



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT EN
ASTROCITOS Y SU POSIBLE PAPEL EN LA
NEUROPROTECCIÓN Y LA NEUROTOXICIDAD**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Licenciada en Psicología

PRESENTA:

Ishbelt Denisse Morales Moreno

Directora de tesis:

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Revisor interno:

Dr. Octavio César García Gonzáles



Ciudad Universitaria, CDMX, 2023



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 fue realizado en el laboratorio C-210 del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental a cargo de la Dra. Clorinda Arias Álvarez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, DGAPA IN204621.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Psicología y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A mi tutora, la Dra. Clorinda Arias Álvarez, por permitirme formar parte de su laboratorio, por su apoyo, paciencia y guía durante el desarrollo de este proyecto. Por crear un grupo de investigación unido que siempre esta dispuesto a apoyar y ayudarnos a crecer. Por ser un gran ejemplo como científica y una gran persona.

A la Dra. Lizbeth Esmeralda García Velázquez por su tiempo, por compartir sus conocimientos y por la paciencia brindada en todo el proceso de aprendizaje.

A la Dra. Evangelina Ávila Muñoz por su apoyo técnico en la realización de los cultivos primarios de astrocitos y su disposición de enseñarnos siempre.

A la Dra. Angélica Zepeda Rivera por sus observaciones.

A la QFB Patricia Ferrera Boza por su apoyo técnico esencial en mi proyecto y en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez por su apoyo técnico en microscopia confocal.

Al Dr. Octavio César García González por sus valiosos comentarios en la revisión de este proyecto.

A los miembros del sínodo, Dr. César Casasola Castro, Mtro. José Antonio Hernández Santos y Dra. Claudia Gómez Acevedo, por su retroalimentación para este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá, por apoyarme en todas mis decisiones, por ser mi impulso y animarme en todo el camino.

A mi papá, por más que crezca siempre vas a estar aquí.

A Ximena, Andrea, Isaí, Diana y Rodrigo por ser mi apoyo incondicional, por escucharme en todo momento y por el cariño que me han dado en todos estos años. Por compartir la vida y crecer juntos.

A Manuel y Ángel por hacerme reír siempre y estar presentes.

A los integrantes del laboratorio, por las mejores conversaciones, por todas las risas y ayudarme a aprender de este mundo: Liz, Isela, Manu, Vale, César, Eva, Eduardo, Elizabeth y Kari.

Índice

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE ABREVIACIONES	7
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 ASTROCITOS	10
1.1.1 MORFOLOGÍA DE LOS ASTROCITOS	11
1.1.2 FISIOLÓGÍA DE LOS ASTROCITOS	14
1.2 TNFA	17
1.3 ÁCIDO GLUTÁMICO	20
1.4 VÍA WNT	23
1.4.1 WNT EN EL SISTEMA NERVIOSO	26
1.4.2 WNT EN ASTROCITOS	29
1.5 DKK1	32
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
3 HIPÓTESIS	37
4 OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GENERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5 MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS	38
5.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	39

5.3 WESTERN BLOT	41
5.4 INMUNOFLUORESCENCIA	43
5.5 ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE DKK1	44
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
6 RESULTADOS	45
6.1 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE DKK1 INDUCIDOS POR ÁCIDO GLUTÁMICO	45
6.2 CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE DKK1 INDUCIDOS POR TNFA	46
6.3 CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE DKK1 POSTERIOR A 6 HORAS	48
6.4 CAMBIOS EN LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE DKK1 POSTERIOR A 24 HORAS	50
7 DISCUSIÓN	52
8 CONCLUSIÓN	55
9 REFERENCIAS	58

Lista de figuras

Figura 1	Cronología del proceso de astrogénesis y neurogénesis en roedores	11
Figura 2	Reconstrucción 3D de astrocitos marcados con GFAP	13
Figura 3	Mecanismo de TNF α en neuroinflamación y excitotoxicidad	19
Figura 4	Vías de señalización de Wnt	26
Figura 5	Efectos del tratamiento de ácido glutámico sobre DKK1	46
Figura 6	Efectos del tratamiento de TNF α sobre DKK1	47
Figura 7	Análisis de la distribución celular de DKK1 en astrocitos posterior a 6 horas de tratamientos	49
Figura 8	Análisis de la distribución celular de DKK1 en astrocitos posterior a 24 horas de tratamientos	51
Figura 9	Efectos sobre la producción de DKK1	56

