postsináptica (PSD) contrapuesta. Evaluamos dos tipos de PSD, la macular y la perforada <sup>237</sup>.



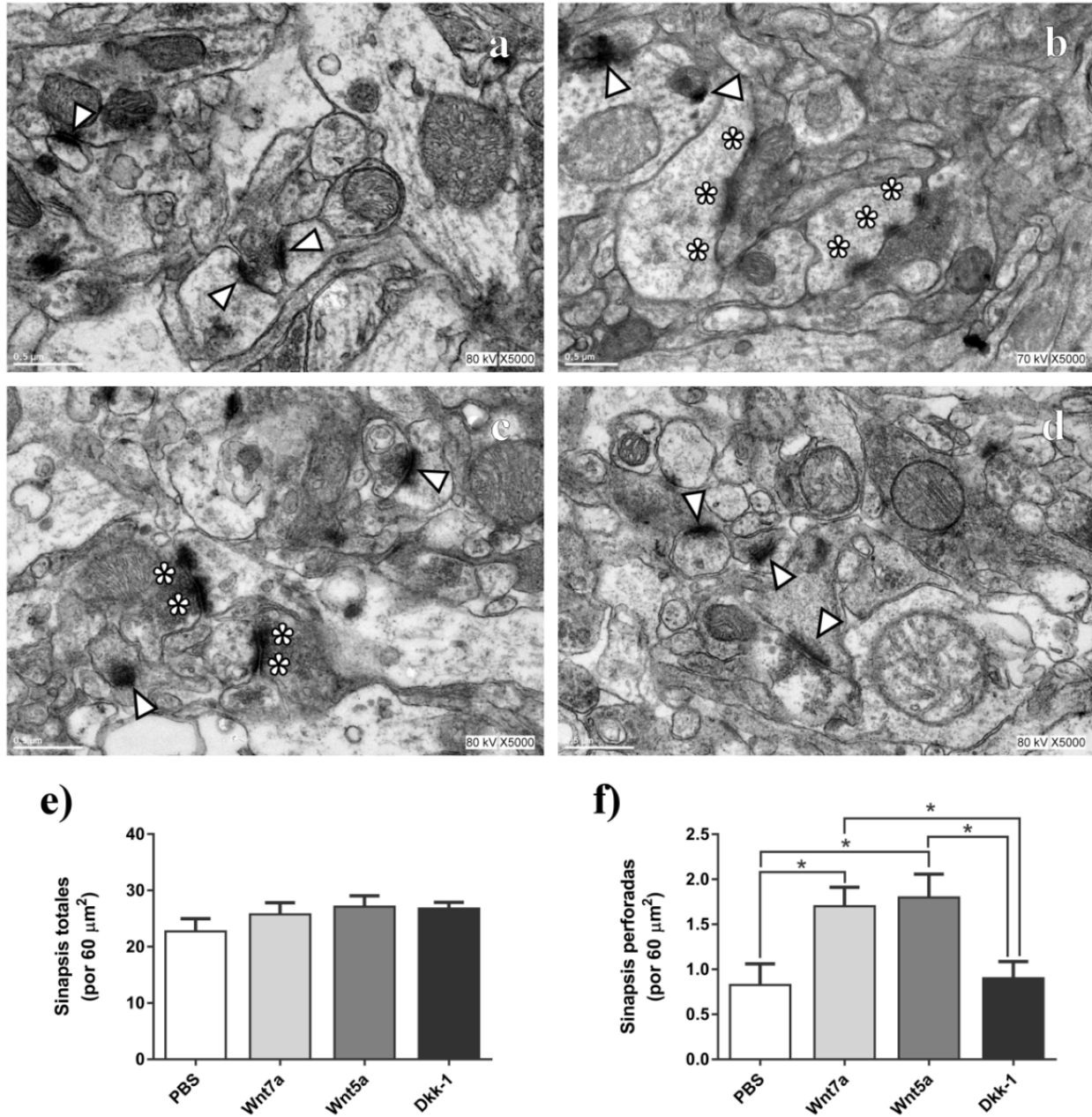


**Figura 18. Modulación de los niveles de  $\beta$ -catenina y la fosforilación de tau por los agonistas y el antagonista de Wnt.** Western blots representativos de  $\beta$ -catenina (a),  $\beta$ -catenina activa (b), tau fosfo-Ser199/202 (c), y tau fosfo-Ser396/404 (sitio PHF-1; d) en lisados de hipocampos de animales control (PBS), y microinfundidos crónicamente con Wnt7a, Wnt5a o Dkk-1. Los agonistas de Wnt incrementaron los niveles de la proteína  $\beta$ -catenina activa y redujeron la fosforilación de tau, mientras que el antagonista Dkk-1 produjo los efectos opuestos en comparación con dichos agonistas. Las barras de la gráfica fueron generadas a partir de los análisis densitométricos de los niveles de las proteínas normalizados con GAPDH (control de carga; banda de 37 KDa), y representan la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes. Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Se contaron el número de sinapsis por unidad de área y el número total de sinapsis perforadas (Fig. 19e, f). Mientras que el número total de sinapsis no cambió después de algún tratamiento, comparada con la infusión crónica de PBS (Fig.19 *cabeza de flecha*) la infusión crónica con Wnt7a o Wnt5a incrementó al doble el número de sinapsis perforadas, las cuales se caracterizan por densidades postsinápticas discontinuas en las espinas dendríticas (Fig. 19,



*asteriscos*). Los incrementos en este tipo de sinapsis, producidos por los agonistas de Wnt, también fueron significativos en comparación con las sinapsis perforadas presentes en los hipocampos de sujetos tratados con el antagonista Dkk-1.



**Figura 19. Análisis ultraestructurales de las sinapsis de hipocampos de animales expuestos crónicamente a los agonistas y el antagonista de Wnt.** Las imágenes son representativas de sujetos tratados con: PBS (a), Wnt7a (b), Wnt5a (c) y Dkk-1 (d). Las sinapsis típicas se indican con *puntas de flecha* y los *asteriscos* denotan sinapsis perforadas excitadoras. En la gráfica, las barras representan la media  $\pm$  SEM de 6-8 campos de 4 experimentos independientes en los que se contaron el número total de sinapsis (e) y las sinapsis perforadas (f). Prueba *t* de Student. \* $p < 0.05$ .

## 8.7. Cambios conductuales inducidos por la modulación de la señalización Wnt

Luego de 11 días de infusión, se realizó la tarea de campo abierto para evaluar habilidades independientes de la función hipocampal como: la actividad motora espontánea, la exploración y la ansiedad de los animales tratados con agonistas de Wnt o el antagonista canónico. La figura 20a muestra que no encontramos diferencias significativas, entre los grupos tratados con los agonistas y el grupo control, en el tiempo total de exploración, ni en el tiempo que invirtieron los sujetos para explorar la periferia de la arena, es decir, los cuadrantes contiguos a las paredes de la caja. Sin embargo, se observó una tendencia a un mayor tiempo de locomoción en los grupos control, y los tratados con Wnt7a y Wnt5a, que se reflejó en diferencias significativas en el tiempo total de exploración y el tiempo invertido en la periferia entre esos grupos y el grupo tratado con Dkk-1. Además, en comparación con los grupos control y el tratado con el antagonista, los sujetos a los que se les infundieron Wnt7a o Wnt5a mostraron un incremento significativo en el número de cruces hacia el centro de la arena. Estos resultados muestran que la administración crónica de moduladores de Wnt no genera alteraciones motoras, la falta de interés para explorar ambientes novedosos, ni conductas de tipo ansiosas. De hecho, la exposición a largo plazo a agonistas de Wnt resultó, conductualmente, en una inversión de tiempo significativamente mayor en el área central de la arena, lo que sugiere que estos compuestos podrían tener efectos potencialmente ansiolíticos.

Finalmente, analizamos el efecto funcional de las microinfusiones crónicas de los moduladores de Wnt mediante una tarea de memoria espacial. Al día 10 de la administración de los ligandos Wnt, se llevó a cabo la *fase de adquisición* de memoria, y 24h después, la *prueba de memoria* (Fig. 20b). No se observaron diferencias en el índice de exploración de ambos objetos durante la *fase de adquisición* entre ninguno de los grupos, y el índice de discriminación en el *periodo de evocación* no mostró cambios en los grupos con Wnt7a o Wnt5a en comparación con los sujetos control. Sin embargo, el grupo tratado con el antagonista Dkk-1 invirtió un tiempo similar en la exploración de los dos objetos, el de la ubicación familiar y la ubicación novedosa, lo que indica que la inhibición de la señalización Wnt canónica impide la evocación de la memoria de tipo espacial.

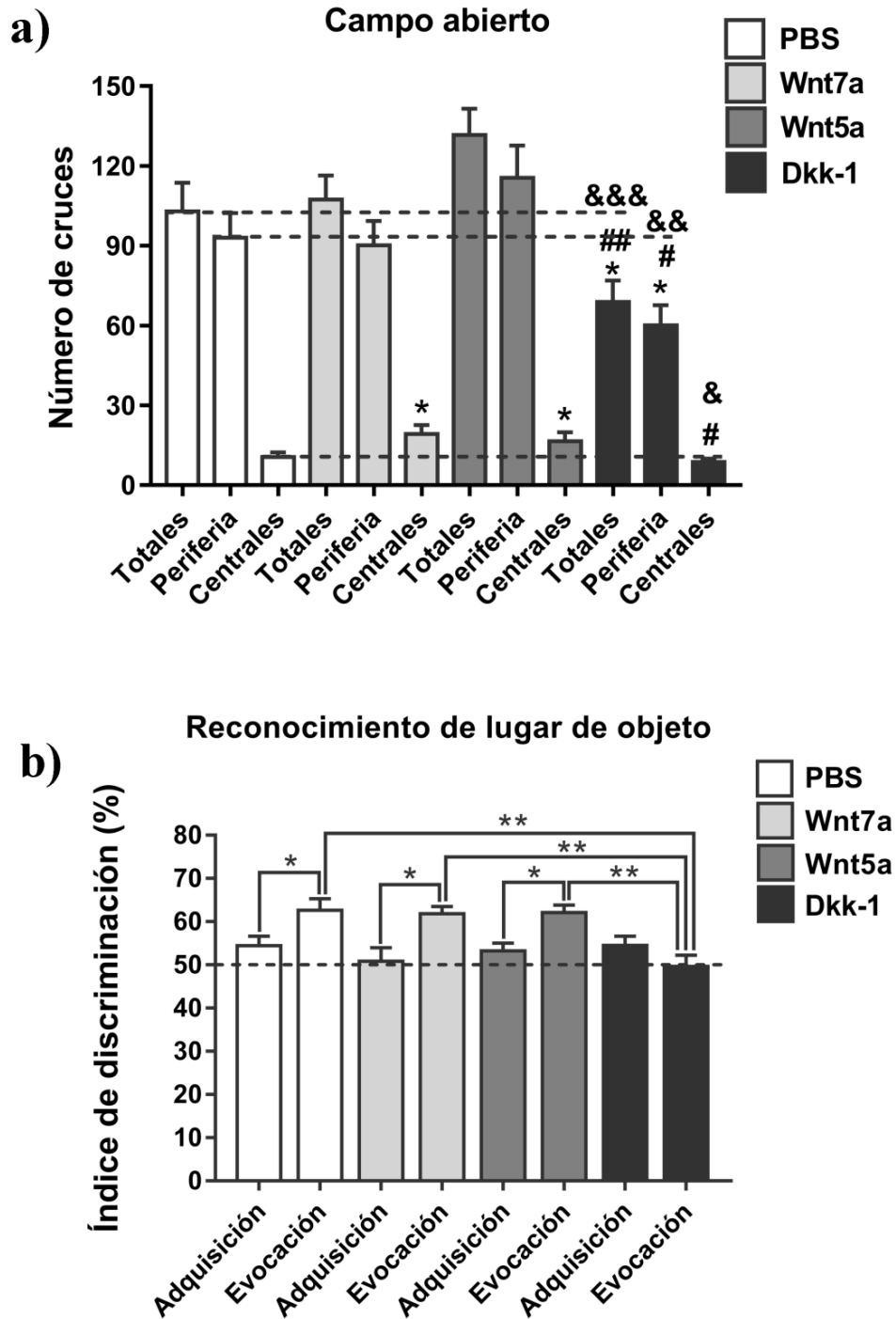


Figura 20. Cambios conductuales evaluados en las tareas de: campo abierto (a) y reconocimiento de lugar de objeto (b) luego de la exposición a largo plazo a los moduladores de la vía Wnt. En a se representan: el número de cruces totales, el número de cruces hacia los cuadrantes de la periferia y hacia el centro del campo abierto (n=7-10). Las diferencias estadísticamente significativas se expresan con un \* al compararse con el control; con # al compararlas con Wnt7a y con & cuando son en comparación con Wnt5a. El índice de discriminación que se muestra en b se calculó a los 20' para la fase de adquisición y a los 3' para la fase de evocación (n=5-8). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (ANOVA).

## 9. DISCUSIÓN

El protocolo de exposición a largo plazo a los ligandos Wnt usado en el presente trabajo, muestra que la activación/inactivación de la vía Wnt en el hipocampo adulto puede modificar parámetros estructurales y funcionales en esta región altamente plástica.

En este trabajo se demuestra por primera vez que la infusión crónica de las proteínas Wnt7a y Wnt5a incrementan el número de sinapsis perforadas, así como proteínas pre- y post-sinápticas asociadas con el ensamblaje de las sinapsis. Más aún, los datos presentados muestran que el antagonista Dkk-1 inhibe la consolidación de la memoria de tipo espacial. Encontramos que, en todos los casos, los efectos positivos inducidos por los agonistas de Wnt fueron significativamente mayores cuando se comparan con los efectos generados por Dkk-1, lo que resalta los beneficios terapéuticos potenciales de Wnt7a y Wnt5a como tratamientos para algunas condiciones neurodegenerativas caracterizadas por un incremento de Dkk-1, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer<sup>238</sup>.

Por tanto, se muestra evidencia de los efectos de la modulación *in vivo* de Wnt y los cambios estructurales asociados con la plasticidad neuronal, que también se ve comprometida en algunas enfermedades neurodegenerativas. Dichos cambios estructurales dependen de mecanismos que modifican el citoesqueleto neuronal. La vía de señalización Wnt tiene una función en la remodelación de los microtúbulos y los filamentos de actina de células neuronales y no neuronales<sup>8,239,240</sup>. Nosotros encontramos que Wnt7a y Wnt5a incrementaron el número de estructuras dependientes de actina, como los filopodios y lamelipodios en células de neuroblastoma humano diferenciadas, aunque el efecto del ligando Wnt5a, mayormente reconocido como no canónico, fue más prominente. Por el contrario, las neuronas expuestas a Dkk-1 mostraron un número reducido de neuritas, las cuales, además presentaban neuritas más cortas, sugiriendo que el mantenimiento de neuritas maduras también depende, por lo menos parcialmente, de una señalización constitutiva de Wnt. En el hipocampo adulto, este proceso de mantenimiento ocurre a través de cambios en la dinámica de actina que dependen de la señalización de CaMKII y Rac1-JNK, así como de la biosíntesis del receptor NMDA mediado pro CREB, tal como lo han demostrado Chen y colaboradores<sup>241</sup>.

La exposición a largo plazo a los agonistas Wnt7a y Wnt5a *in vivo*, produjo cambios estructurales diferenciales en el hipocampo adulto. En neuronas en cultivo estos agonistas afectan la formación de espinas dendríticas y el agrupamiento de la proteína de la densidad postsináptica PSD-95<sup>242</sup>, así como la activación de Ca<sup>2+</sup>/CAMKII<sup>174,242</sup>. Luego de la

exposición *in vivo* a ambos ligandos, descritos como activadores canónico (Wnt7a) y no canónico (Wnt5a), se encontró un incremento en los niveles de la proteína PSD-95 en los ensayos por inmunoblot y en su detección por inmunohistoquímica, particularmente en la región CA3. PSD-95 es una proteína involucrada en la maduración sináptica, que puede tener funciones decisivas en el control de la fuerza sináptica y la plasticidad sináptica que depende de actividad <sup>243,244</sup>. En este sentido, a mayor densidad postsináptica podría encontrarse un mayor contenido de receptores a glutamato <sup>245</sup> que, a su vez, es consistente con una LTP y una incorporación de receptores tipo AMPA potenciados observados por la sobreexpresión de Wnt3a inducida por lentivirus <sup>246,247</sup>. Por lo que, el incremento en PSD-95 y el incremento observado en el número de sinapsis perforadas, sin variar el contenido de sinaptofisina luego de la exposición a Wnt7a y Wnt5a, sugieren que dichos ligandos participan en la formación de sinapsis excitadoras en el hipocampo *in vivo*, sin cambiar el número neto de sinapsis.

La plasticidad sináptica puede depender de la elongación y retracción de ramificaciones axonales y dendríticas sin modificar el número total de sinapsis, por lo que una mayor presencia de sinapsis perforadas, que se piensa podría indicar un fortalecimiento sináptico <sup>248,249</sup>, apoyan esta función de la señalización Wnt en la remodelación sináptica. De manera similar, Farías y colaboradores <sup>10</sup>, describieron que Wnt5a incrementa el agrupamiento y la transmisión mediada por glutamato en neuronas hipocampales, modulando a la vez, la estructura y función de las sinapsis en mamíferos.

La infusión crónica de Dkk-1 no produjo una pérdida sináptica o muerte neuronal, pero sí una reducción en el contenido de PSD-95, de manera similar a los hallazgos de Fortress y colaboradores <sup>250</sup>, luego de la administración de una sola dosis de Dkk-1 en el hipocampo de ratones.

Por otro lado, la exposición a Wnt5a también incrementó la densidad del marcador presináptico de zonas activas, Bassoon, en las regiones CA3 y GD del hipocampo, sin afectar los niveles de SYP. En la región presináptica, la zona activa es el sitio de liberación de las vesículas sinápticas, por lo que, la densidad de las zonas activas presinápticas está fuertemente relacionada con la eficiencia de la transmisión sináptica (revisado por <sup>251</sup>). Recientemente, se encontró que la proteína Bassoon media el reclutamiento de los canales de voltaje dependientes de  $Ca^{2+}$  en las zonas activas presinápticas, teniendo, entonces, un efecto en neurotransmisión <sup>252</sup>. Por lo tanto, el incremento observado en los niveles de Bassoon por la infusión de Wnt5a también sustenta que dicho ligando podría incrementar la eficiencia

presináptica sin afectar el número de sinapsis totales. De manera similar a los resultados del tratamiento con Wnt5a, la exposición a un ambiente enriquecido produce un incremento en la densidad de zonas activas de las fibras musgosas en la región CA3 del hipocampo <sup>253</sup>. Entonces, es posible especular que la exposición crónica a los agonistas Wnt realizada en este trabajo, podría asemejarse al efecto en la plasticidad sináptica generado por un ambiente enriquecido <sup>254</sup>. Este efecto correlaciona bien con los datos presentados aquí sobre los incrementos en PSD-95, las sinapsis perforadas y la proteína Bassoon inducidos por Wnt.

De momento, desconocemos las vías de transducción de señales que podrían estar activando los agonistas en el presente modelo *in vivo*, sin embargo, nuestros datos muestran un incremento significativo de  $\beta$ -catenina activa inducido tanto por Wnt7a como por Wnt5a, así como una disminución inducida por Dkk-1. Aunque Wnt5a es principalmente considerado como un ligando no canónico, puede transducir señales no solo independientes de  $\beta$ -catenina sino también por vías que dependen de este efector clave, y que a su vez puede depender de los niveles y los tipos de receptores Fz y los correceptores asociados <sup>255,256</sup>. Con la exposición a los agonistas y al antagonista a largo plazo, encontramos también cambios en el estado de fosforilación de la proteína asociada a microtúbulos, Tau. Estos resultados sugieren que los agonistas podrían reducir la actividad de la cinasa GSK3B, lo cual reduce a su vez, la fosforilación de Tau en las Ser 199/202 y la Ser396. Esto sugiere un efecto benéfico de la activación de Wnt en la reducción de la hiperfosforilación de Tau que puede observarse en enfermedades como el Alzheimer <sup>257</sup>. De manera interesante, luego de la administración *in vivo* de Dkk-1, no observamos un incremento significativo en PHF-1 en comparación con los sujetos a quienes se les infundió el vehículo, lo cual, concuerda con uno de los trabajos previos del laboratorio, en el que encontraron que Dkk-1 no incrementa ese fosfoepítipo en secciones de hipocampo de sujetos jóvenes <sup>258</sup>. Los cambios en la tasa de fosforilación de tau pueden determinar la estabilidad de los microtúbulos y la plasticidad de los axones en el hipocampo adulto <sup>259</sup>. Es por ello, que sería importante conocer también los niveles totales de la proteína Tau, para evaluar a mayor detalle la tasa de fosforilación con respecto a cada epítipo estudiado en el presente trabajo.

La remodelación estructural puede subyacer ciertos aspectos del aprendizaje y la memoria al reorganizar los contactos sinápticos en los circuitos locales. Por ello, en este trabajo evaluamos el desempeño en una tarea de memoria dependiente de hipocampo para analizar los efectos de los cambios estructurales en el rendimiento conductual en esta tarea. De

manera interesante, los sujetos a los que se les infundió Wnt5a estuvieron más activos en el campo abierto, pero se comportaron de manera similar a los sujetos del grupo control en la tarea de RLO. Además, el tratamiento crónico con Wnt7a no se asoció con una mejora en el desempeño, pero esos sujetos desplegaron una mayor actividad en el centro de la arena, lo que sugiere que ambos agonistas podrían reducir la ansiedad. Sin embargo, en presencia de Dkk-1 se observó un efecto inhibitor en la evocación de la memoria similar a lo reportado en un paradigma de reconocimiento de objeto novedoso luego de una sola aplicación en el hipocampo <sup>250</sup>, así como en una tarea de memoria espacial luego de la expresión inducible de Dkk-1 <sup>260</sup>, como lo muestran los resultados de este trabajo, indicando la función de la activación de la vía Wnt canónica en la consolidación de la memoria.

Aunado a lo anterior, la neurogénesis en el hipocampo adulto de varias especies de mamíferos representa una forma de plasticidad sináptica. Por lo que, representa un área de interés enfocada en el descubrimiento de las señales internas y externas que podrían estar involucradas en su regulación. Se ha estudiado la función de la vía Wnt en la neurogénesis en el cerebro adulto, en términos de sus efectos en el mantenimiento de células progenitoras y células troncales en el adulto <sup>215</sup>, así como, en los progenitores neurales en proliferación <sup>224</sup>. Con el paradigma de la infusión crónica de Wnt7a, Wnt5a y Dkk-1, proveemos evidencia nueva de los efectos diferenciales derivados de la modulación de Wnt en la tasa de neurogénesis, así como en el desarrollo y la maduración de neuritas, lo que en conjunto podría afectar la plasticidad en el hipocampo al mediar la integración de las neuronas nuevas a circuitos neuronales preexistentes. En este trabajo se muestra que mientras que el agonista canónico Wnt7a incrementa moderadamente el número de neuronas nuevas con dendritas largas y más ramificadas, el ligando no canónico, Wnt5a, incrementó mayormente el número de neuronas nuevas, particularmente en la región de la cresta del GD. No obstante, los análisis morfológicos también revelaron que Wnt5a no solo incrementa la tasa de neuronas nuevas, sino que también produce un patrón aberrante en el crecimiento de las neuritas. Dado que Wnt5a actúa como una molécula repulsiva durante el desarrollo neuronal <sup>261</sup>, y en cultivos corticales de neuronas <sup>114</sup>, los presentes resultados sugieren que el patrón de expresión de Wnt5a podrían ser un factor importante que dirige el patrón de crecimiento de las dendritas de las neuronas recién nacidas en el hipocampo adulto, influyendo, por tanto, en su conectividad y funcionalidad. Aún más, las vías canónica y no canónicas de Wnt pueden tener funciones específicas en cada etapa de la neurogénesis en el adulto, con una notable transición de la

señalización durante la maduración, en la que vía Wnt/ $\beta$ -catenina tiene un papel determinante en la proliferación y la determinación del destino de células granulares, mientras que la vía Wnt/PCP esta mayormente involucrada en la maduración morfológica y la diferenciación de los neuroblastos <sup>262</sup>. Estos efectos, podrían explicar los cambios estructurales en el desarrollo de las neuritas del GD de sujetos infundidos con Wnt5a. Por otra parte, efectos similares a los observados en este trabajo inducidos por la exposición a Wnt5a, se han reportado como consecuencia de un estado epiléptico inducido experimentalmente, en el que se ha encontrado un aumento en número de neuronas nuevas con un patrón alterado de sus procesos <sup>263</sup>. Trabajos previos han mostrado que la activación de Wnt mediada por Wnt3 y Wnt5 modula la actividad en el hipocampo <sup>264</sup>, e incrementa la transmisión sináptica y el número de EPSPs en secciones de hipocampo <sup>265</sup>. Por lo tanto, basados en esas evidencias, es posible especular que la microinfusión crónica de Wnt5a podría incrementar la excitabilidad basal en el hipocampo, y participar en el desarrollo de patrones anormales en el crecimiento de las neuritas.

Contrario a lo que se esperaba, la infusión del antagonista de la vía Wnt canónica, Dkk-1, no inhibió la proliferación celular, por el contrario, los resultados de este trabajo mostraron que dicho tratamiento generó un ligero incremento en el número de células nuevas con procesos mal orientados, localizados en la región del hilus del GD, similares, pero en un menor grado a los efectos que desplegó la exposición crónica a Wnt5a. Aunque se ha mostrado la influencia de los niveles incrementados de Dkk-1 en condiciones de neurodegeneración como la enfermedad de Alzheimer <sup>238</sup>, en otros contextos como durante el desarrollo, Dkk-1 participa de manera importante en la proliferación del neuroectodermo anterior <sup>266</sup>, e incrementa el número de células ciliadas en el humano <sup>267</sup>. Dkk-1 inhibe la señalización Wnt canónica mediante su acoplamiento al correceptor LRP-6, pero carece de propiedades inhibitorias sobre las vías no canónicas de Wnt. Por lo que, la infusión de Dkk-1 podría bloquear la señalización canónica endógena de Wnt sin afectar la estimulación endógena de las vías no canónicas mediadas por Wnt5a, lo que podría explicar los efectos similares entre Dkk-1 y Wnt5a en el desarrollo de neuritas. En conjunto, los presentes resultados sugieren que la proliferación y la maduración neuronales en el nicho neurogénico del hipocampo de la rata adulta dependen en un balance finamente regulado entre la activación e inhibición de las vías canónica y no canónicas Wnt.