Lista de tablas

Tabla 1	Composición de soluciones utilizadas para cultivo primario de astrocitos	40
Tabla 2	Composición de soluciones utilizadas para Western Blot	42
Tabla 3	Anticuerpos primarios para Western Blot	42
Tabla 4	Anticuerpos secundarios para Western Blot	43

Lista de abreviaciones

A1	Astrocitos con fenotipo A1 pro inflamatorio	LPS	Lipopolisacárido
A2	Astrocitos con fenotipo A2 anti inflamatorio	LRP5/6	Receptor relacionado a proteínas de baja densidad 5/6
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico	mGluR5	Receptor metabotrópico glutamatérgico 5

APC	Poliposis adenomatosa de colon	MPTP	Neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,4,6-tetrahidropiridina
BHE	Barrera hematoencefálica	NFκB	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras κ de las células B activadas
CK-1α	Caseína cinasa-1α	NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
DKK1	Dickkopf	PSD-95	Proteína de densidad postsináptica
Dvl	Dishevelled	PTK7	Proteína quinasa Tyr 7
EA	Enfermedad de Alzheimer	ROR	Receptor huérfano relacionado con RAR
EAAT1/2	Transportador de aminoácidos excitadores 1/2	SFRP	Proteína 1 relacionada con frizzled secretada
EP	Enfermedad de Parkinson	SNC	Sistema nervioso central
Fzd	Frizzled	STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial	solTNFα	TNFα soluble
GSK-3β	Cinasa 3 de la sintasa de glucógeno	TCF	Factor de transcripción de células T
IFNγ	Interferón γ	tmTNFα	TNFα transmembranal
IL-1α	Interleucina 1α	TNFα	Factor de necrosis tumoral-α
IL-1β	Interleucina 1β	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
LEF	Factor potenciador linfoide	vGlut1	Transportador vesicular de glutamato

Resumen

La vía de señalización de Wnt regula procesos de plasticidad sináptica promoviendo morfogénesis dendrítica, guía axonal y el ensamblaje de los sitios pre y postsinápticos. La desregulación de la vía Wnt por la presencia de concentraciones altas del antagonista Dickkopf-1 (DKK1) se ha asociado con la disrupción de dichos mecanismos de la plasticidad sináptica y enfermedades neurodegenerativas que conllevan estados proinflamatorios como la Enfermedad de Alzheimer y la Enfermedad de Parkinson. Los astrocitos participan en la respuesta inflamatoria cerebral mediante la expresión y liberación de mediadores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que se mantienen elevados en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Una posible ruta que conecta a los astrocitos con modificaciones de la estructura o función neuronales pudiera ser, a través de las variaciones en la producción y secreción de antagonistas Wnt. Con base en lo anterior, la presente tesis buscó analizar bajo qué condiciones los astrocitos contribuyen a la producción diferencial del antagonista endógeno de la vía Wnt, DKK1 y analizar su distribución celular en cultivos primarios de astrocitos de rata ante la presencia de dos estímulos diferentes: la molécula proinflamatoria, TNF α y el neurotransmisor, ácido glutámico.

Los resultados obtenidos sobre el contenido proteico de DKK1 nos indican que los astrocitos expuestos por 24 horas al ácido glutámico generan un decremento en los niveles de DKK1 con respecto al grupo control. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el contenido proteico de DKK1 ante el tratamiento de TNF α en ninguna temporalidad. Por otro lado, cuantificamos las unidades de intensidad de DKK1 dentro del núcleo y del citoplasma de los astrocitos bajo las mismas condiciones. Los resultados indican que posterior a 6 horas de exposición con ácido glutámico se genera un incremento significativo en el marcaje de DKK1 dentro del núcleo, apuntando a una posible relocalización del antagonista mientras que no se observaron efectos significativos con tratamiento de TNF α en la localización nuclear de DKK1. La exposición por 6 horas a ambos tratamientos no produjo cambios en la localización citoplasmática. En contraste, la exposición de astrocitos por 24 horas ante el tratamiento de TNF α reduce significativamente DKK1 en el núcleo en comparación a su control y al tratamiento de ácido glutámico.

1 Introducción

1.1 Astrocitos

La población de células que conforman el sistema nervioso central (SNC), está clasificada en dos grupos principales: las neuronas y las células gliales. Las células gliales comprenden a los oligodendrocitos, la microglía, las células ependimarias y los astrocitos que en conjunto llevan a cabo funciones de soporte, protección y proveen señales para el funcionamiento neuronal. Los astrocitos representan entre un 20 a 40% de las células en el cerebro, sin embargo, la relación neurona/glía en el cerebro humano es muy variable entre diferentes estructuras cerebrales y subregiones (Herculano-Houzel, 2014; von Bartheld, Bahney, & Herculano-Houzel, 2017).

El término astrocito (αστρον κητος; astron: estrella y kytos: un vaso hueco, célula posterior, célula estelar), fue introducido por Michael von Lenhossék, un anatomista e histólogo. Para 1895, después de pasar por diversas connotaciones referentes a su morfología y fisiología, fueron inicialmente reconocidos como células gliales por Rudolph Virchow (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

Los astrocitos se originan de células progenitoras neurales derivadas del ectodermo del tubo neural posterior a la etapa de neurogénesis temprana alrededor de la etapa embrionica E18 a perinatal P0 en roedores. Lo anterior permite un periodo de tiempo durante el cual las señales extrínsecas que se requieren para la formación de astrocitos son proporcionadas por las neuronas (Sloan & Barres, 2014). A través de mecanismos celulares complejos intrínsecos y extrínsecos, los astrocitos también se pueden desarrollar a partir de la diferenciación directa de la glía radial que genera astrocitos o progenitores gliales intermedios. En etapas tempranas perinatales también se pueden generar de la proliferación local de astrocitos diferenciados e incluso de células gliales indiferenciada tipo NG2 (Verkhatsky & Nedergaard, 2018) (Figura 1).

Una de las vías más importantes para promover la expresión de genes específicos astrocíticos está mediado por la vía canónica JAK/STAT (F. He et al., 2005).

Mientras se desarrolla la corteza cerebral durante el periodo embrionario tardío E16-E18 a perinatal P0 en ratas, las glías radiales de la zona ventricular inicialmente sufren numerosas divisiones celulares asimétricas y generan precursores gliales

intermedios o glioblastos, los cuales migran a través de la glía radial dando como resultado agrupamientos de astrocitos en las mismas columnas corticales (Su Akdemir, Yu-Szu Huang, & Deneen, 2020).

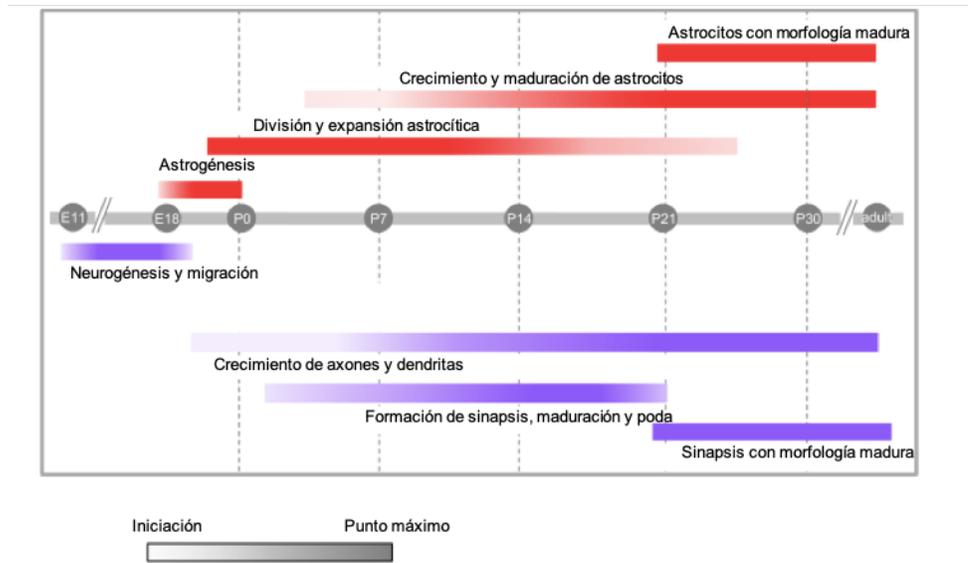


Figura 1. Cronología del proceso de astrogénesis y neurogénesis en roedores. Se muestra la cronología (gris) desde etapas embrionarias (E) hasta el final del primer mes postnatal (P) de los procesos clave del desarrollo que ocurren en los astrocitos (rojo, superior) y las neuronas (violeta, inferior). Modificado de Farhy-Tselnicker & Allen, (2018).