Otro aspecto importante encontrado en este trabajo es que la infusión crónica de Wnt7a no produjo la proliferación significativa de astrocitos, en contraste, Wnt5a y,



particularmente, Dkk-1, incrementaron significativamente el número de células gliales en el GD. Una posibilidad interesante respecto a esto, es explorar si los ligandos Wnt producen la activación de los astrocitos *in vivo*, de manera que les permite secretar moléculas neuro activas y con propiedades de neuroprotección que podrían contribuir al fortalecimiento de respuestas de plasticidad, como se ha propuesto recientemente <sup>268</sup>.

## 10. CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados derivados de este trabajo experimental proveen evidencia nueva que sugiere que los circuitos maduros que conforman el hipocampo pueden modificarse a distintos niveles por agonistas y antagonistas de la señalización Wnt, los cuales pueden afectar tanto la estructura de las sinapsis como el desempeño conductual en tareas relacionadas con esa región particularmente plástica del sistema nervioso central. Además, estos resultados se suman a las evidencias de los efectos positivos de la estimulación de Wnt para promover la expresión de moléculas que inducen cambios plásticos, y en la reducción de la hiperfosforilación de proteínas estructurales como tau, ampliamente relacionada con enfermedades neurodegenerativas.

## 11. REFERENCIAS

1. Salinas, P. C. Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1295–8 (2005).
2. Salinas, P. C. Signaling at the vertebrate synapse: New roles for embryonic morphogens? *J. Neurobiol.* **64**, 435–445 (2005).
3. Speese, S. D. & Budnik, V. Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci.* **30**, 268–75 (2007).
4. van Amerongen, R. & Nusse, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205–14 (2009).
5. Budnik, V. & Salinas, P. C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 151–9 (2011).
6. Hall, A. C., Lucas, F. R. & Salinas, P. C. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* **100**, 525–35 (2000).
7. Krylova, O. *et al.* WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* **35**, 1043–56 (2002).
8. Purro, S. A. *et al.* Wnt Regulates Axon Behavior through Changes in Microtubule Growth Directionality: A New Role for Adenomatous Polyposis Coli. *J. Neurosci.* **28**, 8644–8654 (2008).
9. Varela-Nallar, L., Alfaro, I. E., Serrano, F. G., Parodi, J. & Inestrosa, N. C. Wingless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 21164–21169 (2010).
10. Farías, G. G. *et al.* Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **284**, 15857–66 (2009).
11. Cuitino, L. *et al.* Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **30**, 8411–20 (2010).
12. Shimogori, T., VanSant, J., Paik, E. & Grove, E. A. Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **473**, 496–510 (2004).
13. Chacón, M. A., Varela-Nallar, L. & Inestrosa, N. C. Frizzled-1 is involved in the neuroprotective effect of Wnt3a against A $\beta$  oligomers. *J. Cell. Physiol.* **217**, 215–227 (2008).
14. De Ferrari, G. V & Inestrosa, N. C. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**, 1–12 (2000).
15. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781–810 (2004).
16. De Ferrari, G. V & Moon, R. T. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent

- neurological disorders. *Oncogene* **25**, 7545–53 (2006).
17. Lovestone, S., Killick, R., Di Forti, M. & Murray, R. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends Neurosci.* **30**, 142–149 (2007).
  18. Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 45–51 (2007).
  19. Inestrosa, N. C. & Arenas, E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 77–86 (2010).
  20. Miller, J. R. The Wnts. *Genome Biol.* **3**, REVIEWS3001 (2002).
  21. Sharma, R. P. & Chopra, V. L. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **48**, 461–5 (1976).
  22. Nusse, R. *et al.* A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* **64**, 231 (1991).
  23. Dale, T. C. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* **329 ( Pt 2)**, 209–23 (1998).
  24. Smolich, B. D., McMahon, J. A., McMahon, A. P. & Papkoff, J. Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1267–75 (1993).
  25. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448–452 (2003).
  26. Takada, R. *et al.* Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Dev. Cell* **11**, 791–801 (2006).
  27. Coudreuse, D. & Korswagen, H. C. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development* **134**, 3–12 (2007).
  28. Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T. & Kikuchi, A. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* **12**, 521–34 (2007).
  29. Willert, K. & Nusse, R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–14 (2012).
  30. Bradley, R. S. & Brown, A. M. The proto-oncogene int-1 encodes a secreted protein associated with the extracellular matrix. *EMBO J.* **9**, 1569–75 (1990).
  31. Reichsman, F., Smith, L. & Cumberledge, S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J. Cell Biol.* **135**, 819–27 (1996).
  32. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/??-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26 (2009).
  33. He, X. *et al.* LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530–535 (2000).

34. Skarnes, W. C., Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S. & Avery, B. J. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535–538 (2000).
35. Wehrli, M. *et al.* arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* **407**, 527–30 (2000).
36. Cadigan, K. M. & Liu, Y. I. Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* **119**, 395–402 (2006).
37. Kestler, H. A. & Kühl, M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **363**, 1333–47 (2008).
38. Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–205 (2012).
39. Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 767–779 (2012).
40. Schulte, G. & Bryja, V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 518–525 (2007).
41. Wang, Y., Chang, H., Rattner, A. & Nathans, J. Frizzled Receptors in Development and Disease. in *Current topics in developmental biology* **117**, 113–139 (2016).
42. Grumolato, L. *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* **24**, 2517–2530 (2010).
43. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. & Kikuchi, A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* **29**, 41 LP-54 (2010).
44. Nishita, M. *et al.* Ror2/Frizzled Complex Mediates Wnt5a-Induced AP-1 Activation by Regulating Dishevelled Polymerization. *Mol. Cell Biol.* **30**, 3610–3619 (2010).
45. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: Arrows point the way. *Development* **131**, 1663–1677 (2004).
46. Bovolenta, P., Rodriguez, J. & Esteve, P. Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* **133**, 4399–4408 (2006).
47. Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. & Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* **121**, 737–746 (2008).
48. Ho, H.-Y. H. *et al.* Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4044–4051 (2012).
49. van Amerongen, R., Mikels, A. & Nusse, R. Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors. *Sci. Signal.* **1**, re9-re9 (2008).
50. Eubelen, M. *et al.* A molecular mechanism for Wnt ligand-specific signaling. *Science* **361**, eaat1178 (2018).

51. Liu, G., Bafico, A. & Aaronson, S. A. The Mechanism of Endogenous Receptor Activation Functionally Distinguishes Prototype Canonical and Noncanonical Wnts. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3475–3482 (2005).
52. Baarsma, H. A., Königshoff, M. & Gosens, R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol. Ther.* **138**, 66–83 (2013).
53. Kühl, M. *et al.* Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech. Dev.* **106**, 61–76 (2001).
54. Smit, L. *et al.* Wnt Activates the Tak1/Nemo-like Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 17232–17240 (2004).
55. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850 (2005).
56. Grumolato, L. *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* **24**, 2517–2530 (2010).
57. Hsieh, J. C., Rattner, A., Smallwood, P. M. & Nathans, J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3546–51 (1999).
58. Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. & Graff, J. M. Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**, 345–50 (1999).
59. Sun, T.-Q. *et al.* PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* **3**, 628–636 (2001).
60. Gao, C. & Chen, Y.-G. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell. Signal.* **22**, 717–727 (2010).
61. Liu, T. *et al.* G Protein Signaling from Activated Rat Frizzled-1 to the beta -Catenin-Lef-Tcf Pathway. *Science (80-. ).* **292**, 1718–1722 (2001).
62. Kilander, M. B., Dijksterhuis, J. P., Ganji, R. S., Bryja, V. & Schulte, G. WNT-5A stimulates the GDP/GTP exchange at pertussis toxin-sensitive heterotrimeric G proteins. *Cell. Signal.* **23**, 550–554 (2011).
63. Davidson, G. *et al.* Casein kinase 1  $\gamma$  couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**, 867–872 (2005).
64. Zeng, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* **438**, 873–877 (2005).
65. Swiatek, W. *et al.* Negative regulation of LRP6 function by casein kinase I epsilon phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 12233–41 (2006).
66. Wan, M. *et al.* Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev.* **22**, 2968–79 (2008).

67. Chen, M. *et al.* G Protein-coupled Receptor Kinases Phosphorylate LRP6 in the Wnt Pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 35040–35048 (2009).
68. Niehrs, C. & Shen, J. Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2551–62 (2010).
69. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**, 3797–804 (1997).
70. Piao, S. *et al.* Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling. *PLoS One* **3**, e4046 (2008).
71. Niehrs, C. & Acebron, S. P. Wnt Signaling: Multivesicular Bodies Hold GSK3 Captive. *Cell* **143**, 1044–1046 (2010).
72. Taelman, V. F. *et al.* Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* **143**, 1136–48 (2010).
73. Vinyoles, M. *et al.* Multivesicular GSK3 sequestration upon Wnt signaling is controlled by p120-catenin/cadherin interaction with LRP5/6. *Mol. Cell* **53**, 444–57 (2014).
74. Ding, V. W., Chen, R.-H. & McCormick, F. Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  by Insulin and Wnt Signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 32475–32481 (2000).
75. Oloumi, A., Syam, S. & Dedhar, S. Modulation of Wnt3a-mediated nuclear beta-catenin accumulation and activation by integrin-linked kinase in mammalian cells. *Oncogene* **25**, 7747–57 (2006).
76. Pansters, N. A. M. *et al.* Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3 $\beta$ . *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 523–35 (2011).
77. Hsu, S. C., Galceran, J. & Grosschedl, R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4807–18 (1998).
78. Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. & Grosschedl, R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev.* **5**, 880–94 (1991).
79. van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D. & Clevers, H. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* **10**, 123–32 (1991).
80. Korinek, V. *et al.* Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1248–56 (1998).
81. Arce, L., Yokoyama, N. N. & Waterman, M. L. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492–7504 (2006).
82. Cavallo, R. A. *et al.* Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling

- activity. *Nature* **395**, 604–8 (1998).
83. Roose, J. *et al.* The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* **395**, 608–612 (1998).
  84. Daniels, D. L. & Weis, W. I. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 364–71 (2005).
  85. Bowman, A. & Nusse, R. Location, Location, Location: FoxM1 Mediates  $\beta$ -Catenin Nuclear Translocation and Promotes Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell* **20**, 415–416 (2011).
  86. Kimelman, D. & Xu, W.  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* **25**, 7482–7491 (2006).
  87. Rosso, S. B. & Inestrosa, N. C. WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 103 (2013).
  88. Inestrosa, N. C. & Varela-Nallar, L. Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 64–74 (2014).
  89. Lambert, C., Cisternas, P. & Inestrosa, N. C. Role of Wnt Signaling in Central Nervous System Injury. *Mol. Neurobiol.* **53**, 2297–2311 (2016).
  90. Ortiz-Matamoros, A., Salcedo-Tello, P., Avila-Munoz, E., Zepeda, A. & Arias, C. Role of Wnt Signaling in the Control of Adult Hippocampal Functioning in Health and Disease: Therapeutic Implications. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 465–476 (2013).
  91. Li, Z., Van Aelst, L. & Cline, H. T. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat. Neurosci.* **3**, 217–225 (2000).
  92. Simons, M. & Mlodzik, M. Planar Cell Polarity Signaling: From Fly Development to Human Disease. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 517–540 (2008).
  93. De, A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **43**, 745–756 (2011).
  94. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. & Matsumoto, S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. in *International review of cell and molecular biology* **291**, 21–71 (2011).
  95. Sokol, S. Y. Spatial and temporal aspects of Wnt signaling and planar cell polarity during vertebrate embryonic development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **42**, 78–85 (2015).
  96. Berger, H. *et al.* PTK7 localization and protein stability is affected by canonical Wnt ligands. *J. Cell Sci.* **130**, 1890–1903 (2017).
  97. Ridley, A. J. Rho: theme and variations. *Curr. Biol.* **6**, 1256–64 (1996).
  98. Jaffe, A. B. & Hall, A. RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269 (2005).

99. Schlessinger, K., Hall, A. & Tolwinski, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* **23**, 265–277 (2009).
100. Weber, U., Pataki, C., Mihaly, J. & Mlodzik, M. Combinatorial signaling by the Frizzled/PCP and Egfr pathways during planar cell polarity establishment in the *Drosophila* eye. *Dev. Biol.* **316**, 110–123 (2008).
101. Esufali, S. & Bapat, B. Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **23**, 8260–71 (2004).
102. Wu, X. *et al.* Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of  $\beta$ -catenin during Canonical Wnt Signaling. *Cell* **133**, 340–353 (2008).
103. Wang, Q. *et al.* A Novel Role for Wnt/Ca<sup>2+</sup> Signaling in Actin Cytoskeleton Remodeling and Cell Motility in Prostate Cancer. *PLoS One* **5**, e10456 (2010).
104. Kühl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. & Moon, R. T. The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279–83 (2000).
105. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–2232 (2003).
106. Feske, S., Okamura, H., Hogan, P. G. & Rao, A. Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1117–32 (2003).
107. Semenov, M. V., Habas, R., MacDonald, B. T. & He, X. SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**, 1378.e1-1378.e2 (2007).
108. Montcouquiol, M., Crenshaw, E. B. & Kelley, M. W. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 363–86 (2006).
109. Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2625–34 (1995).
110. Blumenthal, A. *et al.* The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* **108**, 965–73 (2006).
111. Pereira, C., Schaer, D. J., Bachli, E. B., Kurrer, M. O. & Schoedon, G. Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 504–510 (2008).
112. He, X. *et al.* A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652–4 (1997).
113. Mikels, A. J. & Nusse, R. Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits  $\beta$ -Catenin–TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biol.* **4**, e115 (2006).



114. Li, L., Hutchins, B. I. & Kalil, K. Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms. *J. Neurosci.* **29**, 5873–83 (2009).
115. Gao, B. *et al.* Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Dev. Cell* **20**, 163–176 (2011).
116. Cruciat, C.-M. & Niehrs, C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a015081–a015081 (2013).
117. Kawano, Y. & Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627–34 (2003).
118. Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Hofmann, K. & Bucher, P. The frizzled motif: in how many different protein families does it occur? *Trends Biochem. Sci.* **23**, 415–7 (1998).
119. Xavier, C. P. *et al.* Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell. Signal.* **26**, 94–101 (2014).
120. Chuman, Y. *et al.* Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1. *Peptides* **25**, 1831–1838 (2004).
121. Häusler, K. D. *et al.* Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 1873–81 (2004).
122. Rodriguez, J. *et al.* SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat. Neurosci.* **8**, 1301–1309 (2005).
123. Lee, J.-L., Chang, C.-J., Chueh, L.-L. & Lin, C.-T. Secreted Frizzled Related Protein 2 (sFRP2) Decreases Susceptibility to UV-Induced Apoptosis in Primary Culture of Canine Mammary Gland Tumors by NF- $\kappa$ B Activation or JNK Suppression. *Breast Cancer Res. Treat.* **100**, 49–58 (2006).
124. Esteve, P. *et al.* SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **14**, 562–569 (2011).
125. Jones, S. E., Jomary, C., Grist, J., Stewart, H. J. & Neal, M. J. Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport* **11**, 3963–7 (2000).
126. Rubin, J. S., Barshishat-Kupper, M., Feroze-Merzoug, F. & Xi, Z. F. Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Front. Biosci.* **11**, 2093–105 (2006).
127. Esteve, P. & Bovolenta, P. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. *Toboku J. Exp. Med.* **221**, 11–7 (2010).
128. Krupnik, V. E. *et al.* Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* **238**, 301–13 (1999).
129. González-Sancho, J. M. *et al.* The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* **24**, 1098–103 (2005).

130. Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* **25**, 7469–7481 (2006).
131. Rao, T. P. & Kuhl, M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circ. Res.* **106**, 1798–1806 (2010).
132. Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A. & Aaronson, S. A. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* **3**, 683–6 (2001).
133. Mao, B. *et al.* LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321–325 (2001).
134. Semenov, M. V. *et al.* Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* **11**, 951–61 (2001).
135. Mao, B. *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature* **417**, 664–667 (2002).
136. Caricasole, A. *et al.* Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.* **24**, 6021–7 (2004).
137. Cappuccio, I. *et al.* Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J. Neurosci.* **25**, 2647–57 (2005).
138. Caraci, F. *et al.* The Wnt Antagonist, Dickkopf-1, as a Target for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Neurochem. Res.* **33**, 2401–2406 (2008).
139. Verkaar, F., Cadigan, K. M. & van Amerongen, R. Celebrating 30 Years of Wnt Signaling. *Sci. Signal.* **5**, mr2–mr2 (2012).
140. Ikeya, M., Lee, S. M., Johnson, J. E., McMahon, A. P. & Takada, S. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* **389**, 966–70 (1997).
141. Dorsky, R. I., Moon, R. T. & Raible, D. W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* **396**, 370–373 (1998).
142. Lyuksyutova, A. I. *et al.* Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. *Science* **302**, 1984–8 (2003).
143. Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L. & Grosschedl, R. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* **127**, 469–82 (2000).
144. Patapoutian, A. & Reichardt, L. F. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 392–9 (2000).
145. Lee, S. M., Tole, S., Grove, E. & McMahon, A. P. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* **127**, 457–67 (2000).

146. Kiecker, C. & Niehrs, C. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* **128**, 4189–201 (2001).
147. García-Castro, M. I., Marcelle, C. & Bronner-Fraser, M. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* **297**, 848–51 (2002).
148. Houart, C. *et al.* Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* **35**, 255–65 (2002).
149. Megason, S. G. & McMahon, A. P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* **129**, 2087–98 (2002).
150. Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H. & Takada, S. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes Dev.* **16**, 548–553 (2002).
151. Grove, E. A., Tole, S., Limon, J., Yip, L. & Ragsdale, C. W. The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* **125**, 2315–25 (1998).
152. Machon, O., van den Bout, C. J., Backman, M., Kemler, R. & Krauss, S. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* **122**, 129–43 (2003).
153. Ciani, L. & Salinas, P. C. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 351–62 (2005).
154. Dotti, C. G., Sullivan, C. A. & Banker, G. A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**, 1454–68 (1988).
155. Lucas, F. R. & Salinas, P. C. WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev. Biol.* **192**, 31–44 (1997).
156. Bodmer, D., Levine-Wilkinson, S., Richmond, A., Hirsh, S. & Kuruvilla, R. Wnt5a Mediates Nerve Growth Factor-Dependent Axonal Branching and Growth in Developing Sympathetic Neurons. *J. Neurosci.* **29**, 7569–7581 (2009).
157. Krylova, O., Messenger, M. J. & Salinas, P. C. Dishevelled-1 regulates microtubule stability: a new function mediated by glycogen synthase kinase-3beta. *J. Cell Biol.* **151**, 83–94 (2000).
158. Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M. J., Dale, T. C. & Salinas, P. C. A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* **164**, 243–253 (2004).
159. Rosso, S. B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A. & Salinas, P. C. Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci.* **8**, 34–42 (2005).
160. Fan, S., Ramirez, S. H., Garcia, T. M. & Dewhurst, S. Dishevelled promotes neurite

- outgrowth in neuronal differentiating neuroblastoma 2A cells, via a DIX-domain dependent pathway. *Mol. Brain Res.* **132**, 38–50 (2004).
161. Zhang, X. *et al.* Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat. Cell Biol.* **9**, 743–754 (2007).
  162. Berling, B. *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2a,b and MAP2c at Ser136 by proline-directed kinases in vivo and in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 120–30 (1994).
  163. Zhou, F.-Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.-H. & Snider, W. D. NGF-Induced Axon Growth Is Mediated by Localized Inactivation of GSK-3 $\beta$  and Functions of the Microtubule Plus End Binding Protein APC. *Neuron* **42**, 897–912 (2004).
  164. Ahmad-Annur, A. *et al.* Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.* **174**, 127–39 (2006).
  165. Dickins, E. M. & Salinas, P. C. Wnts in action: from synapse formation to synaptic maintenance. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
  166. Cline, H. T. Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 118–26 (2001).
  167. Scott, E. K. & Luo, L. How do dendrites take their shape? *Nat. Neurosci.* **4**, 359–65 (2001).
  168. Whitford, K. L., Dijkhuizen, P., Polleux, F. & Ghosh, A. Molecular Control of Cortical Dendrite Development. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 127–149 (2002).
  169. Jan, Y.-N. & Jan, L. Y. The control of dendrite development. *Neuron* **40**, 229–42 (2003).
  170. Yu, X. & Malenka, R. C. Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.* **6**, 1169–77 (2003).
  171. Wayman, G. A. *et al.* Activity-Dependent Dendritic Arborization Mediated by CaM-Kinase I Activation and Enhanced CREB-Dependent Transcription of Wnt-2. *Neuron* **50**, 897–909 (2006).
  172. Cerpa, W. *et al.* Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **283**, 5918–5927 (2008).
  173. Davis, E. K., Zou, Y. & Ghosh, A. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev.* **3**, 32 (2008).
  174. Ciani, L. *et al.* Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10732–7 (2011).
  175. Varela-Nallar, L., Grabowski, C. P., Alfaro, I. E., Alvarez, A. R. & Inestrosa, N. C. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev.* **4**, 41 (2009).

176. Sahores, M., Gibb, A. & Salinas, P. C. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development* **137**, 2215–25 (2010).
177. Paganoni, S., Bernstein, J. & Ferreira, A. Ror1-Ror2 complexes modulate synapse formation in hippocampal neurons. *Neuroscience* **165**, 1261–1274 (2010).
178. Han, K. & Kim, E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. *Prog. Neurobiol.* **84**, 263–283 (2008).
179. Varela-Nallar, L., Parodi, J., Fariás, G. G. & Inestrosa, N. C. Wnt-5a is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against A $\beta$  toxicity. *Neurodegener. Dis.* **10**, 23–6 (2012).
180. Beaumont, V. *et al.* Evidence for an enhancement of excitatory transmission in adult CNS by Wnt signaling pathway modulation. *Mol. Cell. Neurosci.* **35**, 513–524 (2007).
181. Kishida, S. *et al.* Dvl regulates endo- and exocytotic processes through binding to synaptotagmin. *Genes to Cells* **12**, 49–61 (2007).
182. Chen, J., Chang, S. P. & Tang, S. J. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 11910–11916 (2006).
183. Cerpa, W. *et al.* Wnt-5a occludes A $\beta$  oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Mol. Neurodegener.* **5**, 3 (2010).
184. Cerpa, W., Gambrell, A., Inestrosa, N. C. & Barria, A. Regulation of NMDA-receptor synaptic transmission by Wnt signaling. *J. Neurosci.* **31**, 9466–71 (2011).
185. Purro, S. A., Dickins, E. M. & Salinas, P. C. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid  $\beta$ -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.* **32**, 3492–8 (2012).
186. Tabatadze, N. *et al.* Wnt transmembrane signaling and long-term spatial memory. *Hippocampus* **22**, 1228–41 (2012).
187. Maguschak, K. A. & Ressler, K. J. Wnt Signaling in Amygdala-Dependent Learning and Memory. *J. Neurosci.* (2011). doi:10.1523/JNEUROSCI.3248-11.2011
188. Kempermann, G. & Gage, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found. Symp.* **231**, 220-35; discussion 235-41, 302–6 (2000).
189. Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* **22**, 629–34 (2002).
190. Scoville, W. B. & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **12**, 103–13 (2000).
191. Eriksson, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313–1317 (1998).
192. Zhao, C., Deng, W. & Gage, F. H. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell* **132**, 645–660 (2008).

193. Dupret, D. *et al.* Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* **5**, e214 (2007).
194. Shors, T. J. *et al.* Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* **410**, 372–376 (2001).
195. Clelland, C. D. *et al.* A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science (80-. )*. **325**, 210–213 (2009).
196. Sahay, A. *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **472**, 466–470 (2011).
197. Santarelli, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**, 805–9 (2003).
198. Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J. & Cameron, H. A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **476**, 458–461 (2011).
199. Faigle, R. & Song, H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 2435–2448 (2013).
200. Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* **386**, 493–495 (1997).
201. van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* **2**, 266–270 (1999).
202. Li, W.-L., Yu, S. P., Ogle, M. E., Ding, X. S. & Wei, L. Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Dev. Neurobiol.* **68**, 1474–1486 (2008).
203. Mattiesen, W.-R. C. *et al.* Increased neurogenesis after hypoxic-ischemic encephalopathy in humans is age related. *Acta Neuropathol.* **117**, 525–534 (2009).
204. Ming, G. & Song, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* **70**, 687–702 (2011).
205. Piatti, V. C. *et al.* The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J. Neurosci.* **31**, 7715–28 (2011).
206. van Praag, H. *et al.* Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030–4 (2002).
207. Mathews, E. A. *et al.* A Distinctive layering pattern of mouse dentate granule cells is generated by developmental and adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **518**, 4479–4490 (2010).
208. Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Ming, G.-L. & Gage, F. H. Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* **26**, 3–11 (2006).

209. Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S. & Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* **21**, 7153–60 (2001).
210. Kempermann, G., Wiskott, L. & Gage, F. H. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 186–191 (2004).
211. Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. & Bischofberger, J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* **429**, 184–187 (2004).
212. Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J. & Wojtowicz, J. M. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* **130**, 843–52 (2005).
213. Saxe, M. D. *et al.* Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 17501–17506 (2006).
214. Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G. & Song, H. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J. Physiol.* **586**, 3759–65 (2008).
215. Lie, D.-C. *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370–5 (2005).
216. Jang, M.-H. *et al.* Secreted frizzled-related protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans. *Mol. Psychiatry* **18**, 957–958 (2013).
217. Lie, D.-C. *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370–5 (2005).
218. Llorens-Martín, M. *et al.* GSK-3 $\beta$  overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol. Psychiatry* **18**, 451–460 (2013).
219. Qu, Q. *et al.* Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **12**, 31-40; sup pp 1–9 (2010).
220. Kaidanovich-Beilin, O., Milman, A., Weizman, A., Pick, C. G. & Eldar-Finkelman, H. Rapid antidepressive-like activity of specific glycogen synthase kinase-3 inhibitor and its effect on  $\beta$ -catenin in mouse hippocampus. *Biol. Psychiatry* **55**, 781–784 (2004).
221. Seib, D. R. M. *et al.* Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell* **12**, 204–14 (2013).
222. Zhang, C.-L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H. & Evans, R. M. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* **451**, 1004–7 (2008).
223. Gao, Z. *et al.* Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.* **12**, 1090–1092 (2009).
224. Kuwabara, T. *et al.* Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 1097–105 (2009).

225. Fuster-Matanzo, A. *et al.* Dual effects of increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity on adult neurogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1300–1315 (2013).
226. Sirerol-Piquer, M. *et al.* GSK3 $\beta$  overexpression induces neuronal death and a depletion of the neurogenic niches in the dentate gyrus. *Hippocampus* **21**, n/a-n/a (2010).
227. Karalay, O. *et al.* Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5807–5812 (2011).
228. Gao, X., Arlotta, P., Macklis, J. D. & Chen, J. Conditional Knock-Out of  $\beta$ -Catenin in Postnatal-Born Dentate Gyrus Granule Neurons Results in Dendritic Malformation. *J. Neurosci.* **27**, 14317–14325 (2007).
229. Mazumdar, J. *et al.* O2 regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nat. Cell Biol.* **12**, 1007–13 (2010).
230. Ortiz-Matamoros, A., Salcedo-Tello, P., Avila-Muñoz, E., Zepeda, A. & Arias, C. Role of wnt signaling in the control of adult hippocampal functioning in health and disease: therapeutic implications. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 465–76 (2013).
231. Vogel-Ciernia, A. & Wood, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **69**, 8.31.1-17 (2014).
232. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–5 (2012).
233. Longair, M. H., Baker, D. A. & Armstrong, J. D. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* **27**, 2453–4 (2011).
234. GRAY, E. G. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* **93**, 420–33 (1959).
235. Reynolds, C. P. *et al.* Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 375–87 (1986).
236. Liu, F. *et al.* Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur. J. Neurosci.* **26**, 3429–36 (2007).
237. Harris, K. M. & Weinberg, R. J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005587–a005587 (2012).
238. Caricasole, A. *et al.* Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.* **24**, 6021–7 (2004).
239. Nishita, M. *et al.* Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J. Cell Biol.* **175**, 555–62 (2006).
240. Ohno, S. Extrinsic Wnt signalling controls the polarity component aPKC. *Nat. Cell Biol.* **9**, 738–40 (2007).



241. Chen, C.-M. *et al.* Wnt5a is essential for hippocampal dendritic maintenance and spatial learning and memory in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E619–E628 (2017).
242. Ramírez, V. T., Ramos-Fernández, E., Henríquez, J. P., Lorenzo, A. & Inestrosa, N. C. Wnt-5a/Frizzled9 Receptor Signaling through the G $\alpha$ -G $\beta$  $\gamma$  Complex Regulates Dendritic Spine Formation. *J. Biol. Chem.* **291**, 19092–107 (2016).
243. Migaud, M. *et al.* Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nat. www.nature.com* **396**, (1998).
244. Béïque, J.-C. & Andrade, R. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol.* **546**, 859–67 (2003).
245. Takumi, Y., Ramírez-León, V., Laake, P., Rinvik, E. & Ottersen, O. P. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* **2**, 618–24 (1999).
246. Ehrlich, I. Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* (2004). doi:10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004
247. Ivanova, O. Y. *et al.* Lentiviral Modulation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Affects In Vivo LTP. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1–15 (2016). doi:10.1007/s10571-016-0455-z
248. Babits, R., Szőke, B., Sótonyi, P. & Rácz, B. Food restriction modifies ultrastructure of hippocampal synapses. *Hippocampus* **26**, 437–44 (2016).
249. Stewart, M. G. *et al.* Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 3368–78 (2005).
250. Fortress, A. M., Schram, S. L., Tuscher, J. J. & Frick, K. M. Canonical Wnt signaling is necessary for object recognition memory consolidation. *J. Neurosci.* **33**, 12619–26 (2013).
251. Clarke, G. L., Chen, J. & Nishimune, H. Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 12 (2012).
252. Davydova, D. *et al.* Bassoon Specifically Controls Presynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels via RIM-Binding Protein. *Neuron* **82**, 181–194 (2014).
253. Bednarek, E. & Caroni, P.  $\beta$ -Adducin is required for stable assembly of new synapses and improved memory upon environmental enrichment. *Neuron* **69**, 1132–46 (2011).
254. Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y. & Caroni, P. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* **62**, 510–25 (2009).
255. Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H. & Kikuchi, A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* **29**, 41–54 (2010).

256. Kumawat, K. & Gosens, R. WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 567–87 (2016).
257. Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E.-M. & Hyman, B. T. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **103**, 26–35 (2002).
258. Salcedo-Tello, P., Hernández-Ortega, K. & Arias, C. Susceptibility to GSK3 $\beta$ -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition. *J. Alzheimers. Dis.* **39**, 775–85 (2014).
259. Regan, P. *et al.* Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J. Neurosci.* **35**, 4804–12 (2015).
260. Marzo, A. *et al.* Reversal of Synapse Degeneration by Restoring Wnt Signaling in the Adult Hippocampus. *Curr. Biol.* **26**, 2551–2561 (2016).
261. Wu, Y. *et al.* Wnt5 and Drl/Ryk Gradients Pattern the Drosophila Olfactory Dendritic Map. *J. Neurosci.* **34**, 14961–14972 (2014).
262. Schafer, S. T. *et al.* The Wnt Adaptor Protein ATP6AP2 Regulates Multiple Stages of Adult Hippocampal Neurogenesis. *J. Neurosci.* **35**, 4983–4998 (2015).
263. Parent, J. M. *et al.* Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* **17**, 3727–38 (1997).
264. Oliva, C. A. & Inestrosa, N. C. A novel function for Wnt signaling modulating neuronal firing activity and the temporal structure of spontaneous oscillation in the entorhinal-hippocampal circuit. *Exp. Neurol.* **269**, 43–55 (2015).
265. Parodi, J. *et al.* Wnt5a inhibits K<sup>+</sup> currents in hippocampal synapses through nitric oxide production. *Mol. Cell. Neurosci.* **68**, 314–322 (2015).
266. Hashimoto, H. *et al.* Zebrafish Dkk1 Functions in Forebrain Specification and Axial Mesendoderm Formation. *Dev. Biol.* **217**, 138–152 (2000).
267. Schmid, A. *et al.* Modulation of Wnt signaling is essential for the differentiation of ciliated epithelial cells in human airways. *FEBS Lett.* **591**, 3493–3506 (2017).
268. Gonzalez, P. & Rodríguez, F. J. Analysis of the expression of the Wnt family of proteins and its modulatory role on cytokine expression in non activated and activated astroglial cells. *Neurosci. Res.* **114**, 16–29 (2017).
269. Paxinos G, Watson C. 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Elsevier Ltd. USA

## 12. ANEXOS

# Role of Wnt Signaling in the Control of Adult Hippocampal Functioning in Health and Disease: Therapeutic Implications

Abril Ortiz-Matamoros, Pamela Salcedo-Tello, Evangelina Avila-Muñoz, Angélica Zepeda and Clorinda Arias\*

*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F*

**Abstract:** It is well recognized the role of the Wnt pathway in many developmental processes such as neuronal maturation, migration, neuronal connectivity and synaptic formation. Growing evidence is also demonstrating its function in the mature brain where it is associated with modulation of axonal remodeling, dendrite outgrowth, synaptic activity, neurogenesis and behavioral plasticity. Proteins involved in Wnt signaling have been found expressed in the adult hippocampus suggesting that Wnt pathway plays a role in the hippocampal function through life. Indeed, Wnt ligands act locally to regulate neurogenesis, neuronal cell shape and pre- and postsynaptic assembly, events that are thought to underlie changes in synaptic function associated with long-term potentiation and with cognitive tasks such as learning and memory. Recent data have demonstrated the increased expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1 (DKK1) in brains of Alzheimer's disease (AD) patients suggesting that dysfunction of Wnt signaling could also contribute to AD pathology. We review here evidence of Wnt-associated molecules expression linked to physiological and pathological hippocampal functioning in the adult brain. The basic aspects of Wnt-related mechanisms underlying hippocampal plasticity as well as evidence of how hippocampal dysfunction may rely on Wnt dysregulation is analyzed. This information would provide some clues about the possible therapeutic targets for developing treatments for neurodegenerative diseases associated with aberrant brain plasticity.

**Keywords:** Alzheimer's disease, Hippocampal plasticity, neurodegeneration, neurogenesis, neurorepair, Wnt signaling.

## INTRODUCTION

The mature brain undergoes continuous morphological changes in response to external and internal stimuli through the turnover and reorganization of neuronal networks and synapses [1-3]. These morphological adjustments determine the ability of neurons to incorporate new information from the internal and external environment and largely depend on the proper functioning of a variety of signaling pathways that control neuronal circuitry activity and neuronal shape. The secreted Wnt signaling proteins activate a variety of signaling pathways that modulate neuronal connectivity through downstream molecules involved in a number of physiological processes ranging from cellular morphology to gene expression [4]. All signaling events implicated in the Wnt pathway must occur in a coordinate fashion so synaptic contacts remain dynamic in the adult brain thus allowing a continuous fine balance between synaptic formation and synapse disassembly [5]. The hippocampus is a critical plastic brain region where significant network changes occur underlying a lifelong synaptic remodeling according to experience [3,6,7]. The hippocampus is particularly enriched in signaling molecules that influence

many aspects of structural plasticity and network dynamics [8-11] besides being one of the two active neurogenic regions in the adult brain. The hippocampus is one of the most affected structures in pathological aging and emerging evidence has revealed a significant role of dysrupted Wnt signaling in the mechanisms of neuronal death and dysfunctional plasticity subserving neurodegenerative conditions such as AD [12] and frontotemporal dementia (FTD) [13].

## Wnt Signaling Pathways

Wnts are secreted cysteine-rich glycosylated and lipid modified proteins [14]. Palmitoylation at a conserved cysteine seems to be essential for Wnt signaling since removing the palmitate group or mutations in the cysteine residues result in loss of Wnt activity [15]. There are 19 Wnt genes identified in mammals, including human [16] with molecular sizes ranging from 39 kDa to 46 kDa [17]. Wnt signaling starts mainly by interaction of Wnt ligands to one of the 19 types of Frizzled (Fz) receptors. Wnt transduction pathways are complex and even when they have been studied as linear signaling cascades, it has been recently suggested that all Wnt pathways should be considered as part of an integrated cellular signaling network where different intracellular and extracellular stimuli converge [18]. The best characterized Wnt signaling is the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin. In the absence of Wnt ligand, cytoplasmic  $\beta$ -catenin protein is degraded by the action of a complex composed of scaffolding axin

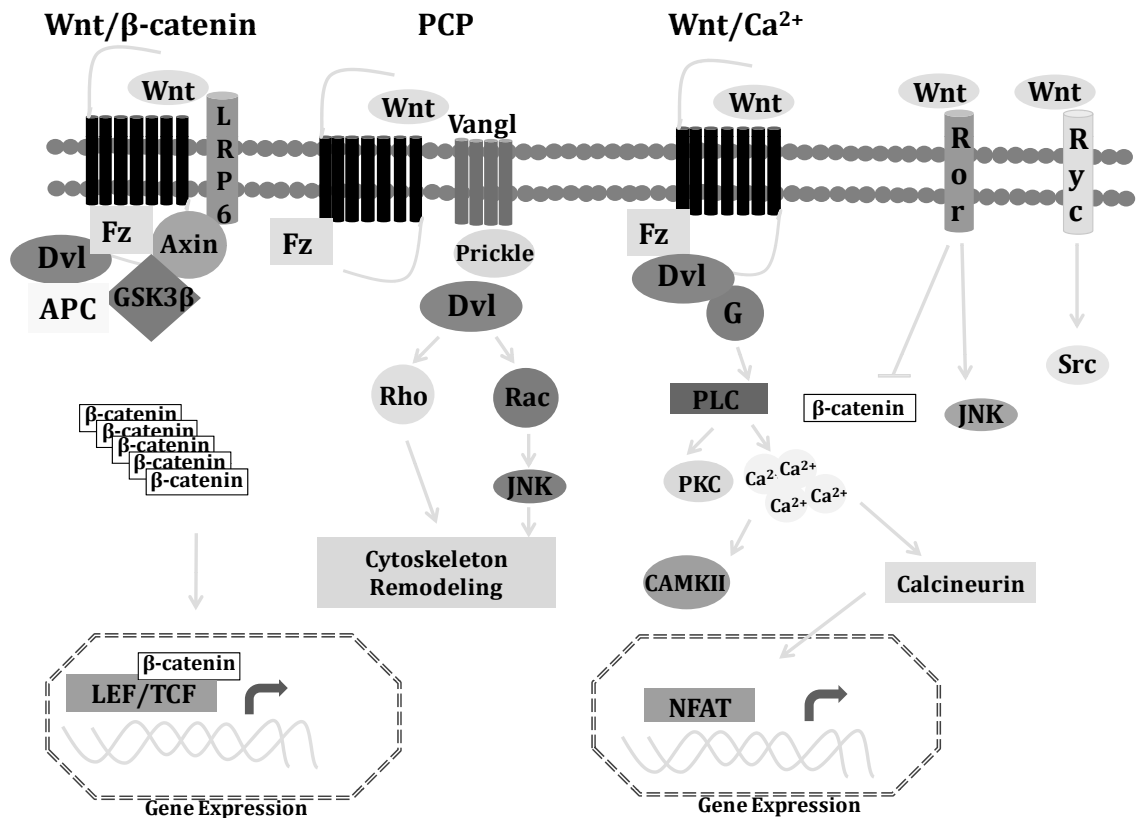
\*Address correspondence to this author at the Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-228, 04510 México, DF, México; Tel: +52 55 56229215; Fax: +52 55 56229182; E-mail: [carias@servidor.unam.mx](mailto:carias@servidor.unam.mx)

protein, tumor suppressor adenomatous polyposis coli gene product (APC), casein kinase 1 (CK1), and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) [19]. CK1 phosphorylates Ser45 of  $\beta$ -catenin priming the subsequent phosphorylation of GSK3 on Ser33/37/41. Phosphorylated  $\beta$ -catenins are recognized by the E3 ubiquitin ligase  $\beta$ -Trcp, which targets  $\beta$ -catenins for proteasomal degradation. Extracellular Wnt ligands bind to the seven-pass transmembrane receptor Fz and the low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) co-receptor. Wnt-Fz-LRP5/6 complex recruits the scaffolding protein dishevelled (Dvl) and axin on the plasma membrane leading to GSK3 inactivation. Without GSK3 phosphorylation,  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm and enters the nucleus, where it binds members of the lymphoid enhancer-binding factor/T cell-specific transcription factor (LEF/TCF) family and activates Wnt target genes expression [14]. Although the molecular mechanism of GSK3 $\beta$  inhibition is not completely understood, Wnt signaling has recently been reported to trigger the sequestration of GSK3 $\beta$  from the cytosol to multivesicular organelles, preventing its interaction with cytoplasmic substrates [20]. Another Wnt signaling pathway, the Wnt/PCP depends of Fz and Dvl to activate Rho GTPases and the Jun N-Terminal kinase (JNK). PCP components include Fz receptors, and the four-pass transmembrane protein Van Gogh like 2 (Vangl1/2), Celsr1, 2 and 3, prickle and Dvl. Downstream these molecular elements, the PCP pathway acts through Rho and Rac small GTPases to control cytoskeleton remodeling and Jun N-Terminal

kinase (JNK) to regulate gene expression [21]. Wnt ligands can also induce the release of calcium from intracellular stores, probably *via* heterotrimeric G-proteins in the so-called Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway [22]. Wnt signaling through Fz receptor and Dvl mediates the activation of phospholipase C (PLC). PLC cleaves phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) into diacylglycerol (DAG) and inositol 1, 2,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> diffuses through the cytosol and interacts with endoplasmic reticulum calcium channels, resulting in the release of calcium ions and activation of the calcium calmodulin-dependent protein kinase II (CAMKII). DAG and calcium ions activate protein kinase C (PKC) [23]. PKC has several downstream intracellular targets including the nuclear transcription factors NF $\kappa$ B and cAMP responsive element-binding (CREB). CAMKII promotes the nuclear import of cytoplasmic protein nuclear factor associated with T cells (NFAT), which induces the expression of several genes.

In addition to Fz receptors and LRP5/6, Wnt ligands can also bind to single-pass transmembrane receptor tyrosine kinase (RTKs) of the Ryk and Ror families [24]. Wnt signaling through Ryk leads to the activation of Src proteins, and Wnt binding to Ror2 can inhibit  $\beta$ -catenin/TCF complexes and activate JNK [18]. Wnt4, Wnt5a and Wnt11 have been identified as activators of the non-canonical Wnt pathways (Fig. 1).

In the hippocampus several Wnt and Fz receptors have been found to be expressed throughout life. In the rat, Wnt4,



**Fig. (1).** Schematic representation of Wnt signaling pathways. Wnt proteins activate several signaling pathways. A PC, a denomatous polyposis coli; Dvl, Dishevelled; Fz, Fzrizzled; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; LRP5/6, low density lipoprotein receptor related protein 5/6; CaMK, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; PKC, protein kinase C; Ror, receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1/2; Tcf/Lef, T-cell factor/lymphoid enhancer factor.

Wnt5a, Wnt7a, Wnt8b and Wnt11 are present in hippocampal neurons from the embryonic stages to the adult stage [25,26]. Particularly Wnt7b expression remains in the DG blades and also outlines the pyramidal cell layer of CA3 in the adulthood [25]. Also, Fz3, Fz5 and Fz8 are expressed during hippocampal development [27] while Wnt3, Wnt5, and Wnt7a/b, Fz1, Fz2, Fz5, Fz8 and Fz9 increase during hippocampal synaptogenesis [27, 28]. Fz9 has a selective expression pattern in the hippocampus and was found in both, neurons and astrocytes throughout life [29, 30]. The specific pattern of genes encoding Wnt ligands, receptors, and inhibitory proteins reported in the adult hippocampus evidences the potential role for Wnt signaling in broad hippocampal functions.

### Wnt Inhibitors

Wnt signaling is regulated by several types of secreted regulatory proteins, among the most well characterized are secreted Frizzled related protein (sFRP1 to sFRP5) [31,32], Dickkopf (DKK1 to DKK4) [33], and the Wnt-inhibitory factor 1 (WIF1) [34]. However, a variety of endogenous inhibitors such as WISE/SOST, Cerberus, IGFBP, Shisa, Wif1, APCDD1, and Tiki1 have also been described [reviewed in 35]. DKK1 interferes with Wnt canonical signaling preventing the binding of Wnt ligands to LRP5/6 coreceptors. WIF1 and sFRPs were initially found as Wnt scavengers that bind to Wnts and prevent Wnt-Fz activation [36]. Recently, sFRPs have been shown to act as counterparts of Wnt signaling gain-of- and loss-of-function experiments [reviewed in 37]. It should be noted that other functions of some sFRPs have been reported, such as the regulation of axon guidance by binding to Fz receptors [38]. It has been demonstrated that DKK1 induction is dependent upon induction by c-Jun [39] and p53, which is a sensor of DNA damage in cells [40].

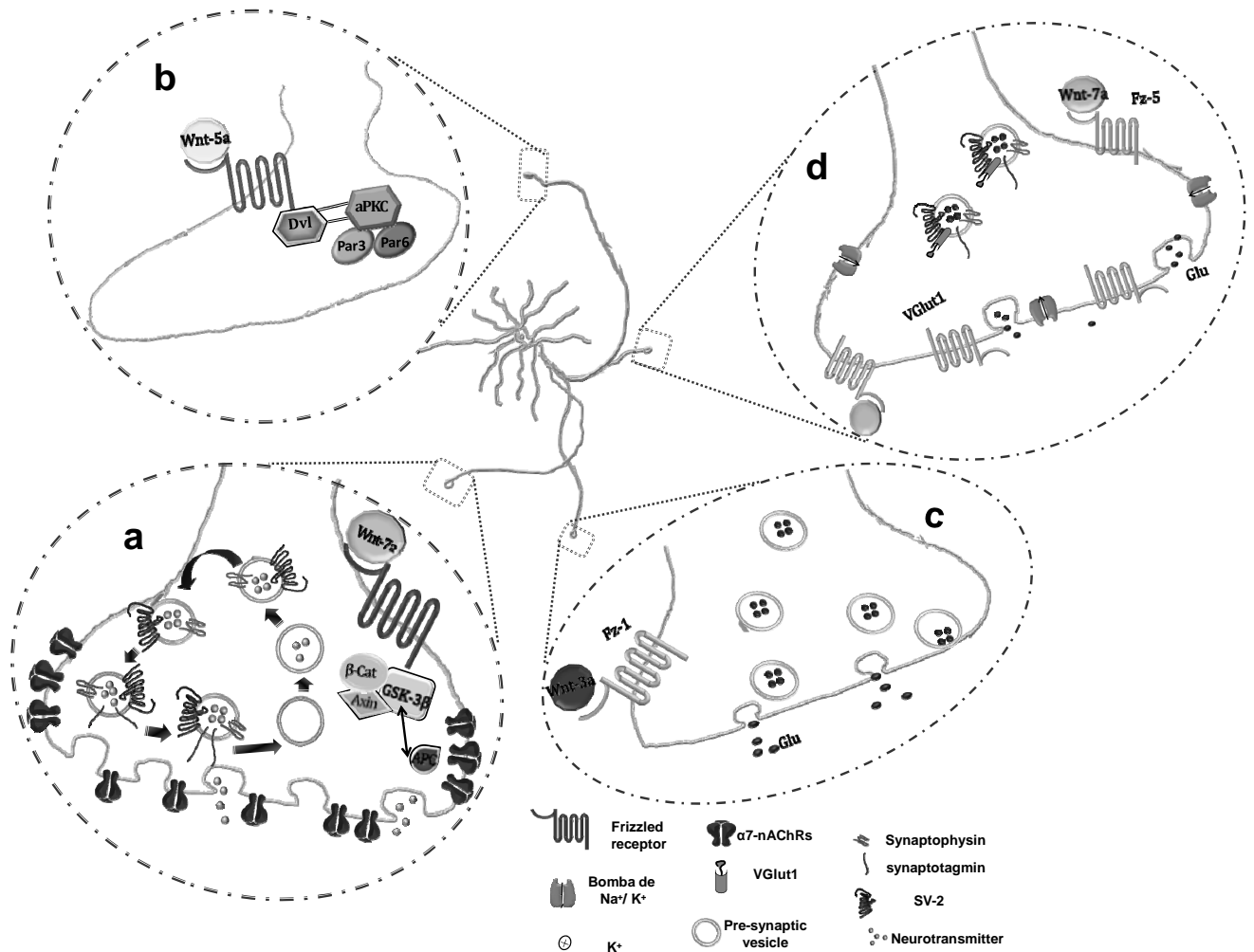
### Wnt in the Hippocampus: From Development to Adult Plasticity

Various studies have shown a crucial participation of Wnt pathways at early stage of hippocampal development [41] and in fact, the expression pattern of Lef1 (a gene of the LEF1/TCF family of transcription factors) as well as other LEF1/TCF proteins are critical for the regulation of dentate gyrus granule cell generation and the entire hippocampal maturation [42,43]. Actually, the conditional inactivation of  $\beta$ -catenin in mice, results in an impairment of hippocampus development [44] and the inhibition of canonical Wnt signaling by DKK1 induces severe defects in the hippocampal structure [45]. Wnt proteins also exert influence on various features of neuronal circuit assembly through modifications of the neuroskeleton organization and synaptic assembly [4,5,46-53]. Studies in cultured hippocampal neurons have found that  $\beta$ -catenin are mediators of dendritic morphogenesis since the overexpression of a stabilized form of  $\beta$ -catenin leads to the development of a more complex dendritic arborization. In contrast, sequestration of  $\beta$ -catenin by overexpressing the intracellular domain of N-cadherin, decreases dendritic arborization and dendritic branch length. Moreover, the increased dendritic growth and arborization after high  $K^+$  depolarization depends on the intracellular contents of  $\beta$ -catenin and on the increase of Wnt activity

since the number of dendritic branches decreases in DKK1-expressing neurons [54]. Interestingly, hippocampal dendritic arborization after depolarization depends on Wnt2 expression, which indeed belongs to the group of genes responsive to the transcription factor CREB, involved in plasticity events [55]. *In vitro* experiments in hippocampal neurons isolated from rats at embryonic day 18 have also shown a role for the non-canonical Wnt pathway function in dendritic arborization, in view that Wnt7b acting through Dvl1 increases dendritic branching by downstream activation of the Rac GTPase and the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. This effect is mimicked by Dvl1 overexpression and blocked by the Wnt antagonist sFRP, which is in line with the results from hippocampal neurons derived from a Dvl1 mutant mice [56]. Dvl1 is largely accumulated in developing axons where it directly regulates the function of the molecular complex PAR3-PAR6-aPKC (atypical protein kinase C) involved in axonal and dendritic differentiation in the hippocampus. The interaction of Dvl1 with aPKC resulted in its stabilization and activation of this atypical kinase. Additionally, treatment with conditioned media from cultured neurons expressing Wnt5a activates aPKC and promotes axonal differentiation. Together these results show that the effect of Wnt5a in the establishment of neuronal polarity depends on Dvl1-aPKC interaction [57] and demonstrates the critical role of Wnt during neurite development.