Una vez que diversos marcadores para los precursores de astrocitos como Glast, FABP7/BLBP, FGFR3 y Asef son adquiridos y comprometen su linaje como astrocitos migrarán desde la zona ventricular y la zona subventricular a lo largo de los procesos radiales hasta su destino final (Molofsky & Deneen, 2015).

Los astrocitos recién generados continuarán dividiéndose localmente y después de la migración iniciarán la diferenciación terminal que los llevará a una maduración morfológica y funcional; de tal forma que los astrocitos, oligodendrocitos y microglía estén a manera de mosaico en dominios que no se sobreponen con otras células del mismo tipo (Herculano-Houzel, 2014; Su Akdemir et al., 2020).

1.1.1 Morfología de los astrocitos

A medida que la sustancia blanca y gris se desarrolla en las primeras semanas de desarrollo postnatal, entre P7-P14, los astrocitos diferenciados en la capa cortical externa inician su división de manera simétrica y generan astrocitos más pequeños, menos

ramificados que comienzan a expresar procesos celulares que sobresalen del soma y terminan con estructuras en forma de filipodio (Su Akdemir et al., 2020).

Durante la semana tres y cuatro posteriores, P21-P28, desarrollan su característica morfología esponjiforme. Los procesos primarios que tienen una forma de filipodio desaparecen y comienzan a generar procesos astrocíticos perisinápticos, los cuales son procesos distales menores de 50 nm que se vuelven más delgados y ocupan un dominio espacial único. En este espacio se aprecian procesos que forman bordes con un empalme limitado entre células contiguas (Freeman, 2010) y los procesos más finos que comienzan a ensamblarse y señalizar con otras partes del tejido nervioso hasta llegar a madurar entre diferentes subtipos, siendo los principales: protoplasmáticos y fibrosos (Su Akdemir et al., 2020).

Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran en la materia gris del cerebro, residen en las capas 2-6 de la corteza y en la médula espinal (Oberheim et al., 2009). Están caracterizados por su forma esponjiforme con diámetro de entre 40-60 μm y procesos primarios de 50 μm aproximadamente (Sofroniew & Vinters, 2010; B. Zhou, Zuo, & Jiang, 2019). Sus pies terminales están organizados en dominios separados y sin empalmarse para formar un contacto directo con los vasos sanguíneos y recubren tanto la superficie pial como las neuronas pre y post sinápticas a través de sus procesos perisinápticos finos que surgen de sus ramas secundarias y terciarias formando sinapsis tripartitas (Farhy-Tselnicker & Allen, 2018), por lo que, participan activamente en el desarrollo y la transmisión sináptica en muchas áreas del cerebro (Oberheim, Goldman, & Nedergaard, 2012) (Figura 2).

Por otro lado, los astrocitos fibrosos que se encuentran en la sustancia blanca muestran una morfología elongada, tienen cuerpos celulares más pequeños, son más largos, tienen mayor densidad de filamentos intermedios, prolongaciones más delgadas casi sin ramificar y sus pies terminales están en contacto con oligodendrocitos, tractos axonales mielinizados como el cuerpo calloso, además de que envuelven nodos de Ranvier (Ben Haim & Rowitch, 2016). Este tipo de astrocitos desempeñan un papel crucial para promover la mielinización y soporte de la sustancia blanca mediante la eliminación de iones extracelulares y neurotransmisores, secreción de factores pro-

mielinizantes, muestran capacidad de metabolismo de glutamato a glutamina y expresan los niveles más altos de transportadores de glutamato (Lundgaard, Osório, Kress, Sanggaard, & Nedergaard, 2014) (Figura 2).