Wnt signaling is also involved in presynaptic assembly and function. In cultured hippocampal neurons Wnt7a enhances the number of clusters of the presynaptic vesicle markers, synaptophysin, synaptotagmin and SV-2 through a mechanism independent of GS K3 $\beta$  activity and  $\beta$ -catenin stabilization in view that it does not require changes in Wnt-dependent gene expression. Moreover, administration of Wnt7a to hippocampal neurons induces spontaneous synaptic vesicle recycling and modulates the efficacy of synaptic vesicles exocytosis. These results point out the role of Wnt7a in the formation of new active sites for vesicle recycling and neurotransmitter release [26]. Other additional effect of Wnt7a on controlling neurotransmitter release seems to depend on its ability to relocalize nicotinic acetylcholine receptors ( $\alpha$ 7-nAChRs) in presynaptic terminals. In hippocampal neurons Wnt7a induces the dissociation of APC from the  $\beta$ -catenin complex allowing the interaction between APC and  $\alpha$ 7-nAChRs [58, 59]. As mentioned, Cerpa *et al.* [26] showed that Wnt7a decreases the paired-pulse facilitation and increases the miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) frequency enhancing neurotransmitter release at the CA3-CA1 synapses in hippocampal slices from adult rats. Similarly, Wnt3a rapidly increases mEPSC in embryonic hippocampal neurons depending on a fast influx of calcium ions from the extracellular space. Further, in this work the authors reported that the Wnt3a effects were also dependent on the presence of the LRP6 coreceptor suggesting a crosstalk between canonical and non-canonical Wnt signaling pathways [60]. In agreement with these findings the increased number of excitatory presynaptic sites elicited by Wnt3a was dependent on Fz1 activation in cultured neurons [61] (Fig. 2).

There is evidence that emphasizes the involvement of Wnt receptors and ligands in the modulation of neuronal



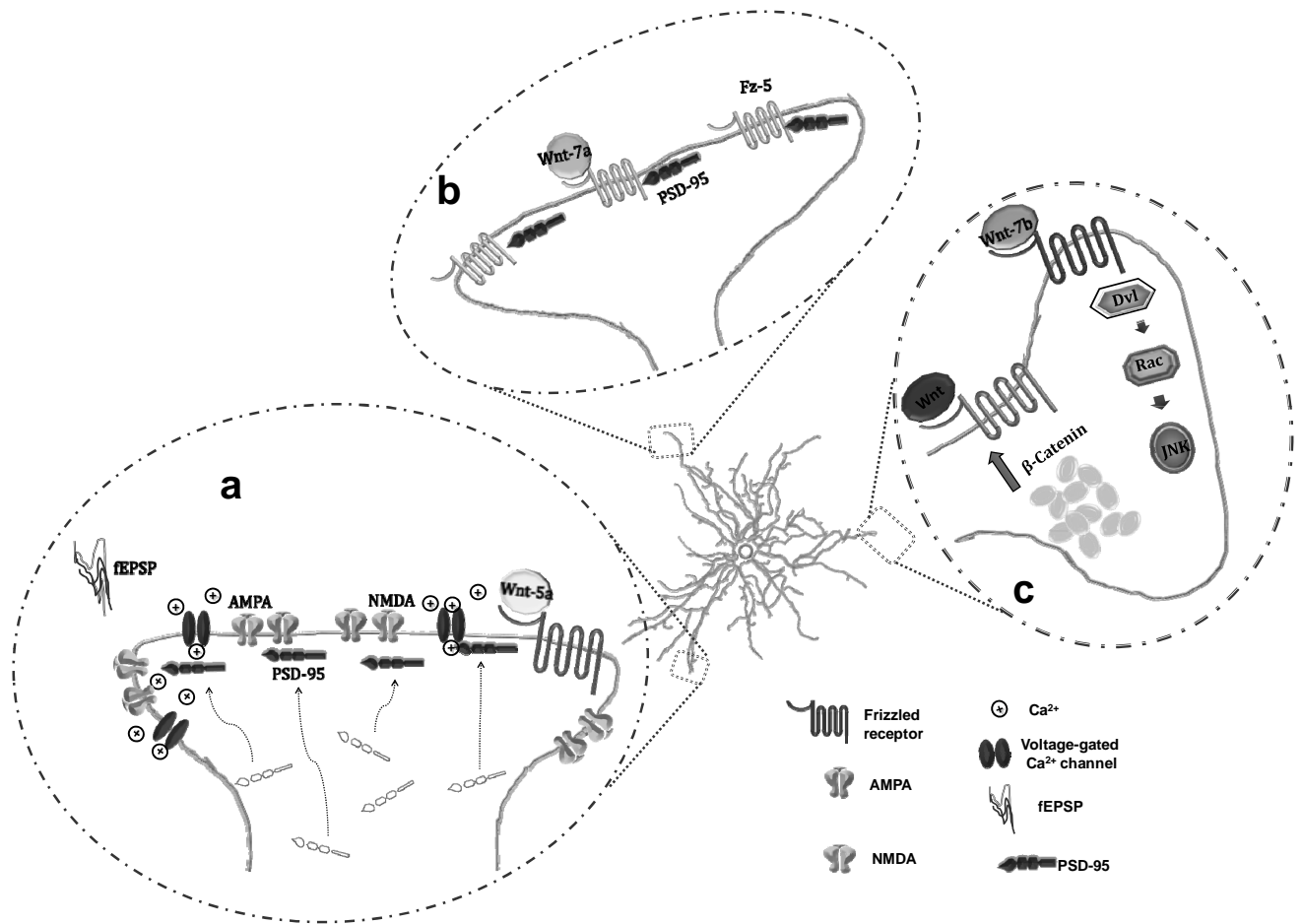
**Fig. (2).** Role of Wnt signaling in the presynapsis. **(a)** Wnt-7a increases the clusters of presynaptic proteins (synaptophysin, synaptotagmin and SV-2), enhances spontaneous synaptic vesicles recycling and relocalizes  $\alpha 7$ -nAChRs. This last effect depends on APC dissociation from the  $\beta$ -catenin complex enabling the APC and  $\alpha 7$ -nAChRs interaction. **(b)** Wnt-5a promotes axon differentiation acting on Dvl which accumulates in developing axons and modulates the complex PAR3-PAR6-aPKC involved in neuronal polarization. **(c)** Wnt-3a binds to Fz-1 and increases excitatory presynaptic sites. **(d)** During depolarization, Wnt-7a modulates presynaptic components, inducing the clustering of Fz-5 with VGLUT1.

circuit assembly at pre- and post-synaptic levels. Depolarization of hippocampal neurons by high  $K^+$  induces the colocalization of Fz5 receptors with the pre- and post-synaptic markers, VGLUT1 and PSD-95, respectively and mediates the effects of Wnt7a on synapse formation [28]. Recently, Wnt7a has been found to act also at a postsynaptic level promoting specifically the formation of excitatory synapses in hippocampal neurons. Even more, Wnt7a enhances dendritic spine density and maturity while Wnt7a-Dvl1 deficient mice show defects in spine morphogenesis and immature fiber-CA3 synaptic transmission [62].

Interestingly, in hippocampal slices, Wnt5a enhances a calcium-dependent increase in the amplitude of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP). Besides, Wnt5a leads to short term changes in postsynaptic density protein-95 (PSD-95) distribution promoting its recruitment from a diffuse membrane pool to clusters in dendritic spines of

mature hippocampal neurons. This effect has been attributed to a JNK1-dependent phosphorylation of PSD-95 on Ser295 [63]. Wnt5a modulates the activity of glutamatergic synaptic transmission increasing fEPSP amplitude at CA3-CA1 synapses dependent of both, AMPA and NMDA components of the excitatory postsynaptic currents (EPSCs) [64-67]. The ligand Wnt5a also affects inhibitory synapses in hippocampal neurons through its ability to induce GABA<sub>A</sub> receptors surface expression by promoting their insertion and clustering in the neuronal membrane. This effect enhances the efficacy of GABA synapses at the postsynaptic level as evidenced by a raise in the amplitude of GABA-currents and increasing GABA<sub>A</sub> receptors, effects mediated by CAMKII activation [68] (Fig. 3).

Long term exposure of cultured rat hippocampal neurons to Foxy-5 (formylated hexapeptide derived from the sequence of Wnt5a) that mimics the full action of the Wnt5a molecule,



**Fig. (3).** Role of Wnt signaling in the postsynaptic. (a) Wnt-5a augments fEPSP amplitude, promotes the recruitment of PSD-95 to dendritic spines, and modulates AMPA and NMDA responses. (b) Wnt-7a modulates postsynaptic components, inducing the clustering of Fz-5 with PSD-95. (c) The increase in β-catenin contents mediate dendritic morphogenesis. Wnt-7b augments dendritic branching acting through Dvl1 and downstream by Rac and JNK activation.

show the importance of this ligand in the mechanisms involved in neurite length promoting the membrane cluster of the SV2 (synaptic vesicle protein 2) and PSD-95 proteins. In addition, Fz-5 increased mEPSC amplitude and frequency [69]. Therefore, Wnt5a appears to be a postsynaptic mediator of synaptic differentiation and plasticity in the hippocampus stimulating dendrite spine morphogenesis, inducing de novo dendritic spine formation, and increasing the size of the preexisting ones [70].

Besides the described Wnt effect on structural plasticity new evidence also suggests a role for the Wnt signaling in functional hippocampal events. It has been shown that in hippocampal brain slices inhibition of Wnt signaling impairs long-term potentiation (LTP) while activation of Wnt/β-catenin pathway facilitates LTP expression [71]. Additional evidence supports the idea that GSK3β inhibition is essential for LTP, since phosphorylation of the kinase at the inhibitory residue Ser9 is enhanced upon LTP induction in CA1 and dentate gyrus *in vivo*. Moreover, LTP is impaired in transgenic mice conditionally overexpressing GSK3β and this deficit is reversed by lithium treatment [72]. As it has been proposed that LTP might be the electrophysiological correlate of learning and memory, these results suggest that

GSK3β is a key participant in these cognitive processes. The complexity of LTP expression may rely in the activity of several transduction pathways that act in concert to modulate diverse aspects of synaptic plasticity. In agreement, recent evidence shows that during the process of memory consolidation Notch signaling is transiently attenuated concomitantly with a transient increase in soluble β-catenin levels and GSK3β phosphorylation, indicating Wnt signaling activation in this event [73]. Another study reported that the Wnt-mediated suppression of GSK3β activity allows the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) by strong synaptic activity, which is crucial for the induction of late phase of LTP and involves protein synthesis [74]. On the other hand previous studies revealed that GSK3β activation is required for memory reconsolidation in a dult brain, as observed in Morris water maze performance of heterozygous GSK3β knockout mice impaired in their ability to form long-term memories [75].

Spatial learning has been associated with a selective increase of Wnt7 and Wnt5a levels in the hippocampus. The increase in Wnt7 levels was site and temporally specific since it was observed only in the granule cells of the dentate gyrus and expressed until 7 and 30 days after water maze



[76]. Recently, studies on the relationships between Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and spatial memory have described that the expression of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) is modulated by Wnt3a and that the administration of lithium restores the levels of CaMKIV and improves the spatial memory deficits in a transgenic model of AD [77]. CaMKIV participates in the regulation of CREB-dependent genes involved in memory and neuronal survival [78, 79].

Recent evidence suggests that the Wnt pathway is not only an inducer of plastic events, but that it can be activated by synapse-dependent experience. Studies in animals exposed to an enriched environment (EE) have shown an enhancement of Wnt7a/b levels in postsynaptic CA3 pyramidal neurons. On the contrary, Wnt signaling inhibitor sFRP1 suppresses the increase on synapse numbers elicited by EE and reduces synapse numbers in control mice. Interestingly, Wnt7a/b application to CA3 neurons mimicks the effects of EE of synapse numbers, while eliciting excitatory activity in CA3 neurons elevates Wnt7a/b levels [3].

Altogether, the evidence highlights the importance of Wnt function in the regulation of hippocampal synaptic plasticity along life events ranging from the appropriate neuronal circuit assembly, and the modulation of pre- and postsynaptic terminals remodeling to the cognitive performance in experimental models.

### Wnt and Hippocampal Neurogenesis

Hippocampal neurogenesis takes place in the subgranular zone (SGZ) of the adult hippocampus, which constitutes a niche of stem and progenitor cell types that are continuously dividing and generating neurons that affect learning and memory [80]. The functional impact of new neurons on the existing neural circuitry and their contribution in hippocampal physiology under both healthy and pathological states has been demonstrated [reviewed in 81]. Each of the steps in neurogenesis is mediated by different signaling pathways, extracellular cues and cell-intrinsic mechanisms [10]. Wnt signaling and Wnt proteins play a critical role in stem cell self-renewal [82] as well as in the proliferation of the neural progenitor pool [83] and neuronal differentiation from neuronal precursor cells (NPCs) [84] in the developing central nervous system. Additionally, the canonical Wnt pathway has been shown to be involved in all different stages of adult neurogenesis in the SGZ [for review, see 85]. Evidence that Wnt signaling is a main pathway regulating neurogenesis comes from *in vivo* studies showing that in presence of the Wnt inhibitor sFRP2/3, there is a decrease in the percentage of adult hippocampal progenitors that differentiate into neurons. Furthermore, it has been shown that the orphan nuclear receptor Tlx activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling thus stimulating neural stem cell proliferation and self-renewal [86]. A recent work showed that Tlx can activate the expression of Wnt7a and the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, suggesting that NSCs control their self-renewal in an autocrine manner [86]. In culture Wnt3 not only stimulates neuroblast proliferation but also instructs adult hippocampal progenitors to differentiate into neurons [87]. In particular, Wnt3a signaling has been shown to be

essential for the normal growth of the hippocampus during development [41] whereas in adult neural stem cells,  $\beta$ -catenin that accumulates in response to Wnt3a induces the transcription of NeuroD1 [88] a transcriptional factor that is essential for neuronal differentiation, maturation and survival [89]. Interestingly, Wnt3 protein levels and NeuroD1 mRNA levels decrease with aging along with a reduction in neurogenic differentiation of NPCs in the aged brain. However, *in vitro* the expression of receptors involved in Wnt signaling does not seem to be altered in the aged NSC [90].

Adult hippocampal astrocytes express Wnt family members like Wnt3 [87, 90] and adult hippocampal progenitors express receptors for Wnt3 and other components of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [87], thus accumulating evidence suggests that a multicellular niche is needed for providing the required molecular signaling [87, 91-93] necessary for neurogenesis to take place. Astrocytes have been shown to instruct differentiation of neural progenitor cells (NPCs) [90, 94,95] and Wnts released by astrocytes have been shown to promote NPC proliferation by inducing the expression of the mitotic regulator survivin [93].

Neurogenesis (in particular neuronal progenitor proliferation) has been shown to diminish during aging [96,97] along with the functional decline of hippocampal mediated learning and memory. In line with these observations, the experimentally induced decrease in neurogenesis has been positively correlated with impairment on long-term retention in different memory tasks [80]. Until lately, the target genes of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling responsible for the different stages involved in adult neurogenesis had been scarcely identified. However, in a recent work Miranda *et al.* show that Wnt mediated signaling in the aged brain of mice led to a decrease of survivin expression in NPCs and to a diminished proliferation, while survivin protein levels increased after the activation of the canonical Wnt pathway in NPCs. Interestingly, the authors showed that the decrease in the neurogenesis rate in the aged brain relies on a deficit of NPCs in cell cycle progression dependent on the reduced levels of chromosomal passing protein survivin. Furthermore, it was suggested that a decrease in the TCF/LEF promoter activity occurs during aging and is dependent on the down regulation of Wnt genes [93].

So far, experimental evidence suggests that fine regulations in Wnt signaling, in particular in the canonical pathway differentially regulate aspects of neurogenesis thus promoting proliferation, differentiation and even survival of neurons [98, 99] and that during aging, Wnt signaling acting through genes such as NeuroD1 and survivin is modified thus altering different stages of the neurogenesis process. In line, it has been shown that the deletion of the tumor suppressor APC from a subset of NPCs leads to a modest decrease in cell proliferation in the DG of young adult mice, and to a reduction of neuroblasts. Thus suggesting that APC depleted NSCs fails to pursue their normal differentiation pathway [100].

## Involvement of the Wnt Pathway in Neurodegenerative Diseases

Neurodegenerative diseases are generally associated with multiple neuronal abnormalities linked with changes at different levels of the structural and functional organization of neuronal networks, developmental defects or dysregulation of cellular signaling pathways that lead to synaptic atrophy and finally neuronal death. Altered Wnt signaling has been implicated in acute and chronic neuronal dysfunction associated to psychiatric conditions [101, 102], ischemia [103,104], temporal lobe epilepsy [105], Alzheimer's disease (AD) [12,106-110] and with some forms of frontotemporal dementia (FTD) [13].

The proposed relationship of altered Wnt signaling function with several psychiatric diseases is based on the evidence which shows that lithium has a positive effect on the treatment of the bipolar disorder symptom [111]. More recently various components of the Wnt pathway (e.g. Wnt2, Wnt7b and Fz9) have been found upregulated by chronic administration of antidepressant treatments. Particularly Wnt2 expression was reported to be highly elevated in the rat hippocampus, and the viral overexpression of Wnt 2 was sufficient to produce antidepressant-like behavioral actions in an animal model of depression [112]. In this same line it has also been reported that chronic electroconvulsive sessions are accompanied by a CREB dependent increase of Fz6 mRNA levels in the granule cell layer of the dentate gyrus and in the CA3 region. Also, vector-mediated inhibition of the Fz6 gene results in depressive-like behavior in response to chronic unpredictable stress [113]. Thus, it is feasible to postulate that Wnt has a significant role in the modulation of highly complex emotional behaviors and its malfunctioning is implicated in the expression of some psychiatric symptoms.

Wnt antagonism seems also to take part in the induction of neuronal death as has been suggested by the fact that DKK1 levels are increased in the brain in different models of ischemia, excitotoxicity and exposure to a myloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) [reviewed in 114]. DKK1 is hardly detectable in the healthy brain, but it is strongly induced in brain tissue from AD patients or from patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis [109].

One of the neurodegenerative diseases in which Wnt signaling has been extensively documented is AD. More than a decade ago, it was suggested that sustained loss of function of Wnt signaling would determine the onset and development of AD [12]. Presenilin (PS) mutations that appeared in familiar AD were associated with altered intracellular trafficking and turnover of  $\beta$ -catenins as well as with down-regulated Wnt signaling [115,116].

Many other components of the Wnt signaling pathway have been implicated in the molecular pathology of AD. In *Drosophila* models of neurodegeneration, Wnt dysregulation can lead to neurofibrillary pathology [117] and the overexpression of Dvl1 increases the non-amyloidogenic  $\alpha$ -secretase cleavage of APP [118] while DKK1-neutralizing antibodies are protective against synaptic loss in mouse models of AD [119]. Many of the pathological neuronal

responses attributed to Wnt dysregulation in AD come from multiple evidences about the Wnt-dependent GSK3 $\beta$  activity regulation [reviewed in 120]. Experimental data suggest that GSK3 $\beta$  regulates APP processing [121,122] and prevents A $\beta$  toxicity [123]. On the other hand, A $\beta$  seems to interfere with the Wnt canonical pathway as well, leading to increased GSK3 $\beta$  function [109, 124], generating a vicious cycle that might exacerbate neuronal injury. Regarding to the canonical Wnt signaling pathway, the gene for LRP6 co-receptor has been identified as a risk factor for late-onset AD in ApoE4-negative individuals [125]. Interestingly, it has been reported that the Wnt pathway might be inhibited by ApoE protein, which likely binds to the co-receptor LRP5/6 [126]. Moreover, the ApoE4, implicated in sporadic AD [127] may activate GSK3 $\beta$  [128, 129]. The canonical Wnt signaling inhibitor, DKK1 induces GSK3 $\beta$ -mediated tau phosphorylation in the hippocampus [130] as well as in cultured neurons [131]. Interestingly, DKK1 has been found elevated and colocalizing with neurofibrillary tangles and dystrophic neurites in degenerating neurons of AD brains [109]. Taken together, these evidences suggest that Wnt signaling might be a crucial pathological pathway that contributes to AD-related neurodegeneration and a link between amyloid and tau pathology.

Recent studies have found that the Wnt5a ligand and its receptor Fz5 were up-regulated in the brain of a mouse model of AD and in cultured cortical neurons by A $\beta$  exposure [132]. Interestingly in this report the authors also found that Wnt 5a signaling elicited the expression of proinflammatory cytokines such as interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

Microglia plays an important role in inflammation and the hippocampus is densely populated with this type of cell. During aging and pathological conditions, the activated form of microglia has been found to be increased in the hippocampus [133, 134] and the canonical Wnt signaling seems to have a role in microglia activation. Halleskog *et al.*, [135] reported a nice increase in  $\beta$ -catenin expression in microglial cells that undergo proinflammatory morphogenic transformation in pathogenic neuroinflammation such as occurs in AD. In addition, in cultured microglia expressing both receptors, Fz and LRP5/6, Wnt3a can stabilize  $\beta$ -catenin and specifically enhance the expression of proinflammatory immune response genes that exacerbate the production and release of IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Given the significant role of neuroinflammation in AD, the participation of Wnt in this process deserves to be analyzed in depth.

Recently, an elegant functional genomic analysis has shown a major role of Wnt dysregulation in brain samples from FTD associated with mutations in the progranulin gene and a nice important increase of the Fzd2 in a knockout progranulin gene mouse model [13].

Together, the above revised studies suggest that excessive and reduced Wnt function acting through the three signaling pathways may be involved at different steps of the neurodegenerative process in the adult brain. The specific disease outcome of such Wnt uncontrolled function may depend on the neuronal metabolic context and the cellular

type (neurons, astrocytes or microglia) where Wnt signaling is exacerbated or inhibited.

### Therapeutic Implications

An ideal compound with neuroprotective potential against hippocampal dysfunction should decrease or delay neuronal death, enhance neurogenesis, improve cognitive function, and control neuroinflammation. In view of the role played by Wnt pathways in maintaining neuronal homeostasis in the healthy hippocampus and their potential participation in brain disease it is feasible to suggest the targeting of Wnt signaling pathways to modify the progression of synaptic impairment, inflammation and ultimately neuronal death. In addition, the fact that Wnt signaling is involved in different steps of neural stem cell renewal suggests that purified Wnt proteins can be used as tools for cell replacement therapies in the treatment of neurodegenerative diseases and brain injury [86]. Adult neuronal stem cells are promising a therapeutic strategies given their potential to proliferate and differentiate into neurons and glia. On one hand, new neurons may incorporate into pre-existing circuits, thus providing functionality to an altered circuit, but also, glial cells are part of the cellular niche needed for neuronal proliferation and survival. Among the different molecular signaling pathways for neurogenesis to occur, Wnt has shown to be a crucial one. It has been shown that following exercise in aged animals astrocytic Wnt3 levels increase thus re-stimulating different stages of neurogenesis [90]. Therapeutic strategies to increase Wnt positive effects may include the use of lithium which has been shown to enhance proliferation of adult hippocampal progenitors *in vitro* inducing them to become neurons at particular concentrations. Moreover, experiments in which lithium is administered to a mouse strain encoding a double-mutant form of APP, have shown to stimulate adult hippocampal progenitor cells proliferation and neuronal differentiation along with the improvement in cognitive functions through the inhibition of GSK3 $\beta$  and subsequent activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [136]. In a recent work, Matrisciano *et al.* [137] show that chronic mild restraint stress, which associates to hippocampal damage leads to an overexpression of DKK1 levels and that inducing stress in a mice strain where DKK1 levels are reduced, not only diminishes neuronal loss, but increases neurogenesis and dendritic arborization [137].

Wnt signaling also mediates a positive neuron-astrocyte crosstalk for neuroprotection as has been found in mesencephalic neurons where Wnt1 effects depends on the astroglial response to oxidative stress and inflammation after neuronal injury, and requires Fz1 receptor and  $\beta$ -catenin stabilization to transmit pro-survival signals in to the neuronal nucleus [138].

However to deep into the design of a molecule with Wnt positive effect, it should be considered that a fine balance between different Wnt ligands exists in the brain. For example, experimental models of behavior suggest that the inability of rats to tolerate stressful environments and the resulting anxiety may be associated with the enhanced expression of the Wnt 2 gene and the resistance to the increase of Wnt 7b levels in the ventral tegmental area [139] thus stressing the possibility that these ligands act in concert

to promote brain adaptation when facing harmful situations. The functional reestablishment of a proper balance between different Wnt agonists and antagonist of the canonical Wnt pathway in anxiety as well as in major depression disorders may represent the biggest challenge to restore neuronal homeostasis in malfunctioning cells.

Previous work has proposed that different canonical and non-canonical Wnt agonists, acting at different levels can be protective in AD [140]. Particularly the non-canonical Wnt activator, Wnt5a has a defending role against synaptic failure evoked by A $\beta$  oligomers making this molecule a possible therapeutic target for AD therapy [65,67]. Likewise the search for compounds directed to neutralize the action of the Wnt inhibitors, e.g. DKK, may be a promising avenue for developing neuroprotective drugs for this devastating disease.

Given that Fz2 was found selectively elevated in the brain of patients with FTD and Fz2 activates a non-canonical Wnt pathway it is suggested that modulation of this pathway could be therapeutically beneficial for this demential illness.

However pharmacotherapy aimed at modulating Wnt pathways should consider the timing for application as well as the targeted cell type and brain region in order to provide specificity to the molecular processes underlying a specific neurodegenerative disease. For example, in terms of brain inflammation enhanced  $\beta$ -catenin signaling in microglia could be either beneficial or detrimental for the disease outcome. Also, Wnt activates proliferative pathways that may lead to uncontrolled cellular proliferation and tumor growth but as previously discussed may also represent a powerful therapeutic strategy for neuronal protection.

### CONCLUSIONS

Wnt signaling regulates many aspects of hippocampal development and continues critically involved in the adult regulating plasticity mechanisms. However the complexity of events that are under the control of the Wnt pathways poses the need to perform further studies that unravel the biological roles of the highly dynamic Wnt signaling through different stages of brain maturation as well as in disease. The expression of different genes and proteins of the Wnt signaling pathway in regions of the central nervous system that control learning and memory opens the possibility to understand how they can influence the processes of neuronal plasticity that are altered in dementias and neuropsychiatric disorders. Thus, new pharmacological developments can be specifically targeted at a particular disease entity to enhance treatment efficacy.

### CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

CA is on sabbatical leave in the Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, C SIC-IDIBAPS, in the laboratory of Dr. Ramón Trullas and is supported by CONACyT (176763) and PASPA, DGAPA, UNAM, México. AZ is supported by PAPIIT (IA200312) and CONACyT (176589).

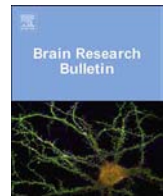
## REFERENCES

- [1] Alvarez, V. A., Sabatini, B. L. Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci*, **2007**, *30*, 79-97.
- [2] Gogolla, N., Galimberti, I., Caroni, P. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr. Opin. Neurobiol*, **2007**, *17*(5), 516-24.
- [3] Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y., Caroni, P. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron*, **2009**, *62*(4), 510-25.
- [4] Budnik V, Salinas P.C. Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2011**, *21*(1), 151-9.
- [5] Salinas, P. C., Zou, Y. Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2008**, *31*, 339-58.
- [6] Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.*, **2003**, *69*(3), 143-79.
- [7] Arendt, T. Alzheimer's disease as a disorder of dynamic brain self-organization. *Prog. Brain Res.*, **2005**, *147*, 355-78.
- [8] Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., Varon, S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.*, **1997**, *17*(7), 2295-313.
- [9] Branchi, I., Francia, N., Allea, E. Epigenetic control of neurobehavioural plasticity: the role of neurotrophins. *Behav. Pharmacol.*, **2004**, *15*(5-6), 353-62.
- [10] Mu, Y., Lee, S.W., Gage, F.H. Signaling in adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2010**, *20*(4), 416-23.
- [11] Vellano, C.P., Lee, S.E., Dudek, S.M., Hepler, J.R. RGS14 at the interface of hippocampal signaling and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2011**, *32*(11), 666-74.
- [12] De Ferrari, G.V., Inestrosa, N.C. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.*, **2000**, *33*(1), 1-12.
- [13] Rosen, E. Y., Wexler, E. M., Versano, R., Coppola, G., Gao, F., Winden, K. D., Oldham, M. C., Martens, L. H., Zhou, P., Farese, R. V. Jr., Geschwind, D. H. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progulin deficiency, implicating Wnt signaling. *Neuron*, **2011**, *71*(6), 1030-42.
- [14] Logan, C.Y., Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2004**, *20*, 781-810.
- [15] Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. 3<sup>rd</sup>, Nusse, R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, **2003**, *423*(6938), 448-52.
- [16] Mulligan, K.A., Cheyette, B.N. Wnt Signaling in Vertebrate Neural Development and Function. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **2012**, Sep 27 [Epub ahead of print]
- [17] Miller, J.R. The Wnts. *Genome Biol.*, **2002**, *3*(1).
- [18] van Amerongen, R., Nusse, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, **2009**, *136*(19), 3205-14.
- [19] MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell*, **2009**, *17*(1), 9-26.
- [20] Taelman, V.F., Dobrowolski, R., Plouhinec, J.L., Fuentealba, L.C., Vorwald, P.P., Gumper, I., Sabatini, D.D., De Robertis, E.M. Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell*, **2010**, *143*(7), 1136-48.
- [21] Yang, Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.*, **2012**, *2*(1), 14.
- [22] Nusse, R. Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2012**, *4*, a011163.
- [23] De, A. Wnt/Ca2+ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)*, **2011**, *43*(10), 745-56.
- [24] Clark, C.E., Nourse, C.C., Cooper, H.M. The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. *Neurosignals*, **2012**, *20*(3), 202-20.
- [25] Shimogori, T., VanSant, J., Paik, E., Grove, E.A. Members of the Wnt, Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.*, **2004**, *473*(4), 496-510.
- [26] Cerpa, W., Godoy, J.A., Alfaro, I., Arias, G.G., Metcalfe, M.J., Fuentealba, R., Bonansco, C., Inestrosa, N.C. Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*(9), 5918-27.
- [27] Davis, E.K., Zou, Y., Ghosh, A. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev.*, **2008**, *3*, 32.
- [28] Sahores, M., Gibb, A., Salinas, P.C. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development*, **2010**, *137*(13), 2215-25.
- [29] Kim, A.S., Lowenstein, D.H., Pleasure, S.J. Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon. *Mech Dev*, **2001**, *103*(1-2), 167-72.
- [30] Zhao, C., Pleasure, S.J. Frizzled-9 promoter drives expression of transgenes in the medial wall of the cortex and its chief derivative the hippocampus. *Genesis*, **2004**, *40*(1), 32-9.
- [31] Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., De Robertis, E.M. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, **1997**, *88*(6), 747-56.
- [32] Wang, S., Krinks, M., Lin, K., Lu, Y., Lu, F.P., Moos, M.J. Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*, **1997**, *88*(6), 757-66.
- [33] Niehrs, C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, **2006**, *25*(57), 7469-81.
- [34] Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., Nathans, J. A newly secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, **1999**, *398*(6726), 431-6.
- [35] Cruciat, C.M., Niehrs, C. Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2013**, *1*, 5(3), a015081.
- [36] Kawano, Y., Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*(13), 2627-34.
- [37] Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.*, **2008**, *121*(6), 737-46.
- [38] Rodriguez, J., Esteve, P., Weinel, C., Ruiz, J.M., Ferrmin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C., Bovolenta, P. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat. Neurosci.*, **2005**, *8*(10), 1301-9.
- [39] Grotewold, L., Rütter, U. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J*, **2002**, *21*(5), 966-75.
- [40] Wang, J., Shou, J., Chen, X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*, **2000**, *19*(14), 1843-8.
- [41] Lee, S.M., Toole, S., Grove, E., McMahon, A.P. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development*, **2000**, *127*(3), 457-67.
- [42] Galceran, J., Miyashita-Lin, E.M., Devaney, E., Rubenstein, J.L., Grosschedl, R. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development*, **2000**, *127*(3), 469-82.
- [43] Roelink, H. Hippocampus formation: an intriguing collaboration. *Curr. Biol.*, **2000**, *10*(7), 279-81.
- [44] Machon, O., van den Bout, C.J., Backman, M., Kemler, R., Krauss, S. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience*, **2003**, *122*(1), 129-43.
- [45] Solberg, N., Machon, O., Krauss, S. Effect of canonical Wnt inhibition in the neurogenic cortex, hippocampus, and premigratory dentate gyrus progenitor pool. *Dev. Dyn.*, **2008**, *237*(7), 1799-811.
- [46] Salinas, P.C. Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, **2005a**, *33*(6), 1295-98.
- [47] Salinas, P.C. Signaling at the vertebrate synapse: new roles for embryonic morphogens? *J. Neurobiol.*, **2005b**, *64*(4), 435-45.
- [48] Ciani, L., Salinas, P.C. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci*, **2005**, *6*(5), 351-362. Erratum in: *Nat. Rev. Neurosci.*, **2005**, *6*(7), 582.
- [49] Fradkin, L.G., Garriga, G., Salinas, P.C., Thomas, J.B., Salinas, P.C. Retrograde signalling at the synapse: a role for Wnt proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, **2005a**, *33*(6), 1295-98.
- [50] Tang, S.J. The synaptic Wnt signaling hypothesis. *Synapse*, **2007**, *61*(10), 866-68.
- [51] Inestrosa, N.C., Arenas, E. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **2010**, *11*(2), 77-86.
- [52] Salinas, P.C. Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: from axon guidance to synaptic function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2012**, *4*(2), a008003.
- [53] Park, M., Shen, K. WNTs in synapse formation and neuronal circuitry. *EMBO J*, **2012**, *31*(12), 2697-704.

- [54] Yu, X., Malenka, R.C. Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat. Neurosci.*, **2003**, *6*(11), 1169-77.
- [55] Wayman, G.A., Impey, S., Marks, D., Saneyoshi, T., Grant, W.F., Derkach, V., Soderling, T.R. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaMK-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron*, **2006**, *50*(6), 897-909.
- [56] Rosso, S.B., Sussman, D., Wynshaw-Boris, A., Salinas, P.C. Wnt signaling through Dishvelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat. Neurosci.*, **2005**, *8*(1), 34-42.
- [57] Zhang, X., Zhu, J., Yang, G.Y., Wang, Q.J., Qian, L., Chen, Y.M., Chen, F., Tao, Y., Hu, H.S., Wang, T., Luo, Z.G. Dishvelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat. Cell Biol.*, **2007**, *9*(7), 743-54.
- [58] Fariás, G.G., Vallés, A.S., Colombres, M., Godoy, J.A., Toledo, E.M., Lukas, R.J., Barrantes, F.J., Inestrosa, N.C. Wnt-7a induces presynaptic localization of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **2007**, *27*(20), 5313-25.
- [59] Jensen, M., Hoernli, F.J., Brockie, P.J., Wang, R., Johnson, E., Maxfield, D., Francis, M.M., Madsen, D.M., Maricq, A.V. Wnt signaling regulates acetylcholine receptor translocation and synaptic plasticity in the adult nervous system. *Cell*, **2012**, *149*(1), 173-87.
- [60] Avila, M.E., Sepúlveda, F.J., Burgos, C.F., Moraga-Cid, G., Parodi, J., Moon, R.T., Aguayo, L.G., O'Pazo, C., De Ferrari, G.V. Canonical Wnt3a modulates intracellular calcium and enhances excitatory neurotransmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*(24), 18939-47.
- [61] Varela-Nallar, L., Grabowski, C.P., Alfaro, I.E., Alvarez, A.R., Inestrosa, N.C. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural. Dev.*, **2009**, *2*, 4-41.
- [62] Ciani, L., Boyle, K.A., Dickins, E., Soares, M., Anane, D., Lopes, D.M., Gibb, A.J., Salinas, P.C. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2011**, *108*(26), 10732-37.
- [63] Kim, M.J., Fujita, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., Sheng, M. Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron*, **2007**, *56*(3), 488-502.
- [64] Fariás, G.G., Alfaro, I.E., Cerpa, W., Grabowski, C.P., Godoy, J.A., Bonansco, C., Inestrosa, N.C. Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*(23), 15857-66.
- [65] Fariás, G.G., Godoy, J.A., Cerpa, W., Varela-Nallar, L., Inestrosa, N.C. Wnt signaling modulates pre- and postsynaptic maturation: therapeutic considerations. *Dev. Dyn.*, **2010**, *239*(1), 94-101.
- [66] Inestrosa, N.C., Varela-Nallar, L., Grabowski, C.P., Colombres, M. Synaptotoxicity in Alzheimer's disease: the Wnt signaling pathway as a molecular target. *IUBMB Life*, **2007**, *59*(4-5), 316-21.
- [67] Cerpa, W., Fariás, G.G., Godoy, J.A., Fuenzalida, M., Bonansco, C., Inestrosa, N.C. Wnt-5a occludes A beta oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Mol. Neurodegener.*, **2010**, *18*(5), 3.
- [68] Cuitino, L., Godoy, J.A., Fariás, G.G., Couve, A., Bonansco, C., Fuenzalida, M., Inestrosa, N.C. Wnt-5a modulates recycling of functional GABA<sub>A</sub> receptors on hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **2010**, *30*(25), 8411-20.
- [69] Varela-Nallar, L., Parodi, J., Fariás, G.G., Inestrosa, N.C. Wnt-5a is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against A beta toxicity. *Neurodegener. Dis.*, **2012**, *10*(1-4), 23-6.
- [70] Varela-Nallar, L., Alfaro, I.E., Serrano, F.G., Parodi, J., Inestrosa, N.C. Wntless-type family member 5A (Wnt-5a) stimulates synaptic differentiation and function of glutamatergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, *107*(49), 21164-69.
- [71] Chen, J., Park, C.S., Tang, S.J. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*(17), 11910-16.
- [72] Hooper, C., Markevich, V., Plattner, F., Killick, R., Schofield, E., Engel, T., Hernandez, F., Anderton, B., Rosenblum, K., Bliss, T., Cooke, S.F., Avila, J., Lucas, J.J., Giese, K.P., Stephenson, J., Lovestone, S. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur. J. Neurosci.*, **2007**, *25*(1), 81-86.
- [73] Conboy, L., Seymour, C.M., Monopoli, M.P., O'Sullivan, N.C., Murphy, K.J., Regan, C.M. Notch signaling becomes transiently attenuated during long-term memory consolidation in adult Wistar rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2007**, *88*(3), 342-51.
- [74] Ma, T., Tzavaras, N., Tsokas, P., Landau, E.M., Blitzer, R.D. Synaptic stimulation of mTOR is mediated by Wnt signaling and regulation of glycogen synthetase kinase-3. *J. Neurosci.*, **2011**, *31*(48), 17537-46.
- [75] Kimura, T., Yamashita, S., Nakao, S., Park, J.M., Murayama, M., Mizoroki, T., Yoshiike, Y., Sahara, N., Takashima, A. GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS One*, **2008**, *3*(10), e3540.
- [76] Tabatadze, N., Tomas, C., McGonigal, R., Lin, B., Schook, A., Routenberg, A. Wnt transmembrane signaling and long-term spatial memory. *Hippocampus*, **2012**, *22*(6), 1228-41.
- [77] Arrázola, M.S., Varela-Nallar, L., Colombres, M., Toledo, E.M., Cruzat, F., Pavez, L., Assar, R., Aravena, A., González, M., Montecino, M., Maass, A., Martínez, S., Inestrosa, N.C. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J. Cell Physiol.*, **2009**, *221*(3), 658-67.
- [78] See, V., Boutillier, A.L., Bito, H., Loeffler, J.P. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits a poptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J*, **2001**, *15*, 134-144.
- [79] Fukushima, H., Maeda, R., Suzuki, R., Suzuki, A., Nomoto, M., Toyoda, H., Wu, L.J., Xu, H., Zhao, M.G., Ueda, K., Kitamoto, A., Mamiya, N., Yoshida, T., Homma, S., Masushige, S., Zhuo, M., Kida, S. Upregulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV improves memory formation and rescues memory loss with aging. *J. Neurosci.*, **2008**, *28*, 9910-19.
- [80] Jessberger, S., Clark, R.E., Brodbent, N.J., Clemenson, G.D. Jr., Consiglio, A., Lie, D.C., Squire, L.R., Gage, F.H. Dentate gyrus-specific knock down of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn. Mem.*, **2009**, *16*(2), 147-54.
- [81] Deng, W., Alimonte, J.B., Gage, F.H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.*, **2010**, *11*(5), 339-50.
- [82] Kalani, M.Y., Cheshier, S.H., Cord, B.J., Bababeygy, S.R., Vogel, H., Weissman, I.L., Palmer, T.D., Nusse, R. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*(44), 16970-5.
- [83] Chenn, A., Walsh, C.A. Regulation of cerebellar cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, **2002**, *297*(5580), 365-9.
- [84] Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*, **2004**, *131*(12), 2791-801.
- [85] Anderova, M., Honsa, P. Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Differentiation: Role of Sonic Hedgehog and Wingless/Int-1 proteins. In: Stem Cells and Cancer Stem Cells; Ed.: M.A.H. Springer, 2012; pp. 3-18.
- [86] Qu, Q., Sun, G., Li, W., Yang, S., Ye, P., Zhao, C., Yu, R.T., Gage, F.H., Evans, R.M., Shi, Y. Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signaling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat. Cell Biol.*, **2010**, *12*(1), 31-40, sup pp 1-9.
- [87] Lie, D.C., Colamarino, S.A., Song, H.J., Désiré, L., Mirra, H., Consiglio, A., Levin, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., Gage, F.H. Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, **2005**, *437*(7063), 1370-5.
- [88] Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D.C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M., Gage, F.H. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.*, **2009**, *12*(9), 1097-105.
- [89] Gao, Z., Ure, K., Ables, J.L., Lagace, D.C., Nave, K.A., Goebbels, S., Eisch, A.J., Hsieh, J. NeuroD1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat. Neurosci.*, **2009**, *12*(9), 1090-2.
- [90] Okamoto, M., Inoue, K., Iwamura, H., Terashima, K., Soga, H., Asashima, M., Kuwabara, T. Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB J*, **2011**, *25*(10), 3570-82.

- [91] Palmer, T.D., Willhoite, A.R., Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neuro.*, **2000**, *425*(4), 479-94.
- [92] Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Kharan, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S.E. Endothelial cells stimulate self-renewal and expansion neurogenesis of neural stem cells. *Science*, **2004**, *304*, 1338-40.
- [93] Miranda, C.J., Braun, L., Jiang, Y., Hester, M.E., Zhang, L., Riolo, M., Wang, H., Rao, M., Altura, R.A., Kaspar, B.K. A ging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling. *Aging Cell*, **2012**, *11*(3), 542-52.
- [94] Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, **2002**, *417*(6884), 39-44.
- [95] Barkho, B.Z., Song, H., Amicone, J.B., Smrt, R.D., Kuwabara, T., Nakashima, K., Gage, F.H., Zhao, X. Identification of a stromal-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev.*, **2006**, *15*(3), 407-21.
- [96] Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: a cell-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.*, **1996**, *16*(6), 2027-33.
- [97] Leuner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., Gould, E. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *PNAS*, **1997**, *104*, 17169-73.
- [98] Gage, F.H. Molecular and cellular mechanisms contributing to the regulation, proliferation and differentiation of neural stem cells in the adult dentate gyrus. *Keio J Med*, **2010**, *59*(3), 79-83.
- [99] Cole, A.R. GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. *Front Mol. Neurosci.*, **2012**, *5*, 4.
- [100] Imura, T., Wang, X., Noda, T., Soffroniew, M.V., Fushiki, S. Adenomatous polypoidosis coli is essential for both neuronal differentiation and maintenance of adult neural stem cells in subventricular zone of the hippocampus. *Stem Cells*, **2010**, *28*(11), 2053-64.
- [101] Miyaoka, T., Seno, H., Ishino, H. Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr. Res.*, **1999**, *38*, 1-6.
- [102] Duman, R.S., Voleti, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.*, **2012**, *35*(1), 47-56.
- [103] Mastroiacovo, F., Busceti, C.L., Biagioli, F., Moyanova, S.G., Meisler, M.H., Battaglia, G., Caricasole, A., Bruno, V., Nicoletti, F. Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2009**, *29*(2), 264-76.
- [104] Xing, Y., Zhang, X., Zhao, K., Cui, L., Wang, L., Dong, L., Li, Y., Liu, Z., Wang, C., Zhang, X., Zhu, C., Qiao, H., Ji, Y., Cao, X. Beneficial effects of sulindac in focal cerebral ischemia: A positive role in Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Brain Res.*, **2012**, *1482*, 71-80.
- [105] Busceti, C.L., Biagioli, F., Aronica, E., Rizzo, B., Storto, M., Battaglia, G., Giorgi, F.S., Gradini, R., Fornai, F., Caricasole, A., Nicoletti, F., Bruno, V. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, **2007**, *48*(4), 694-705.
- [106] Garrido, J.L., Godoy, J.A., Alvarez, A., Bronfman, M., Inestrosa, N.C. Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J*, **2002**, *16*(14), 1982-4.
- [107] Inestrosa, N., De Ferrari, G.V., Garrido, J.L., Alvarez, A., Olivares, G.H., Barria, M.I., Bronfman, M., Chacón, M.A. Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration. *Neurochem. Int.*, **2002**, *41*(5), 341-4.
- [108] Caricasole, A., Copani, A., Caruso, A., Caraci, F., Iacovelli, L., Sortino, M.A., Terstappen, G.C., Nicoletti, F. The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol. Sci.*, **2003**, *24*(5), 233-8.
- [109] Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A.J., Caruso, A., Storto, M., Gaviaraghi, G., Terstappen, G.C., Nicoletti, F. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.*, **2004**, *24*(26), 6021-7.
- [110] De Ferrari, G.V., Chacón, M.A., Barria, M.I., Garrido, J.L., Godoy, J.A., Olivares, G., Reyes, A.E., Alvarez, A., Bronfman, M., Inestrosa, N.C. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. *Mol Psychiatry*, **2003**, *8*(2), 195-208.
- [111] Jope, R.S. Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *J. Mol. Psychiatry*, **1999**, *4*(2), 117-28.
- [112] Okamoto, H., Voleti, B., Banasr, M., Sarhan, M., Duric, V., Girgenti, M.J., Di Leone, R.J., Newton, S.S., Duman, R.S. Wnt2 expression and signaling is increased by different classes of antidepressant treatments. *Biol. Psychiatry*, **2010**, *68*(6), 521-7.
- [113] Voleti, B., Tanis, K.Q., Newton, S.S., Duman, R.S. An analysis of target genes regulated by chronic electroconvulsive therapy reveals role for Fzd6 in depression. *Biol. Psychiatry*, **2012**, *71*(1), 51-8.
- [114] Caraci, F., Busceti, C., Biagioli, F., Aronica, E., Mastroiacovo, F., Cappuccio, I., Battaglia, G., Bruno, V., Caricasole, A., Copani, A., Nicoletti, F. The Wnt antagonist, Dickkopf-1, as a target for the treatment of neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.*, **2008**, *33*(12), 2401-6.
- [115] Nishimura, M., Yu, G., Levesque, G., Zhang, D.M., Ruel, L., Chen, F., Milman, P., Holmes, E., Liang, Y., Kawarai, T., Jo, E., Supala, A., Rogava, E., Xu, D.M., Janus, C., Levesque, L., Bi, Q., Duthie, M., Rozmahel, R., Mattila, K., Lannfelt, L., Westaway, D., Mount, H.T., Woodgett, J., St George-Hyslop, P., et al. Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause use-dependent intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat. Med.*, **1999**, *5*(2), 164-9.
- [116] Soriano, S., Kang, D.E., Fu, M., Pestel, I.R., Chevallier, N., Zheng, H., Koo, E.H. Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J. Cell Biol.*, **2001**, *152*(4), 785-94.
- [117] Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., Geschwind, D.H. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron*, **2002**, *34*(4), 509-19.
- [118] Mudher, A., Chapman, S., Richardson, J., Asuni, A., Gibb, G., Pollard, C., Killick, R., Iqbal, T., Raymond, L., Vardell, I., Sheppard, P., Makoff, A., Gower, E., Soden, P.E., Lewis, P., Murphy, M., Golde, T.E., Ryniak, H.T., Anderson, B.H., Lovestone, S. Dishevelled regulates the metabolism of amyloid precursor protein via protein kinase C/mitogen-activated protein kinase and c-Jun terminal kinase. *J. Neurosci.*, **2001**, *21*(14), 4987-95.
- [119] Purro, S.A., Dickins, E.M., Salinas, P.C. The secreted Wnt antagonist Dickkopf-1 is required for amyloid  $\beta$ -mediated synaptic loss. *J. Neurosci.*, **2012**, *32*, 3492-98.
- [120] Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., Arias, C.G. SK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2011**, 2011:189728.
- [121] Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M., Klein, P.S. GSK-3 $\beta$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, **2003**, *423*(6938), 435-9.
- [122] Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., Ni, B. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*, **2004**, *43*(22), 6899-908.
- [123] Alvarez, A.R., Godoy, J.A., Mullenbarr, K., Olivares, G.H., Bronfman, M., Inestrosa, N.C. Wnt-3a overcomes  $\beta$ -amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp. Cell Res.*, **2004**, *297*(1), 186-96.
- [124] Magdesian, M.H., Carvalho, M.M., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., Ferreira, S.T. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*(14), 9359-68.
- [125] De Ferrari, G.V., Papassotiropoulos, A., Biechele, T., Wavrant-Vrieze, F., Avila, M.E., Major, M.B., Myers, A., Sáez, K., Henríquez, J.P., Zhao, A. et al. Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, *104*(22), 9434-39.
- [126] Caruso, A., Motolese, M., Iacovelli, L., Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Gaviaraghi, G., Caricasole, A. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J. Neurochem.*, **2006**, *98*(2), 364-71.
- [127] Strittmatter, W.J., Roses, A.D. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, **1996**, *19*, 53-77.
- [128] Cedazo-Minguez, A., Popescu, B.O., Blanco-Millán, J.M., Akterin, S., Pei, J.J., Winblad, B., Cowburn, R.F. Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-42) regulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J. Neurochem.*, **2003**, *87*(5), 1152-64.

- [129] Hernández, F., Gómez de Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J.J., Avila, J. GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp. Neurol.*, **2010**, 223(2), 322-5.
- [130] Scali, C., Caraci, F., Gianfriddo, M., Di Iodato, E., Roncarati, R., Pollio, G., Gavrighi, G., Copani, A., Nicoletti, F., Testappen, G.C., Caricasole, A. Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol. Dis.*, **2006**, 24(2), 254-65.
- [131] Mercado-Gómez, O., Hernández-Fonseca, K., Villavicencio-Queijeiro, A., Massieu, L., Chimal-Monroy, J., Arias, C. Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3 $\beta$  activity and induces morphological changes in cortical neurons: role of tau phosphorylation. *Neurochem. Res.*, **2008**, 33(8), 1599-609.
- [132] Li, B., Zhong, L., Yang, X., Andersson, T., Huang, M., Tang, S.J. WNT5A signaling contributes to A $\beta$ -induced neuroinflammation and neurotoxicity. *PLoS One*, **2011**, 6(8), e22920.
- [133] Xie, Z., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Finch, C.E. Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Exp Neurol*, **2003**, 182(1), 135-41.
- [134] Lee, C.H., Moon, S.M., Yoo, K.Y., Choi, J.H., Park, O.K., Hwang, I.K., Sohn, Y., Moon, J.B., Cho, J.H., Won, M.H. Long-term changes in neuronal degeneration and microglial activation in the hippocampal CA1 region after experimental transient cerebral ischemic damage. *Brain Res.*, **2010**, 1342, 138-49.
- [135] Halleskog, C., Mulder, J., Dahlström, J., Mackie, K., Hortobágyi, T., Tanila, H., Kumar P.L., Färber, K., Harkany, T., Schulte, G. Wnt signaling in activated microglia is proinflammatory. *Glia*, **2011**, 59(1), 119-31.
- [136] Fiorentini, A., Rosi, M.C., Grossi, C., Luccarini, I., Casamenti, F. Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice. *PLoS One*, **2010**, 5(12), e14382.
- [137] Matrisciano, F., Busceti, C.L., Bucci, D., Orlando, R., Caruso, A., Molinaro, G., Cappuccio, I., Rizzo, B., Gradini, R., Motolese, M., Caraci, F., Copani, A., Scaccianoce, S., Melchiorri, D., Bruno, V., Battaglia, G., Nicoletti, F. Induction of the Wnt antagonist Dickkopf-1 is involved in stress-induced hippocampal damage. *PLoS One*, **2011**, 6(1), e16447.
- [138] L'episcopo, F., Serapide, M.F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M.C., Puchino, S., Marchetti, B. A Wnt1 regulated Frizzled-1/ $\beta$ -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutic relevance for neuron survival and neuroprotection. *Mol. Neurodegener.*, **2011**, 13(6), 49.
- [139] Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., LaPlant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Nave, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eich, A.J., Seif, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, **2007**, 131(2), 391-404.
- [140] Inestrosa, N.C., Toledo, E.M. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.*, **2008**, 24(3), 9.



## Research report

# Chronic infusion of Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 in the adult hippocampus induces structural synaptic changes and modifies anxiety and memory performance

Abril Ortiz-Matamoros, Clorinda Arias\*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Anxiety  
 Bassoon  
 Memory  
 PSD-95  
 Synapses  
 Tau phosphorylation  
 Wnt signaling

## ABSTRACT

Wnt signaling plays an important role in the adult brain function and its dysregulation has been implicated in some neurodegenerative pathways. Despite the functional role of the Wnt signaling in adult neural circuits, there is currently no evidence regarding the relationships between exogenously Wnt signaling activation or inhibition and hippocampal structural changes *in vivo*. Thus, we analyzed the effect of the chronic infusion of Wnt agonists, Wnt7a and Wnt5a, and antagonist, Dkk-1, on different markers of plasticity such as neuronal MAP-2, Tau, synapse number and morphology, and behavioral changes. We observed that Wnt7a and Wnt5a increased the number of perforated synapses and the content of pre- and postsynaptic proteins associated with synapse assembly compared to control and Dkk-1 infusion. These two Wnt agonists also reduced anxiety-like behavior. Conversely, the canonical antagonist, Dkk-1, increased anxiety and inhibited spatial memory recall. Therefore, the present study elucidates the potential participation of Wnt signaling in the remodeling of hippocampal circuits underlying plasticity events *in vivo*, and provides evidence of the potential benefits of Wnt agonist infusion for the treatment of some neurodegenerative conditions.

## 1. Introduction

The Wnt pathway plays a role in brain embryonic developmental processes, such as neuronal maturation, migration, synaptic formation, and establishment of neuronal connectivity (Lee et al., 2000; Machon et al., 2003; Salinas 2005; Inestrosa and Varela-Nallar, 2015). Growing evidence has revealed the function of the Wnt pathway in the mature brain, where it is associated with modulation of axonal remodeling, dendrite outgrowth and maintenance, synaptic activity, neurogenesis and behavioral plasticity (Chen et al., 2017; Inestrosa and Arenas, 2010; Oliva et al., 2013a,b; Ortiz-Matamoros et al., 2013). Cellular mechanisms that control structural changes, such as cytoskeletal remodeling, are involved in the abovementioned events (Gogolla et al., 2007). The mature brain undergoes continuous morphological adjustments in response to internal and external stimuli by rearranging synaptic contacts and reorganizing neuronal networks. Different signals are involved in these structural changes, but there is little information about the ability of Wnt signaling to regulate structural plasticity in the adult brain.

Different Wnt ligands are expressed in the postnatal brain (Shimogori et al., 2004), and these ligands are released in a

constitutive- and activity-dependent manner (Chen et al., 2006; Oliva and Inestrosa, 2015). Cumulative evidence has emphasized the involvement of Wnt receptors and ligands to regulate neuronal circuit assembly at pre- and postsynaptic levels. Among the different Wnt ligands, Wnt7a increases the clustering of presynaptic proteins, and promotes synaptic vesicle release and recycling at the presynaptic terminal, in cultured hippocampal neurons (Cerpa et al., 2008; Varela-Nallar et al., 2009). At the postsynaptic level, Wnt7a acts specifically promoting the formation of excitatory synapses in cultured hippocampal neurons. Moreover, Wnt7a enhances dendritic spine density and maturity, while Wnt7a/Dvl1 deficient mice show defects in spine morphogenesis and mossy fiber-CA3 synaptic transmission (Ciani et al., 2011). Interestingly, Wnt5a promotes synapse formation in hippocampal neurons (Varela-Nallar et al., 2012), facilitates a JNK-dependent increase in postsynaptic PSD-95 clustering (Farías et al., 2009), and plays a role in the maintenance of dendritic architecture in the adult hippocampus (Chen et al., 2017).

These changes at the pre and postsynaptic levels appear to impact cognition, and recent evidence indicates the participation of the Wnt pathway in experience-mediated synaptic remodeling (Gogolla et al., 2009) and memory regulation, both of which involve Wnt7a and Wnt5a

\* Corresponding author at: Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70-228, 04510 México, DF, Mexico.

E-mail address: [carias@unam.mx](mailto:carias@unam.mx) (C. Arias).

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.008>

Received 27 November 2017; Received in revised form 2 February 2018; Accepted 9 March 2018

Available online 13 March 2018

0361-9230/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.



signaling (Chen et al., 2017; Tabatadze et al., 2012). Infusion of the Wnt/ $\beta$ -catenin antagonist Dkk-1 into the amygdala of male rats prior to training impairs fear memory consolidation without affecting learning (Maguschak and Ressler 2011), and a single dose of Dkk-1 into the hippocampus impairs memory consolidation for both object recognition memory and fear conditioning (Fortress et al., 2013; Xu et al., 2015). Infusion of the Wnt agonists WASP-1 and FOXY-5 enhances basal synaptic transmission and reverses memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease (Vargas et al., 2014a,b). Moreover, inducible expression of Dkk-1 produces hippocampal synapse loss and memory deficits (Marzo et al., 2016). On the other hand, cumulative evidence has proposed that some Wnt agonists that activate both canonical and non-canonical pathways can be beneficial for treating diseases such as Frontotemporal Dementia (Rosen et al., 2011) and Alzheimer's disease (Inestrosa and Toledo, 2008; Toledo et al., 2008; Vargas et al., 2014a,b).

Despite the functional role of the Wnt signaling pathway in adult neural circuits and its implication for neuroprotection, there is currently no evidence of the relationship between Wnt signaling modulation and hippocampal structural changes *in vivo* after chronic exposure, which may have implications for therapeutically targeting this pathway in neurodegenerative conditions. Thus, we aimed to analyze the impact of the chronic infusion *in vivo* of two agonists, Wnt7a and Wnt5a, and an antagonist, Dkk-1, on neuronal cytoskeletal proteins, synapse-associated assembly proteins, synapse number and morphology, as well as the connection between these changes and the performance in hippocampal-associated behaviors.

## 2. Material and methods

### 2.1. Neuroblastoma cell cultures

To verify the infusion system and the functionality of the recombinant proteins, the human neuroblastoma MSN cell line was used (Reynolds et al., 1986), seeded in culture dishes with coverslips and maintained under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> at 37 °C. For preservation and growth, the cells were incubated in neurobasal culture medium RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), supplemented with nonessential amino acids and 10% fetal calf serum. After 24 h, MSN cells were differentiated by the addition of retinoic acid (10  $\mu$ M) and nerve growth factor (NGF) (50 ng/mL) in order to induce a mature neuronal phenotype. Three days after differentiation started, cells were treated with phosphate buffered saline (PBS), Wnt7a (600 ng, Wnt signaling agonist), Wnt5a (600 ng, Wnt signaling agonist), or Dkk-1 (200 ng, Wnt signaling antagonist). The recombinant proteins were added to the cultures through mini-osmotic pumps (Fig. 1). To verify the activity of Wnt proteins after 11 days of treatment, Wnt ligands were infused to cultures through the mini-osmotic pumps that were recovered at the end of the *in vivo* experiments (Fig. 1 Supplementary). After four days of exposure, morphological changes were determined by immunofluorescence staining of cytoskeletal proteins. For immunocytochemistry assays, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) dissolved in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 10 min. Then, were washed four times (5 min each) with cold 0.1 M PB/0.3% Triton X-100, permeabilized with 0.1 M PB/0.3% Triton X-100 for 10 min at room temperature and incubated with blocking solution (0.1 M PB/0.3% Triton X-100 and 5% bovine serum albumin (BSA)) for 24 h at 4 °C. The cells were then incubated with primary antibodies against  $\alpha$ -tubulin (1:500; monoclonal antibody, mouse anti- $\alpha$ -tubulin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) overnight at 4 °C. Next, they were incubated with a secondary antibody coupled to Alexa Fluor 555 (1:700, donkey anti-mouse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 2 h at room temperature. For F-actin staining, cells were incubated with phalloidin (1:50, Alexa Fluor 488 phalloidin, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Coverslips with the cells were mounted on silanized slides using Dako fluorescent mounting medium (North America, Inc, Carpinteria,

CA, USA). High-resolution images were captured on a confocal microscope (Nikon AIR<sup>+</sup>).

### 2.2. Implantation of Alzet mini-osmotic pumps

Male Wistar rats (250–300 g) were used throughout the study and handled with all precautions necessary to avoid their suffering in agreement with the ARRIVE guidelines and Regulations for Research in Health Matters (México), with the approval of the local Animal Care Committee. The animals were anesthetized with 1–2% isoflurane in a 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> mixture and placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) with the nose bar positioned at –0.3 mm. Alzet mini-osmotic pumps (Model 2004, Durect Corp., Cupertino, CA) were implanted subcutaneous in the dorsal region with bilateral cannulation into the CA1 region of the hippocampus (from Bregma = AP –3.6, L –3.1 and V +2.0; Paxinos and Watson 1998). The pump was connected via plastic tubing to a 3.5 mm long cannula made with silicone capillaries that delivered a continuous flow of 0.25  $\mu$ L/h for approximately 11 days, releasing either Wnt7a, Wnt5a (300 ng for each hippocampus), or Dkk-1 (200 ng). All compounds were dissolved in phosphate buffered saline (PBS). At the end of the surgery, the skin incision was sutured, and the rat was placed in an acrylic cage. The rats were allowed to recover for 6 days before the behavioral tests.

### 2.3. Behavioral tests

#### 2.3.1. Open field

Spontaneous motor activity and anxiety were evaluated after the third session of handling and habituation (ninth day post-surgery) in an open field arena. An acrylic area with 80 cm long x 80 cm wide x 30 cm high black floor and walls, which was divided, with white lines, into sixteen squares of 20 cm x 20 cm each was used. For the open field test, subjects were placed individually at the center of the arena. The locomotion of the animals was recorded for 5 min, and the number of crossings to the center and to the corners of the arena were quantified.

#### 2.3.2. Object location memory test (OLM)

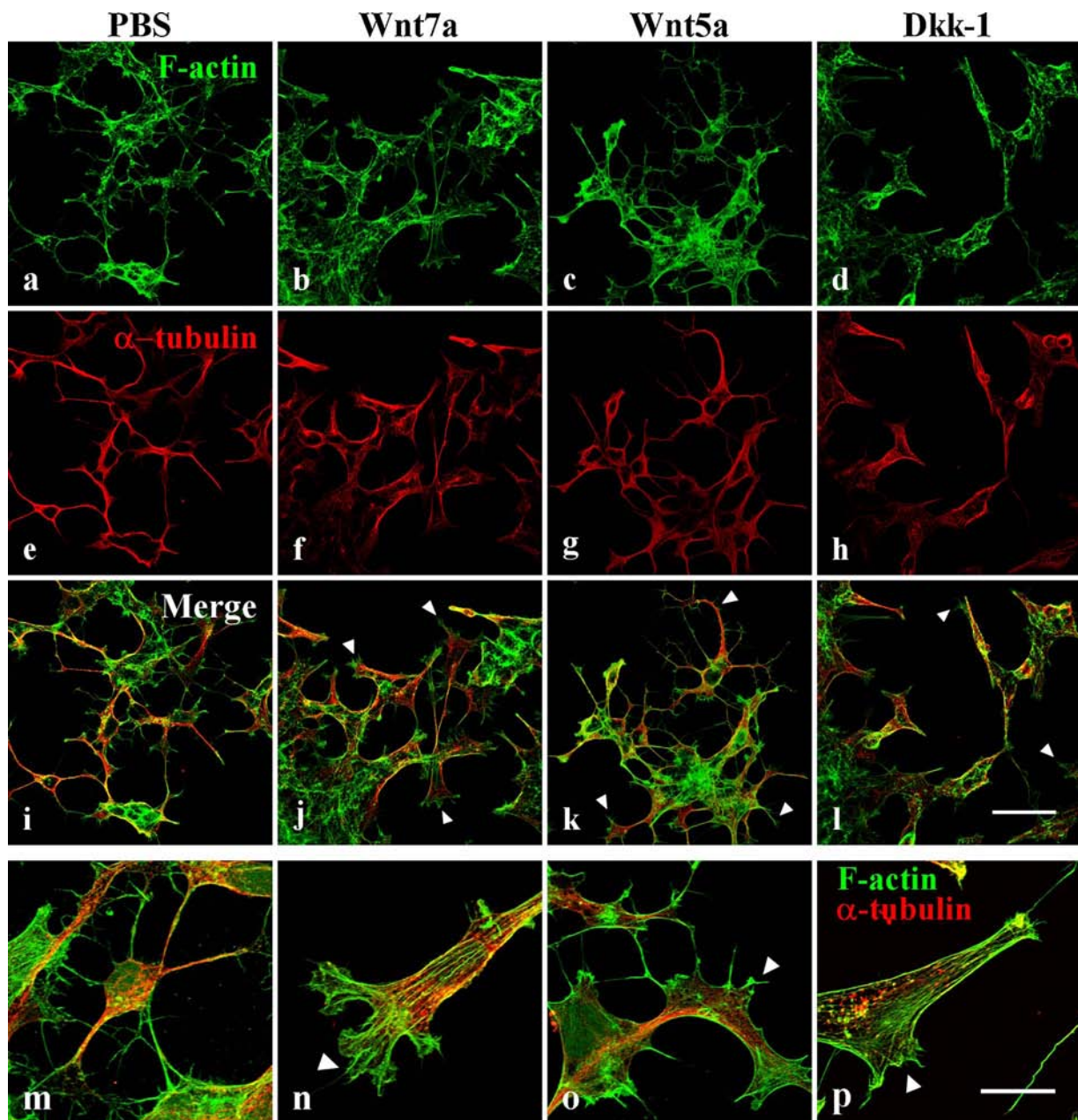
This behavioral paradigm is a spatial memory task modulated by the hippocampus that takes advantage of the natural tendency of rodents to explore novelty (Vogel-Ciernia and Wood, 2014). The task consists of three stages: a session of habituation to the empty training arena; an acquisition phase to explore two identical objects; and a testing phase of exploration, previous displacement of one of the objects to a different location.

#### 2.3.3. Apparatus and objects

For the OLM, a black acrylic arena (60 cm long x 60 cm wide x 30 cm high) with a visual clue on the back wall (a strip of paper with vertical white and black lines) was used. The objects were green glass bottles (12 cm high) filled with white cement to make them heavy and therefore preventing their displacement.

#### 2.3.4. Behavioral test

The rats received 10 min handling and 10 min habituation to the apparatus during three consecutive days. On the tenth day, the rats underwent the acquisition phase. The subjects were individually introduced to the south side of the arena with two identical objects placed in opposite corners (25 cm from each corner), and were allowed to explore for 20 min. Subsequently, rats were removed from the arena and placed in their cages. Long-term memory was tested 24 h later, when one object was displaced to a novel location, and the rats were allowed to explore freely for 10 min. The time spent exploring each object was quantified. The discrimination index of OLM was calculated dividing the time spent exploring the new location by the sum of the total time spent exploring both objects, multiplied by 100.



**Fig. 1.** Wnt signaling pathway modulation induces cytoskeletal and morphological changes in differentiated human neuroblastoma MSN cells line. Confocal microscopy images of PBS (a, e, i), Wnt7a (b, f, j), Wnt5a (c, g, k) and Dkk-1 (d, h, l) treated cells, stained with the F-actin marker phalloidin (green) and immunolabeled with  $\alpha$ -tubulin (red). Changes in the distribution of actin and tubulin are observed and the presence of filopodia and lamellipodia are indicated by arrowhead. High magnifications showing the presence of these morphological changes are depicted in m-p. All images are representative of 5–7 fields from 4 different cell cultures seeded in triplicate. Scale bar = 50  $\mu$ m and for high magnification = 25  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

## 2.4. Histological procedures

After the behavioral tasks, some of the subjects were anesthetized with sodium pentobarbital and intracardially perfused with 250 mL 0.9% saline followed by 250 mL 4% PFA in 0.1 M PB (pH 7.4). Brains were removed and stored in 4% PFA for 48 h at 4 °C. The tissues were dehydrated with different sucrose gradients (10, 20 and 30%; 24 h each), and 34- $\mu$ m-thick coronal sections were obtained. One of every five sections was stained with cresyl violet, and the remaining sections were collected in 12-well plates (Corning, NY, USA) filled with cryoprotection solution (25% glycerol, 25% ethylene glycol, and 50% 0.2 M PB, pH 7.4) and stored at 4 °C until processing.

### 2.4.1. Immunocytochemistry

The coronal brain sections were placed in wells with PBS, 0.3% Triton and 0.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min and incubated with blocking solution (5% BSA in PBS) overnight at 4 °C. Then, the slices were incubated with the following primary antibodies diluted in PBS/5% BSA: anti-synaptophysin, clone SY38 (1:500; Millipore, Temecula, CA, USA); total tau mouse mAb (tau46; 1:500; Cell Signaling Technology, MA, USA); and mouse monoclonal anti-PSD-95 (1:500) (Chemicon, Temecula, USA). The sections were incubated with the primary antibodies at 4 °C for 24 h. Then were washed 3  $\times$  5 min each with PBS, and incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature. Sections were washed 2  $\times$  5 min each with PBS, and incubated with a Vectastain ABC kit mix (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h at room temperature. Subsequently, the sections were washed 3  $\times$  10 min each

in PBS and incubated with a DAB Kit (diaminobenzidine, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 10 min. Afterwards, sections were washed  $3 \times 10$  min each in PBS and covered with mounting medium for microscopic observation (Olympus BX51-WI, DSU (Disk Scanning Unit) microscope) and for image acquisition. For the negative controls, the primary antibody was eliminated from the procedure. To ensure identical immunolabeling between groups, slides containing sections from each group were processed in parallel.

#### 2.4.2. Immunofluorescence

Coronal sections of the hippocampus (from 3–4 treated animals per condition) were washed with 0.1 M PB, permeabilized with 0.1 M PB/0.3% Triton X-100 for 30 min and incubated with blocking solution (0.3% Triton X-100/5% BSA in 0.1 M PB) overnight at 4 °C. The primary antibodies were as follows: rabbit polyclonal anti-MAP2 (1:500; Millipore, Temecula, CA, USA) and goat polyclonal anti-Bassoon (1:300; Abcam, Cambridge, MA, USA). The sections were incubated with the primary antibodies at 4 °C for 24 h. Next, they were washed  $3 \times 5$  min each with 0.3% Triton X-100/0.1 M PB and then incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), including 488 donkey anti-mouse (1:500), and 647 donkey anti-rabbit (1:500), for 2 h at room temperature. Cell nuclei were stained with DAPI (1:1000; Bio-Rad Laboratories, CA, USA). The sections were washed  $3 \times 5$  min each with 0.3% Triton X-100/0.1 M PB, covered with fluorescent mounting medium (DAKO, Carpinteria, CA, USA), and visualized by confocal microscopy (Zeiss LSM 5 Pascal).

#### 2.5. Western blot

The brains from 4 treated animals per condition were obtained, and the hippocampi were dissected. Then, the tissues were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mmol/L HEPES, pH 7.7; 100 mmol/L sodium chloride; 2 mmol/L PMSF; 1% NP-40) with the complete inhibitor cocktail from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA), and sonicated in 10-second pulses 3 times at 4 °C. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C, and the supernatants were collected. Protein concentration was determined using a BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA). The lysates were boiled in Laemmli buffer and fractionated in a 10% SDS-PAGE gel. The proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, Buckinghamshire, England). The membranes were blocked with 5% nonfat milk/PBS and incubated with one of the following primary antibodies at 4 °C overnight in 3% BSA/PBS: anti-synaptophysin, clone SY38 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); mouse monoclonal anti-PSD-95 (1:500; Chemicon, Temecula, USA); rabbit anti-p-tau AT8 (S199/202, polyclonal antibody, 1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); anti-tau PHF-1 (1:100; donated by P. Davies); mouse monoclonal anti-active- $\beta$ -catenin (anti-ABC), clone 8E7 (1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA); mouse monoclonal anti- $\beta$ -catenin (1:1000; E-5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); and mouse monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Clone 6C5; 1:1000; Millipore, Temecula, CA, USA). Next, membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:15,000; anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) in 5% nonfat milk/PBS for 2 h at room temperature. At the end of this period, membranes were visualized using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) on Kodak X-OMAT film. The densitometric analysis of the bands was done with the ImageJ software (version 1.51d, Schneider et al. 2012). To normalize the data, the values obtained for each band were divided by their respective GAPDH loading control and obtained a ratio. This value was then converted to percent of control for each experiment.

#### 2.6. Electron microscopy

The rats were anesthetized with sodium pentobarbital and transcardially perfused with 250 ml PBS followed by 250 ml 4% PFA and 1% glutaraldehyde in 0.1 M PB (pH 7.4). After perfusion, the brains were removed from the skulls. Blocks containing the CA1 and CA3 subfields were dissected and maintained in fixation solution. The sections were embedded in resin (Epon), cut with a diamond knife and stained with uranyl acetate/lead citrate. The samples were analyzed on a Jen 1200 EX II microscope. For synaptic density, both type I (excitatory) and type II (inhibitory) synapses (Gray, 1959) were considered. Approximately 15–20 pictures were taken for each group of 4 different samples. Synaptic number and ultrastructure (including synaptic perforation) were counted. All synapses were analyzed and counted by two experimenters blind to sample information.

#### 2.7. Image analysis

For densitometric analysis of immunohistochemistry experiments, 4 to 6 coronal sections per animal, for each experimental condition ( $n = 3$ –4 rats) were used. Confocal and bright field images of different hippocampal regions were analyzed with the ImageJ software (version 1.51d). Bright field images were converted to grayscale and then applied a threshold. For confocal images, each channel of interest was separated and followed the above procedure. The percent of immunolabeled area was obtained, and the statistical analysis was done.

#### 2.8. Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using ANOVA and Tukey's multiple comparison test, or an unpaired Student's *t* test, as indicated in each figure legend.  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.05$  were considered significant. GraphPad Prism 4 was used for graphics and statistical analysis.

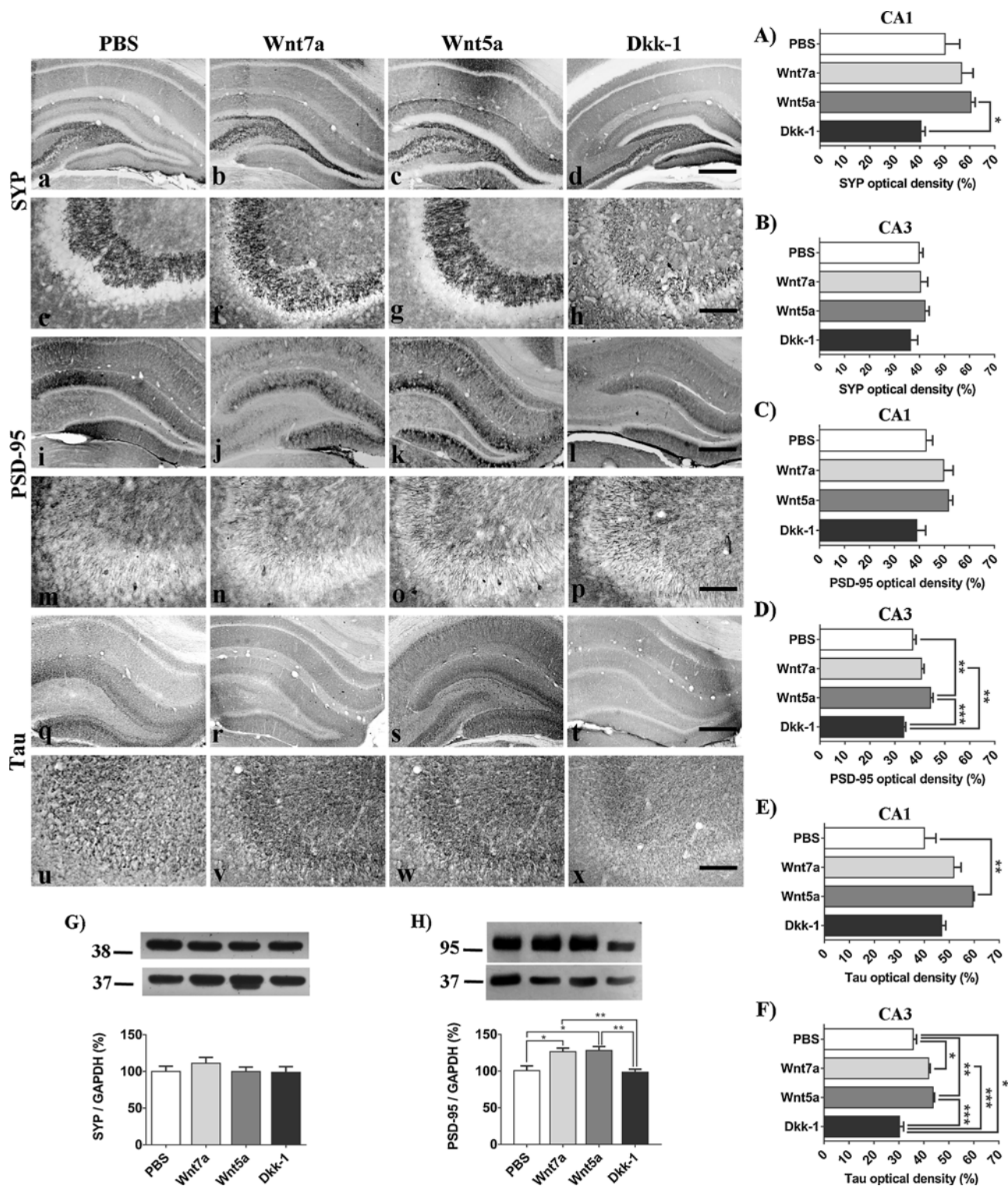
### 3. Results

#### 3.1. Effect of long-term treatment of *Wnt7a*, *Wnt5a* and *Dkk-1* on pre- and postsynaptic markers

As mentioned in Materials and Methods, we first confirmed that the infusion system was able to release the Wnt ligands, and that they preserve biological activity (Fig. 1 and Supplementary Fig. 1). We treated differentiated human neuroblastoma cells with Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 infused from a cannula attached to a mini-osmotic pump located into the cell culture dishes. Three days after seeding, differentiated human neuroblastoma cells were treated for four days with PBS, Wnt7a, Wnt5a or Dkk-1 at the same concentrations used for microinfusions *in vivo*. Incubation with Wnt7a and Wnt5a increased the formation of actin-dependent filopodia and lamellipodia (Fig. 1j, k, n, o, arrowhead). Changes in the distribution of  $\alpha$ -tubulin was also consistent with the remodeling of the actin cytoskeleton (Fig. 1f, g). Interestingly, the canonical Wnt antagonist, Dkk-1, produced shorter and blunted neurite outgrowth, associated with tubulin and actin reorganization (Fig. 1d, h, l, p). We also confirmed similar morphological changes when cells were treated with Wnt5a and Dkk-1, infused from a cannula attached to a mini-osmotic pump recovered by day 11 (at the end of the *in vivo* exposure) (Supplementary Fig. 1) corroborating that the recombinant proteins remain active after 11 days.

Then, we evaluated the impact of chronic *in vivo* exposure to two Wnt agonists and one antagonist on structural plasticity, analyzing the content of synaptophysin (SYP) and PSD-95 in the rat hippocampus after 11 days of exposure. While no changes were observed in SYP density following any of the treatments in CA3 compared to the control (Fig. 2e–h; B), Wnt5a treatment induced a significant increase in the content of SYP in the CA1 region compared to Dkk-1 (Fig. 2c, A).





**Fig. 2.** Changes in synaptic proteins induced by long-term exposure to Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1. Representative images of SYP (a–h), PSD-95 (i–p) and total tau (q–x) immunoreactivity in the DG, CA1 (a–d, i–l, q–t) and CA3 (e–h, m–p, u–x). Optical density was analyzed and is depicted as the percent of the stained area for each region, from 3–4 different animals per group (A–F). ANOVA and Tukey’s multiple comparison test \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001. Scale bars = 500 μm for DG and CA1 and = 250 μm for CA3. The levels of SYP and PSD-95 proteins were also analyzed by Western blot (G, H). Bars represent the densitometric analysis of proteins normalized with GAPDH and represent the mean ± SEM of 4–8 independent experiments. Student’s *t* test \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

Although the activation or inhibition of Wnt did not induce significant changes in the distribution of the postsynaptic density protein PSD-95 in the CA1 subfield (Fig. 2i–l; C), compared with the chronic infusion of the control and Dkk-1, Wnt5a produced a robust increment in PSD-95 in the CA3 subfield of the hippocampus (Fig. 2m, o, p; D). The increase in

PSD-95 density in the CA3 subfield was also significantly higher in the animals chronically infused with the agonist Wnt7a than in those infused with Dkk-1 (Fig. 2n, p; D). Moreover, Dkk-1 infusion decreased the PSD-95 density in this subfield. These results were consistent with those obtained by Western blot quantitation, which clearly revealed an

increase in the content of PSD-95 in the hippocampus, particularly after Wnt5a treatment, and a decrease in this protein after Dkk-1 infusion, without changing the total presynaptic vesicle protein synaptophysin (Fig. 2G, H). We also found significant differences in the density of the microtubule-associated protein tau in CA1 between Wnt5a treatment and control PBS. Compared with control, Wnt7a and Wnt5a infusions upregulated the density of tau in the CA3 subfield significantly. On the contrary, Dkk-1 treatment significantly diminished the density of the tau protein in that area (Fig. 2q–x; E, F). These results suggest that Wnt pathway activation or inhibition differentially modulates pre- and post-synaptic proteins in the hippocampus, especially in the CA3 subfield.

### 3.2. Changes in the presynaptic marker density, Bassoon, by Wnt modulation

Given the observed increase in PSD-95, we wanted to assess the effects of Wnt pathway activation or inhibition on the presynaptic component of the synaptic active zones, using multiple immunofluorescence markers and confocal microscopy analysis for microtubule-associated protein-2 (MAP2), and the presynaptic marker Bassoon. Density analysis revealed no significant changes in the cytoskeletal protein MAP-2 in the dendrites of CA1 and CA3 pyramidal neurons (Figs. Figure 3q and Figure 4q), or in the granule cells of the dentate gyrus (DG) of the hippocampus (Fig. 5q), in none of the experimental conditions. However, Bassoon density analysis showed a significant increase in both CA3 and DG in the Wnt5a infused group, compared with the control and Dkk-1 treated groups (Figs. Figure 4r, Figure 5r).

In a similar manner, Bassoon protein density slightly increased in CA1 and CA3 after Wnt7a treatment, particularly when compared with Dkk-1 treatment (Figs. Figure 3r, Figure 5r). However, a significant increase was observed in the DG region when compared with the control (Fig. 5r). Together, these data suggest that hippocampal activation of Wnt signaling increases the active zones of synapses mainly through Wnt5a, but does not provoke the accumulation of synaptic vesicles, as the SYP quantification suggests.

### 3.3. Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the hippocampus

Western blot analysis was used to investigate the expression levels of total  $\beta$ -catenin and the active  $\beta$ -catenin pool, the key nuclear effector of canonical Wnt signaling, after long-term infusion of Wnt pathway agonists and antagonist. As shown in Fig. 6, compared with control PBS infusion, Wnt7a or Wnt5a infusions induced a significant increase in the levels of total  $\beta$ -catenin after 11 days of exposure (Fig. 6a). This increment was also observed in the levels of the active form of  $\beta$ -catenin (unphosphorylated Ser37/Thr41) (Fig. 6b), suggesting that both agonists can activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the hippocampus *in vivo*. Compared with PBS infusion, Dkk-1 infusion did not modify the levels of  $\beta$ -catenin significantly. However, Dkk-1 levels were significantly lower than those produced by Wnt positive ligands (Fig. 6a, b). Given that the activation or inhibition of the Wnt signaling pathway may regulate the phosphorylation of proteins through GSK3 $\beta$ , we analyzed the phosphorylation state of the microtubule-associated protein tau in a target site controlled by this protein kinase (Liu et al., 2007). As expected, compared with the PBS or Dkk-1 infused groups, the Wnt7a and Wnt5a infused groups exhibited a significant decrease in tau phosphorylation at the Ser199/202 (Fig. 6c). No changes were observed in the content of this phospho-epitope in the Dkk-1 treated group compared with the control group, however, the appearance of the PHF-1 (phospho-Ser396/404) form of tau was more pronounced in the Dkk-1 group than in the Wnt7a and Wnt5a groups (Fig. 6d).

### 3.4. Ultrastructural changes in synapses induced by Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1

To assess whether the chronic infusion of PBS, Wnt7a, Wnt5a or Dkk-1 (Fig. 7a–d) into the dorsal hippocampus affects the ultrastructural morphology of synapses, we analyzed the hippocampus by electron microscopy. Each synapse was identified primarily based on the presence of a post-synaptic density (PSD), with vesicles in close proximity of the presynaptic zone. We examined two types of PSD: macular and perforated (Harris and Weinberg 2012). Fig. 7e, f, present the number of synapses per unit area, as well as the total number of perforated synapses. While the total number of synapses did not change after any treatment, compared with chronic infusion of PBS (Fig. 7 arrowhead), chronic infusion of Wnt7a and Wnt5a increased the number of perforated synapses by twofold, which were characterized by discontinuous postsynaptic densities in dendritic spines (Fig. 7, asterisk). The increases in this type of synapse, produced by the Wnt agonists, were also significantly higher than those produced by the Wnt antagonist Dkk-1.

### 3.5. Behavioral changes induced by modulation of Wnt signaling

We evaluated the locomotor and exploration ability of animals treated with Wnt agonists or antagonist after 11 days of infusion in an open field apparatus. Fig. 8a shows no significant differences in the total exploration time and the time spent in the periphery of the arena, between the agonist-treated groups and the control group. However, a tendency towards a greater locomotion time was observed in the control, Wnt7a- and Wnt5a-treated groups, resulting in significant differences, in the total exploration time and the time spent in the periphery, between these groups and the Dkk-1-treated group. Furthermore, compared with the control and antagonist groups, the Wnt7a and Wnt5a agonists groups showed a significant increase in the number of crossings to the center of the arena. These results show that chronic administration of Wnt modulators did not generate motor alterations, lack of interest in exploring novel environments, or anxiety-like behaviors. In fact, long-term exposure to Wnt agonists resulted in significantly more time spent in the center area, suggesting these compounds have potential anti-anxiety effects.

Finally, we analyzed the functional outcome of chronic microinfusions of Wnt modulators in a spatial memory task. By day 10 of Wnt molecules administration, the memory acquisition phase was performed, and 24 h later, memory was tested (Fig. 8b). We observed no changes in the acquisition phase in any group. And the discrimination index of the recall period was not enhanced in the Wnt7a or Wnt5a treated animals, compared with controls, however, the group treated with the antagonist Dkk-1 spent similar amounts of time exploring the two objects, indicating that inhibition of canonical Wnt signaling impairs spatial memory recall.

## 4. Discussion

The protocol of long-term exposure to Wnt ligands used here shows that the activation/inactivation of Wnt pathway in the adult hippocampus can modify structural and functional parameters in this highly plastic brain region.

We demonstrate for the first time that chronic infusion of Wnt7a and Wnt5a proteins increases the number of perforated synapses as well as pre- and post-synaptic proteins associated with synapse assembly. Additionally, we showed that Dkk-1 inhibits spatial memory consolidation. We found that, in all cases, the positive effects induced by Wnt agonists were significantly higher when compared to Dkk-1, suggesting the potential therapeutic benefits of Wnt7a and Wnt5a to treat some neurodegenerative conditions characterized by an increment of Dkk-1, such as AD (Caricasole et al., 2004).

Therefore, we have provided evidence of the impact of Wnt



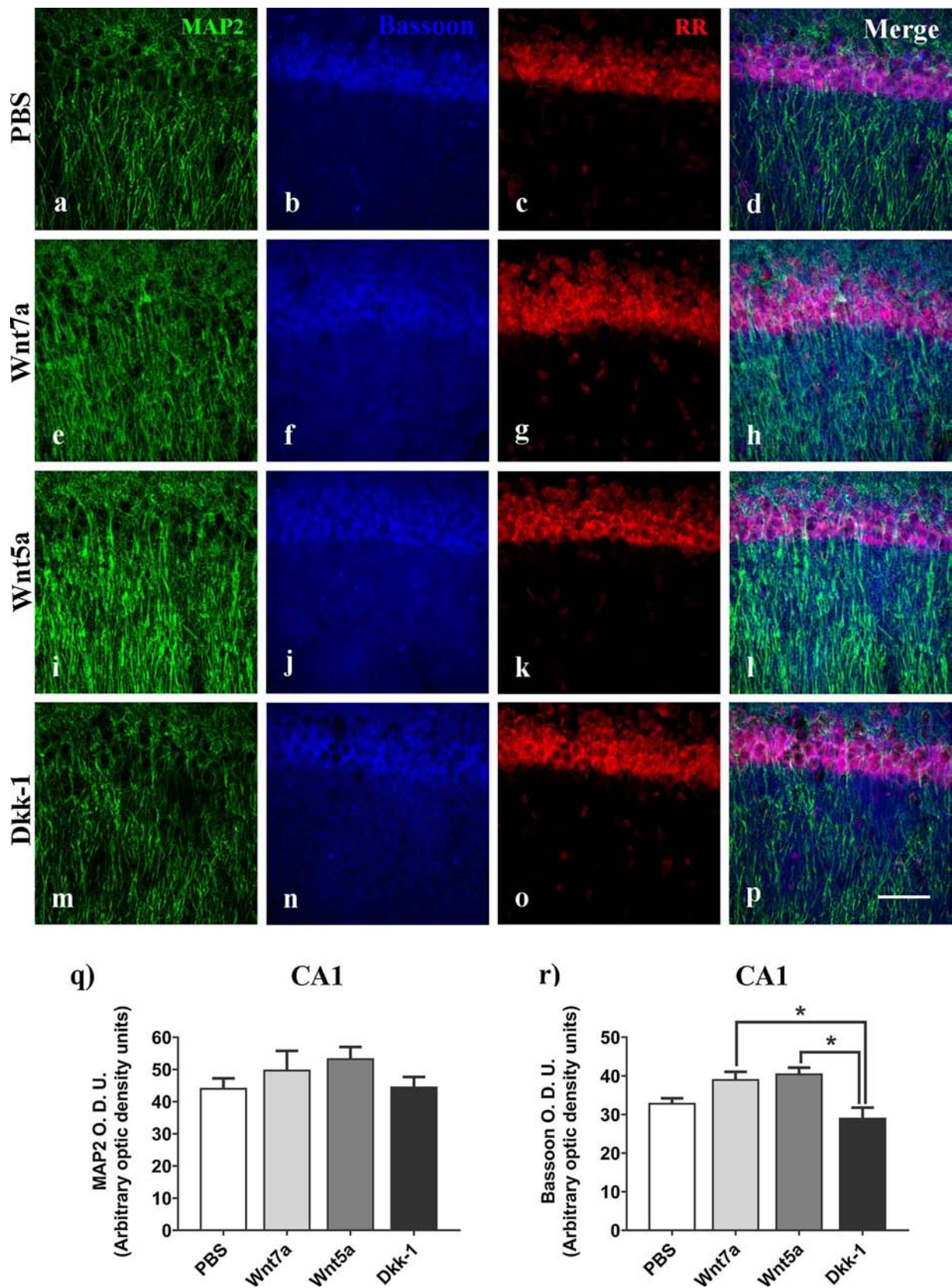
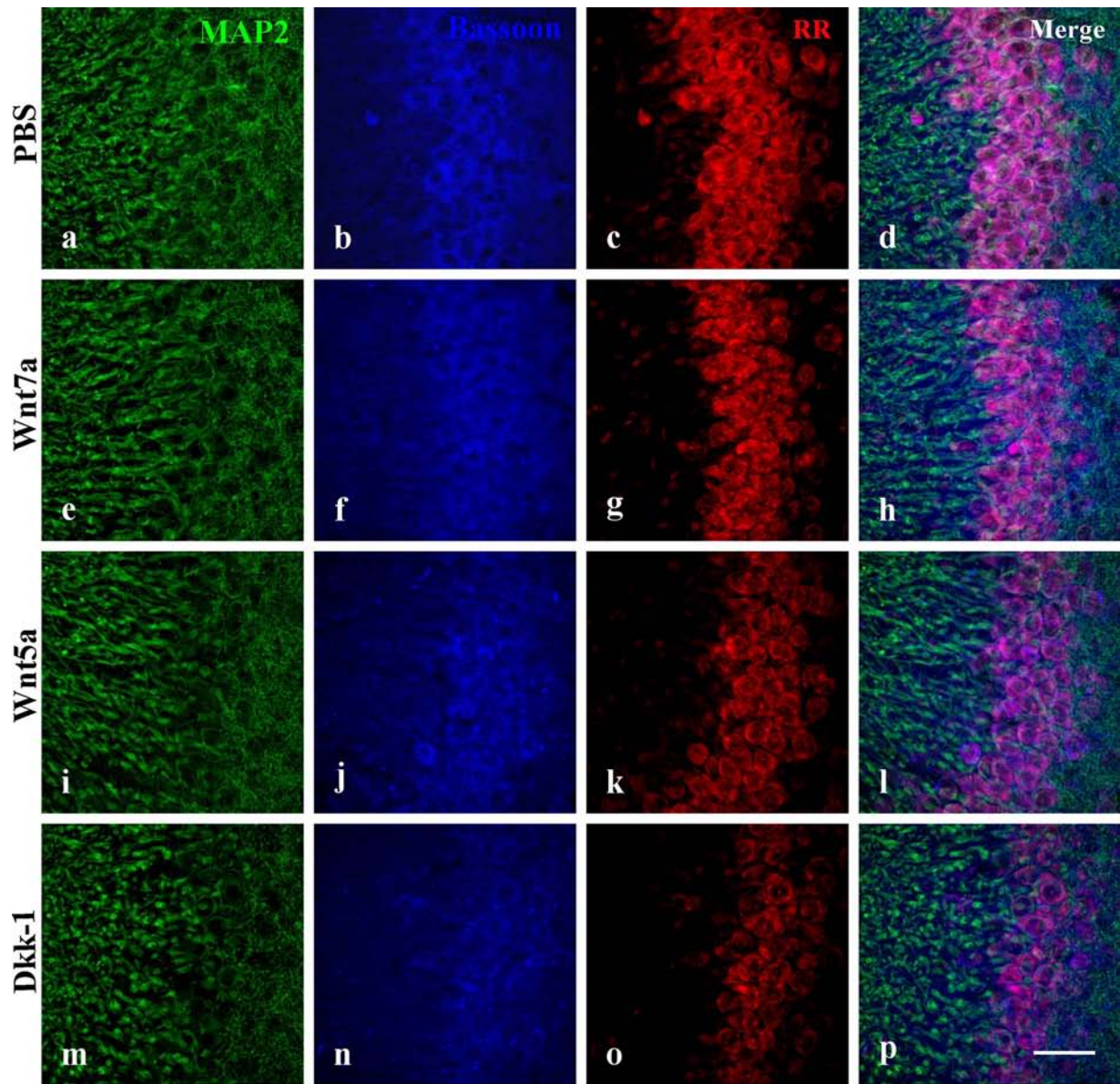


Fig. 3. Changes in MAP2 and Bassoon in CA1 after long-term exposure to Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1. Coronal sections were triple stained for MAP2 (green), Bassoon (blue) and nuclei (radiant red) (d, h, l, p). Images are representative of 4–6 sections from 3–4 different animals from each experimental group: PBS (a–d), Wnt7a (e–h), Wnt5a (i–l) and Dkk-1 (m–p) treated animals. Optical density was analyzed and is depicted as the percent of the stained area (q, r). Bars represent the mean  $\pm$  SEM. ANOVA and Tukey’s multiple comparison test \* $p < 0.05$ . Scale bar = 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 4.** Changes in MAP2 and Bassoon in CA3 after long-term exposure to Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1. Coronal sections show a triple immunofluorescence of MAP2 (green), Bassoon (blue) and nuclei (radiant red; d, h, l, p). Images are representative of 4-6 sections from 3-4 different animals from each condition: PBS (a-d), Wnt7a (e-h), Wnt5a (i-l) and Dkk-1 (m-p) treated animals. Optical density is depicted as the percent of the stained area (q, r), and represents the mean  $\pm$  SEM. ANOVA and Tukey's multiple comparison test \* $p < 0.05$ . Scale bar = 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



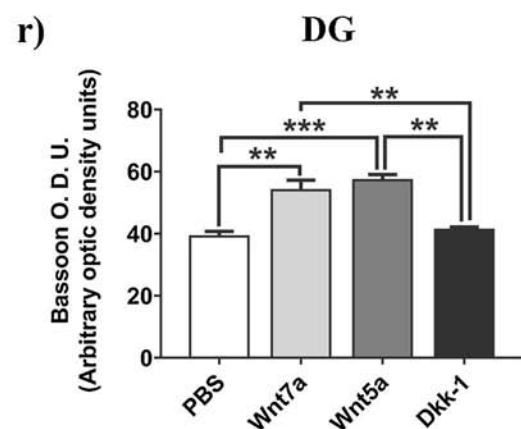
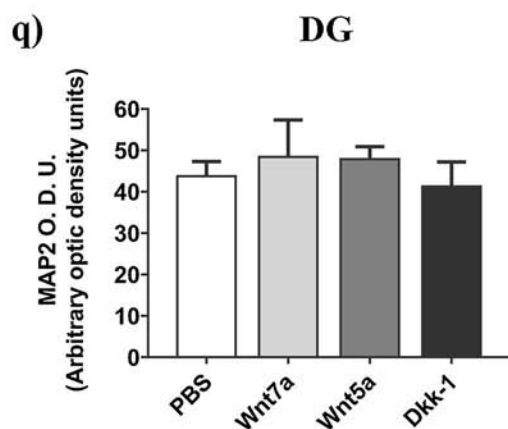
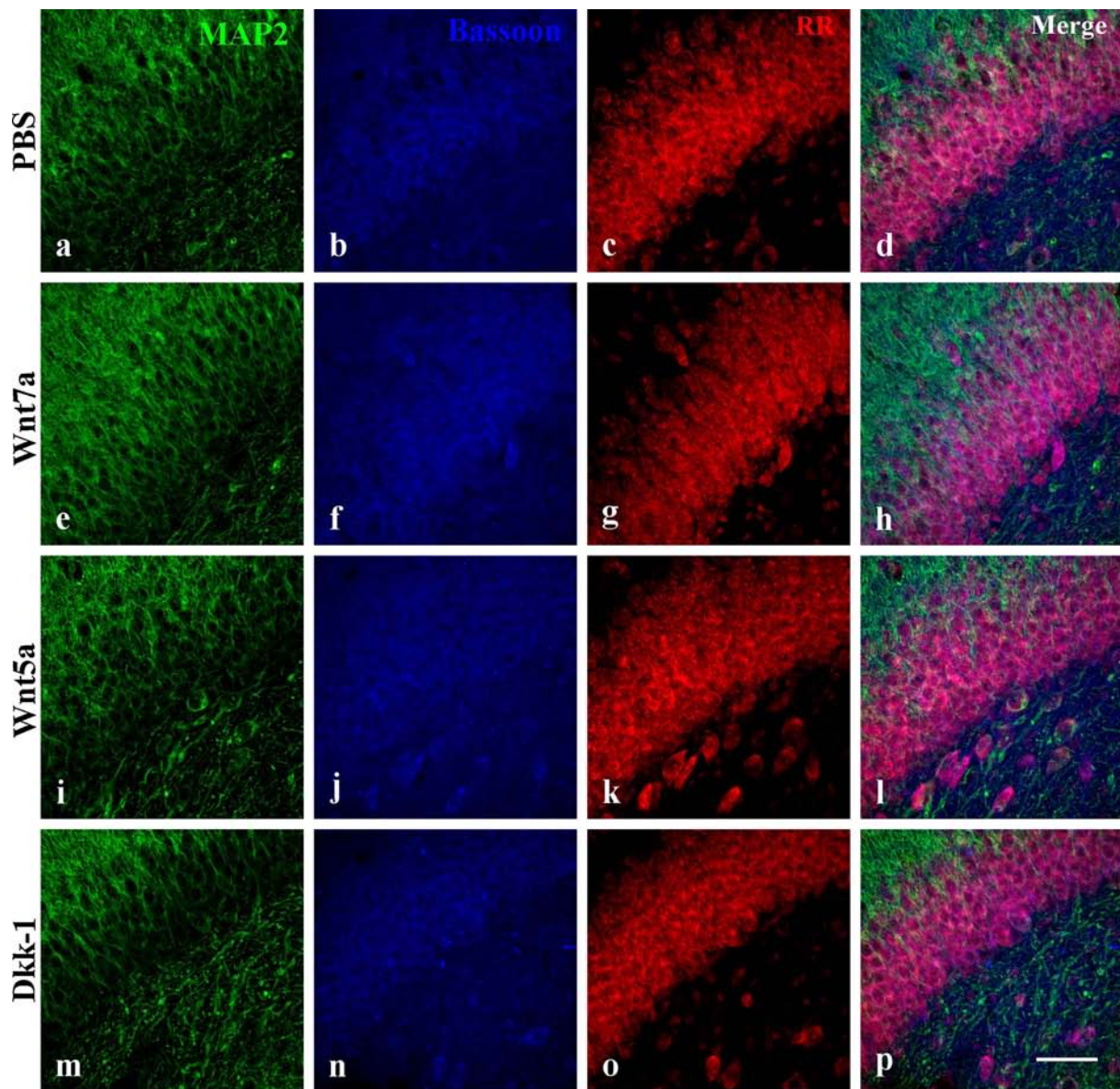
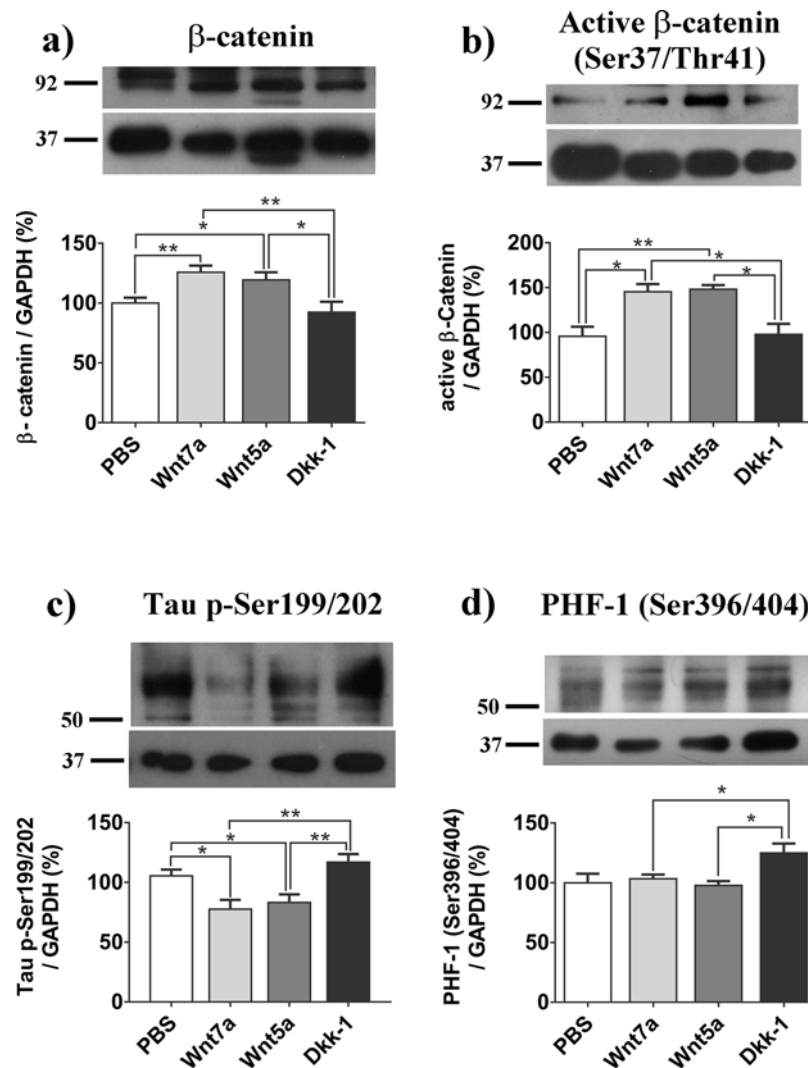


Fig. 5. Changes in MAP2 and Bassoon in DG after long-term exposure to Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1. Coronal sections show a triple immunofluorescence of MAP2 (green), Bassoon (blue) and nuclei (radiant red) (d, h, l, p). Images are representative of 4-6 sections from 3-4 different animals of each condition: PBS (a-d), Wnt7a (e-h), Wnt5a (i-l) and Dkk-1 (m-p) treated animals. Optical density is depicted as the percent of the stained area (q, r), and represents the mean  $\pm$  SEM. ANOVA and Tukey's multiple comparison test \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001. Scale bar = 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 6.** Regulation of  $\beta$ -catenin levels and tau phosphorylation by Wnt agonists and antagonist. Representative Western blots of  $\beta$ -catenin (a), active-  $\beta$ -catenin (b), tau phospho-Ser199/202 (c) and phospho-Ser396/404 tau (PHF-1 site; d) from the hippocampus of control animals (PBS), and rats chronically microinfused with Wnt7a, Wnt5a or Dkk-1. Wnt agonists increase the levels of active  $\beta$ -catenin and reduce tau phosphorylation, while Dkk-1 produces the opposite effects as compared to Wnt agonists. Bars represent the densitometric analysis of protein levels normalized with GAPDH and depict the mean  $\pm$  SEM from 6 independent experiments. Student's test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

signaling modulation *in vivo*, and of the structural changes associated with the neuronal plasticity that is compromised in some neurodegenerative diseases. Such structural changes depend on mechanisms that modify the neuronal cytoskeleton. The Wnt pathway plays a role in actin filament and microtubule remodeling in neuronal and non-neuronal cells (Nishita et al., 2006; Ohno, 2007; Purro et al., 2008). We found that Wnt7a and Wnt5a increased the number of actin-dependent structures, such as filopodia and lamellipodia in differentiated human neuroblastoma cells, although the effect of non-canonical Wnt5a was more prominent. Conversely, neurons exposed to Dkk-1 showed reduced neurite number and shorter neurites, suggesting the maintenance of mature neurites also depends, at least partially, on constitutive Wnt signaling. In the adult hippocampus, this maintenance process occurs through CaMKII- signaling, Rac1-JNK –dependent changes in actin dynamics, and CREB-mediated NMDA receptor biosynthesis, as has been demonstrated by Chen et al. (2017).

The *in vivo* protocol of long-term exposure to the Wnt agonists, Wnt7a and Wnt5a, produced differential structural changes in the adult hippocampus. In cultured neurons, Wnt7a and Wnt5a impact dendritic spine formation and clustering of the postsynaptic protein PSD-95 (Ramírez et al., 2016), as well as activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase (CAMKII) (Ciani et al., 2011; Ramírez et al., 2016). After *in vivo*

exposure to both Wnt ligands, considered canonical and non-canonical activators, we found an increase in PSD-95 protein levels by immunoblot analysis and immunohistochemical labeling, particularly in the CA3 region. PSD-95 is involved in synaptic maturation and can play a decisive role in controlling synaptic strength and activity-dependent synaptic plasticity (Béique and Andrade, 2003; Migaud et al., 1998). Accordingly, the longer PSDs we detected are likely to contain more glutamate receptors (Takumi et al., 1999), consistent with the enhanced LTP and AMPA receptor incorporation observed during lentiviral overexpression of Wnt3 (Ehrlich and Malinow, 2004; Ivanova et al., 2016). Thus, the increase in PSD-95 and the observed increment in the number of perforated synapses after Wnt7a and Wnt5a exposure suggest they participate in the formation of excitatory synapses in the hippocampus *in vivo* without changing the net number of synapses.

Synaptic plasticity may depend on elongation and retraction of axonal and dendritic branches without modify the total number of synapses, thus the augmented presence of perforated synapses, which are believed to indicate synaptic enhancement (Babits et al., 2016; Stewart et al., 2005), strongly support the role of Wnt signaling in synapse remodeling. Likewise, Fariás et al. (2009) described that Wnt5a increases the PSD-95 clustering and the glutamatergic transmission in hippocampal neurons, therefore modulating the structure and function of

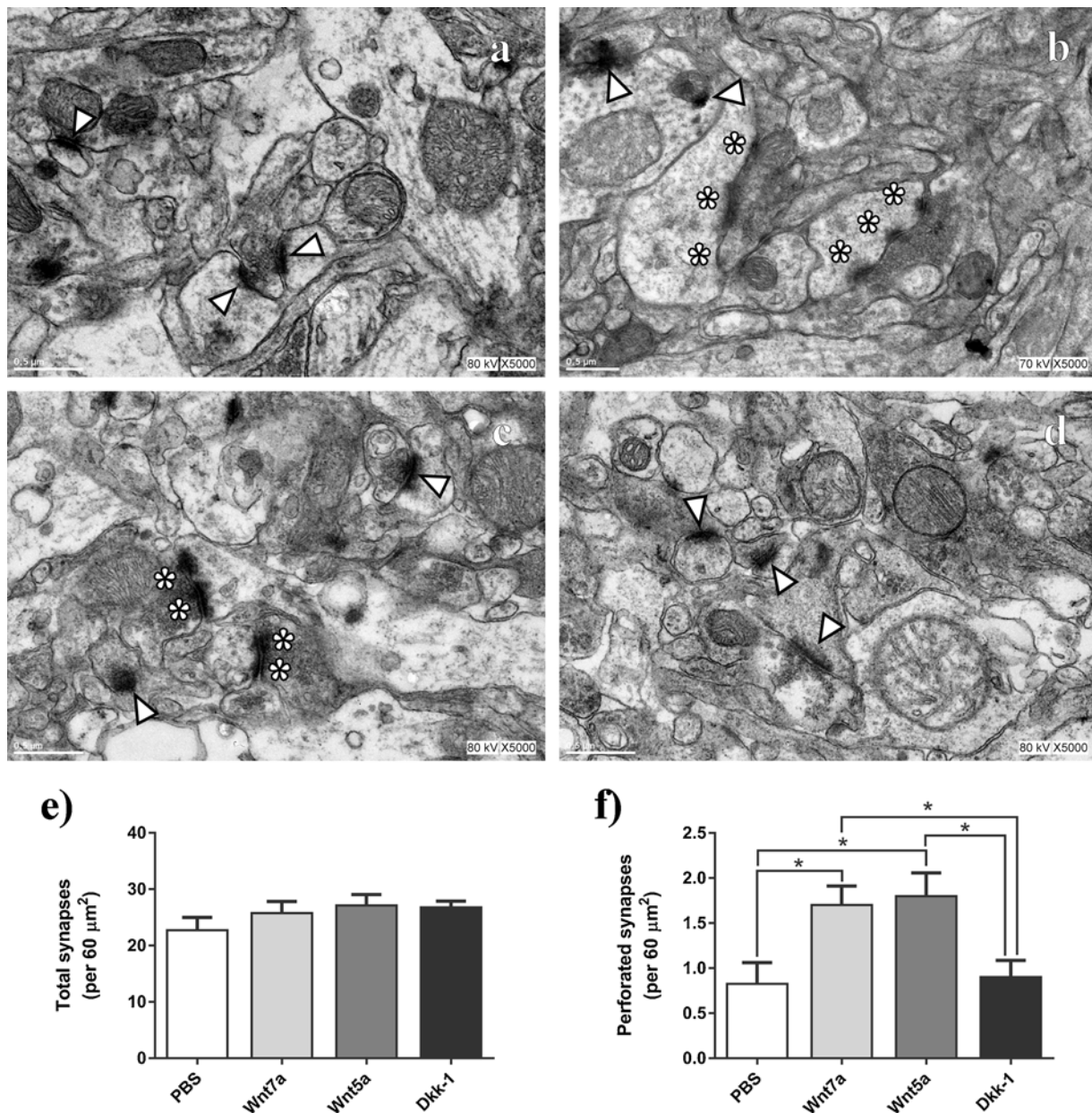


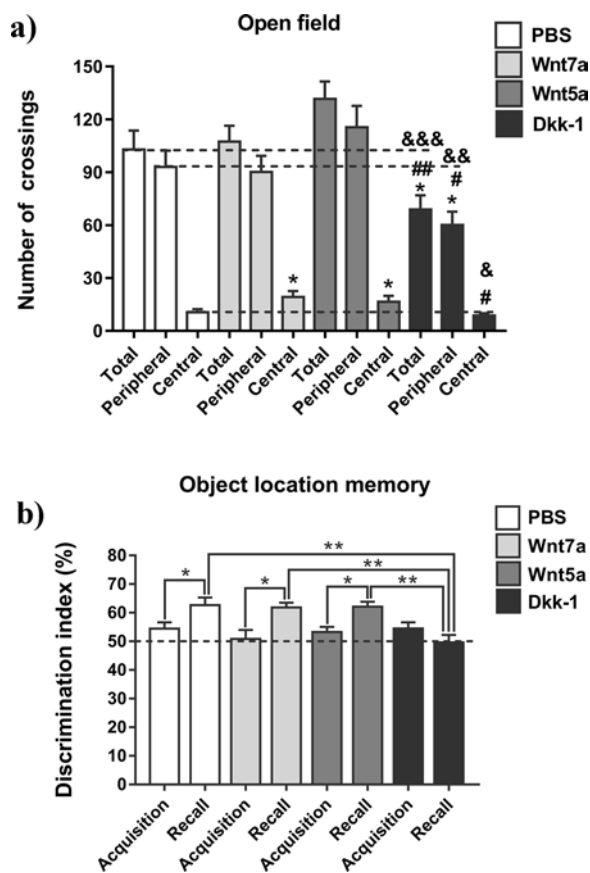
Fig. 7. Ultrastructural analysis of hippocampal synapses of animals chronically exposed to Wnt agonists and antagonist. Representative images of animals treated with PBS (a) Wnt7a (b), Wnt5a (c) and Dkk-1 (d). Typical synapses are marked with arrowhead, white asterisks denote excitatory perforated synapses. Bars represent mean ± SEM from 6-8 fields of 4 independent experiments where the total number (e) and the perforated (f) synapses were counted. Student's t test \*p < 0.05.

mammalian synapses.

Chronic Dkk-1 infusion did not produce synaptic loss or neuronal death but a significant reduction in the content of PSD-95, similar to the one Fortres et al. (2013) found after administering a single dose of Dkk-1 to mice hippocampus. Interestingly, Wnt5a exposure also increased the density of the presynaptic marker of active zones, Bassoon, in CA3 and DG regions of the hippocampus, without increasing synaptophysin levels. The active zone in presynaptic regions is the synaptic vesicle release site; thus, the density of presynaptic active zones is closely related to the efficiency of synaptic transmission (revised by Clarke et al., 2012). Recently, it was found that Bassoon protein mediates the recruitment of Ca<sup>2+</sup> –dependent voltage channels into the presynaptic active sites, therefore regulating neurotransmission (Davydova et al., 2014). Hence, the observed increment in Bassoon levels mediated by Wnt5a also supports this ligand could increase presynaptic efficiency without affecting the total number of synapses. Similar to the outcome of Wnt5a treatment, exposure to environmental

enrichment produced an increase in the density of active zones of mossy fibers in CA3 hippocampal regions (Bednarek and Caroni, 2011). Thus, it is feasible to speculate that chronic exposure to the Wnt agonists used in the present work closely resembles the plasticity effect elicited by environmental enrichment (Gogolla et al., 2009). This effect nicely correlates with the present findings of Wnt-induced increases in PSD-95, perforated synapses and Bassoon protein.

Presently, we lack information regarding the signal transduction pathways that may be activated *in vivo* by Wnt agonists, but we found a similar increase in the active β-catenin pool induced by both Wnt7a and Wnt5a, and a decrease induced by Dkk-1. Although Wnt5a is considered a non-canonical Wnt ligand, it could transduce not only β-catenin-independent but also β-catenin-dependent pathways, depending on the type of frizzled receptors and co-receptor levels (Kumawat and Gosens, 2016; Ring et al., 2014; Sato et al., 2010). During long-term exposure to two agonists and one antagonist, we also found changes in the phosphorylation state of the microtubule-associated protein, tau. These



**Fig. 8.** Behavioral changes in the open field (a) and in the object location memory (b) tasks after long-term exposure to Wnt agonists and antagonist. The total number of crossings, the number of crossings to peripheral quadrants and to the center of the open field are depicted in (a) ( $n = 7-10$ ). Statistical differences are represented by \* when compared to controls; # to Wnt7a and & to Wnt5a. The exploration index was calculated for the acquisition phase at 20' and at 3' for the recall period, and is shown in (b) ( $n = 5-8$ ). \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA).

results suggest that Wnt agonists may reduce GSK-3 $\beta$  activity, which diminishes tau phosphorylation at Ser199/202 and Ser396. This points to the beneficial effect of Wnt activation to ameliorate the tau hyperphosphorylation that occurs in AD (Augustinack et al., 2002). Interestingly, after *in vivo* Dkk-1 administration, we did not observe a significant increment in the PHF-1 signal as compared to PBS treated rats, which agrees with our previous work, where we found that Dkk-1 did not increase this phosphoepitope in young hippocampal slices (Salcedo-Tello et al., 2014). Changes in the rate of tau phosphorylation may determine microtubule stability and axonal plasticity in the adult hippocampus (Regan et al., 2015).

Structural remodeling might underlie certain aspects of learning and memory by rearranging synaptic contacts within local circuits. Thus, we focused on the performance on a hippocampal-dependent memory task to analyze the impact of the structural changes on behavioral performance. Interestingly, the rats microinfused with Wnt5a were more active in the open field, but behaved like the control animals in the place recognition task. Moreover, Wnt7a was not associated with improved performance after chronic exposure, but was related with increased activity in the center of the arena, suggesting these two Wnt ligands reduce anxiety. It is interesting that Dkk-1 exerts its inhibitory effect on memory recall after a single injection into the hippocampus in the novel object recognition paradigm, indicating the role of canonical Wnt activation on memory consolidation (Fortress et al., 2013), as well as on a spatial memory test after inducible Dkk-1 expression (Marzo et al., 2016), and after chronic infusion in the object location paradigm, as present results show.

## 5. Conclusions

Taken together, the present results provide new evidence suggesting that mature circuits in the adult hippocampus can be modified via different levels of agonists and antagonists of Wnt signaling, which impact both synapse structure and behavioral performance. In addition, we present support of the positive impact of Wnt stimulation to promote the expression of plasticity molecules, and the reduction of tau hyperphosphorylation, associated with neurodegenerative diseases.

## Conflict of interest

None.

## Acknowledgments

This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (DGAPA, PAPIIT IN202615). The authors thank Patricia Ferrera for technical assistance and Miguel Tapia-Rodríguez for confocal microscopy assistance. A. Ortiz-Matamoros is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 269645 from CONACYT.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.008>.

## References

- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M., Hyman, B.T., 2002. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 103, 26–35.
- Béique, J.-C., Andrade, R., 2003. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol.* 546, 859–867. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2002.031369>.
- Babits, R., Szóke, B., Sótónyi, P., Rácz, B., 2016. Food restriction modifies ultrastructure of hippocampal synapses. *Hippocampus* 26, 437–444. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22533>.
- Bednarek, E., Caroni, P., 2011.  $\beta$ -adducin is required for stable assembly of new synapses and improved memory upon environmental enrichment. *Neuron* 69, 1132–1146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.034>.
- Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A.J., Caruso, A., Storto, M., Gaviraghi, G., Terstappen, G.C., Nicoletti, F., 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J. Neurosci.* 24, 6021–6027. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1381-04.2004>.
- Cerpa, W., Godoy, J.A., Alfaro, I., Fariás, G.G., Metcalfe, M.J., Fuentealba, R., Bonansco, C., Inestrosa, N.C., 2008. Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 283, 5918–5927. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705943200>.
- Chen, J., Chang, S.P., Tang, S.J., 2006. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 281, 11910–11916. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M511920200>.
- Chen, C.-M., Orefice, L.L., Chiu, S.-L., LeGates, T.A., Hattar, S., Huginir, R.L., Zhao, H., Xu, B., Kuruvilla, R., 2017. Wnt5a is essential for hippocampal dendritic maintenance and spatial learning and memory in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E619–E628. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1615792114>.
- Ciani, L., Boyle, K.A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D.M., Gibb, A.J., Salinas, P.C., 2011. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10732–10737. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1018132108>.
- Clarke, G.L., Chen, J., Nishimune, H., 2012. Presynaptic active zone density during development and synaptic plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 12. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2012.00012>.
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Schneider, R., Schröder, M.S., Altmann, W.D., Henneberger, C., Rusakov, D.A., Gundelfinger, E.D., Fejtova, A., 2014. Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82, 181–194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.012>.
- Ehrlich, I., Malinow, R., 2004. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 24, 916–927. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4733-03.2004>.
- Fariás, G.G., Alfaro, I.E., Cerpa, W., Grabowski, C.P., Godoy, J.A., Bonansco, C., Inestrosa, N.C., 2009. Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal



- neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 15857–15866. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M808986200>.
- Fortress, A.M., Schram, S.L., Tuscher, J.J., Frick, K.M., 2013. Canonical Wnt signaling is necessary for object recognition memory consolidation. *J. Neurosci.* 33, 12619–12626. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0659-13.2013>.
- Gogolla, N., Galimberti, I., Caroni, P., 2007. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 516–524. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2007.09.002>.
- Gogolla, N., Galimberti, I., Deguchi, Y., Caroni, P., 2009. Wnt signaling mediates experience-related regulation of synapse numbers and mossy fiber connectivities in the adult hippocampus. *Neuron* 62, 510–525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.022>.
- Gray, E.G., 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* 93, 420–433.
- Harris, K.M., Weinberg, R.J., 2012. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a005587. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>.
- Inestrosa, N.C., Arenas, E., 2010. Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 77–86. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2755>.
- Inestrosa, N.C., Toledo, E.M., 2008. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurodegener.* 3, 9. <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-3-9>.
- Inestrosa, N.C., Varela-Nallar, L., 2015. Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell Tissue Res.* 359, 215–223. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1996-4>.
- Ivanova, O.Y., Dobryakova, Y.V., Salozhin, S.V., Aniol, V.A., Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V., Markevich, V.A., 2016. Lentiviral modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling affects in vivo LTP. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1–15. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-016-0455-z>.
- Kumawat, K., Gosens, R., 2016. WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 567–587. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-2076-y>.
- Lee, S.M., Tole, S., Grove, E., McMahon, A.P., 2000. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127, 457–467.
- Liu, F., Li, B., Tung, E.-J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C.-X., 2007. Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3429–3436. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>.
- Machon, O., van den Bout, C.J., Backman, M., Kemler, R., Krauss, S., 2003. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* 122, 129–143.
- Maguschak, K.A., Ressler, K.J., 2011. Wnt signaling in amygdala-dependent learning and memory. *J. Neurosci.* 31, 13057–13067. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3248-11.2011>.
- Marzo, A., Galli, S., Lopes, D., McLeod, F., Podpolny, M., Segovia-Roldan, M., Ciani, L., Purro, S., Caccuci, F., Gibb, A., Salinas, P.C., 2016. Reversal of synapse degeneration by restoring Wnt signaling in the adult hippocampus. *Curr. Biol.* 26, 2551–2561. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.024>.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M.F., Morris, R.G., Morrison, J.H., O'Dell, T.J., Grant, S.G., 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433–439. <http://dx.doi.org/10.1038/24790>.
- Nishita, M., Yoo, S.K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y., 2006. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J. Cell Biol.* 175, 555–562. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200607127>.
- Ohno, S., 2007. Extrinsic Wnt signalling controls the polarity component aPKC. *Nat. Cell Biol.* 9, 738–740. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0707-738>.
- Oliva, C.A., Inestrosa, N.C., 2015. A novel function for Wnt signaling modulating neuronal firing activity and the temporal structure of spontaneous oscillation in the entorhinal-hippocampal circuit. *Exp. Neurol.* 269, 43–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.027>.
- Oliva, C.A., Vargas, J.Y., Inestrosa, N.C., 2013a. Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 224. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00224>.
- Oliva, C.A., Vargas, J.Y., Inestrosa, N.C., 2013b. Wnt signaling: Role in LTP, neural networks and memory. *Ageing Res. Rev.* 12, 786–800. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2013.03.006>.
- Ortiz-Matamoros, A., Salcedo-Tello, P., Avila-Muñoz, E., Zepeda, A., Arias, C., 2013. Role of wnt signaling in the control of adult hippocampal functioning in health and disease: therapeutic implications. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 465–476. <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X11311050001>.
- Purro, S.A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E., Salinas, P.C., 2008. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for Adenomatous Polyposis Coli. *J. Neurosci.* 28, 8644–8654. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-08.2008>.
- Ramírez, V.T., Ramos-Fernández, E., Henríquez, J.P., Lorenzo, A., Inestrosa, N.C., 2016. Wnt-5a/frizzled9 receptor signaling through the Gao-G $\beta$ y complex regulates dendritic spine formation. *J. Biol. Chem.* 291, 19092–19107. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.722132>.
- Regan, P., Piers, T., Yi, J.-H., Kim, D.-H., Huh, S., Park, S.J., Ryu, J.H., Whitcomb, D.J., Cho, K., 2015. Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J. Neurosci.* 35, 4804–4812. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>.
- Reynolds, C.P., Biedler, J.L., Spengler, B.A., Reynolds, D.A., Ross, R.A., Frenkel, E.P., Smith, R.G., 1986. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 76, 375–387.
- Ring, L., Neth, P., Weber, C., Steffens, S., Faussner, A., 2014.  $\beta$ -Catenin-dependent pathway activation by both promiscuous canonical WNT3a-, and specific non-canonical WNT4- and WNT5a-FZD receptor combinations with strong differences in LRP5 and LRP6 dependency. *Cell. Signal.* 26, 260–267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.021>.
- Rosen, E.Y., Wexler, E.M., Versano, R., Coppola, G., Gao, F., Winden, K.D., Oldham, M.C., Martens, L.H., Zhou, P., Farese, R.V., Geschwind, D.H., 2011. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated by progranulin deficiency. Implicating Wnt Signaling. *Neuron* 71, 1030–1042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.07.021>.
- Salcedo-Tello, P., Hernández-Ortega, K., Arias, C., 2014. Susceptibility to GSK3 $\beta$ -induced tau phosphorylation differs between the young and aged hippocampus after Wnt signaling inhibition. *J. Alzheimers Dis.* 39, 775–785. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-130749>.
- Salinas, P.C., 2005. Signaling at the vertebrate synapse: new roles for embryonic morphogens? *J. Neurobiol.* 64, 435–445. <http://dx.doi.org/10.1002/neu.20159>.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., Kikuchi, A., 2010. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 29, 41–54. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.322>.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Shimogori, T., VanSant, J., Paik, E., Grove, E.A., 2004. Members of the Wnt Fz, and Frp gene families expressed in postnatal mouse cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 473, 496–510. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20135>.
- Stewart, M.G., Medvedev, N.I., Popov, V.I., Schoepfer, R., Davies, H.A., Murphy, K., Dall'érac, G.M., Kraev, I.V., Rodríguez, J.J., 2005. Chemically induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 21, 3368–3378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04174.x>.
- Tabatadze, N., Tomas, C., McGonigal, R., Lin, B., Schook, A., Routtenberg, A., 2012. Wnt transmembrane signaling and long-term spatial memory. *Hippocampus* 22, 1228–1241. <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20991>.
- Takumi, Y., Ramírez-León, V., Laake, P., Rinivik, E., Ottersen, O.P., 1999. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* 2, 618–624. <http://dx.doi.org/10.1038/10172>.
- Toledo, E.M., Colombres, M., Inestrosa, N.C., 2008. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog. Neurobiol.* 86, 281–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.001>.
- Varela-Nallar, L., Grabowski, C.P., Alfaro, I.E., Alvarez, A.R., Inestrosa, N.C., 2009. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev.* 4, 41. <http://dx.doi.org/10.1186/1749-8104-4-41>.
- Varela-Nallar, L., Parodi, J., Fariás, G.G., Inestrosa, N.C., 2012. Wnt-5a is a synaptogenic factor with neuroprotective properties against A $\beta$  toxicity. *Neurodegener. Dis.* 10, 23–26. <http://dx.doi.org/10.1159/000333360>.
- Vargas, J.Y., Fuenzalida, M., Inestrosa, N.C., 2014a. In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *J. Neurosci.* 34, 2191–2202. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0862-13.2014>.
- Vargas, J.Y., Fuenzalida, M., Inestrosa, N.C., 2014b. In vivo activation of Wnt signaling pathway enhances cognitive function of adult mice and reverses cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *J. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0862-13.2014>.
- Vogel-Ciernia, A., Wood, M.A., 2014. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* 69 (8.31), 1–17. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>.
- Xu, N., Zhou, W.-J., Wang, Y., Huang, S.-H., Li, X., Chen, Z.-Y., 2015. Hippocampal Wnt3a is necessary and sufficient for contextual fear memory acquisition and consolidation. *Cereb. Cortex* 25, 4062–4075. <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhu121>.