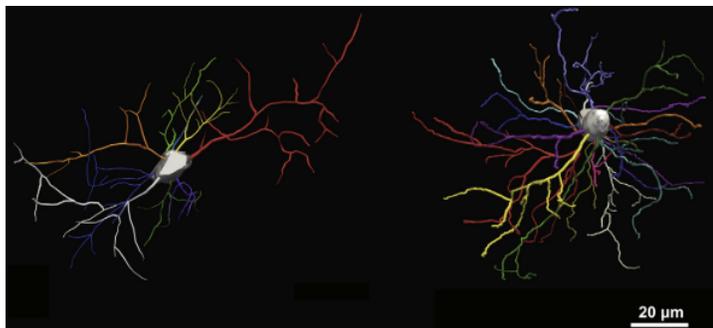


Figura 2. Reconstrucción 3D de astrocitos marcados con GFAP. Se muestra un astrocito fibroso de materia blanca subcortical de humano (izquierdo). Astrocito protoplasmático de Corteza en humano (derecho). Modificado de Lundgaard et al., (2014).

Frecuentemente, los astrocitos no actúan como células individuales, sino que están interconectados a través de un acoplamiento de uniones estrechas mediante conexinas formando una red larga y dinámica dispersa en el SNC que permite la comunicación entre astrocitos individuales.

Se ha detallado los astrocitos exhiben diversidad regional entre sí en forma, tamaño, morfologías distintas dependiendo de las capas en las que se encuentran e incluso la cobertura sináptica que regula la comunicación intercelular entre diferentes áreas del cerebro. Además, se asocian de manera diferencial con subtipos de neuronas dentro de una región (Ben Haim & Rowitch, 2016; B. Zhou et al., 2019).

Los astrocitos tienen capacidad para cambiar de forma *in vitro*. Se ha reportado que si se cultivan poblaciones puras en condiciones estándar, los astrocitos se perciben planos y tienen una forma poligonal o plumosa, mientras que si los astrocitos son cultivados en conjunto con neuronas asumen su forma estrellada (Chandrasekaran, Avci, Leist, Kobolák, & Dinnyés, 2016).

Dependiendo de la región y capa del cerebro en donde se encuentran, un sólo astrocito maduro de roedor puede envolver múltiples somas neuronales, asociarse con 300 a 600 dendritas y contactar aproximadamente 140 000 sinapsis individuales en roedores (Freeman, 2010; Oberheim et al., 2012; Pekny & Pekna, 2014).

1.1.2 Fisiología de los astrocitos

Los astrocitos mantienen la integridad vascular en el cerebro ya que funcionan como intermediarios entre el tejido neuronal y los vasos sanguíneos del cerebro puesto que recubren el exterior de la membrana basal y los pericitos que forman la barrera hematoencefálica (BHE) a través de sus pies terminales. Contribuyen a la integridad vascular, regulan la permeabilidad y angiogénesis de la BHE mediante la secreción de factores de permeabilidad vascular como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la enzima convertidora de angiotensina 1, los cuales actúan en las células endoteliales para inducir vasoconstricción y estabilidad de las uniones estrechas (Michinaga & Koyama, 2019).

Se ha planteado que los astrocitos proporcionan sustratos energéticos a las neuronas al importar glucosa, metabolizarla glucolíticamente y luego exportar lactato o piruvato por sus procesos perisinápticos. Para ello, los astrocitos pueden tener dos reservas de glucosa: una almacenada como glucógeno mediante la glucógeno sintasa y la otra almacenada transitoriamente en el retículo endoplásmico a través de la importación de glucosa-6-fosfatasa del citosol mediante sus pies terminales perivascuales (Müller, Fouyssac, & Taylor, 2018). La síntesis de glucógeno en astrocitos responde a la disponibilidad de glucosa y la señalización de insulina (Souza, Almeida, Souza, & Zimmer, 2019).

Los astrocitos son reguladores importantes de crecimiento y maduración neuronal a través de proteínas que secretan ya que estas promueven la regulación de diferentes etapas del desarrollo de neuritas y sinaptogénesis.

Los glicanos 4 y 6 son necesarios y suficientes para inducir la formación de sinapsis funcionales (Allen et al., 2012; Farhy-Tselnicker et al., 2017). La trombospondina 1, tiene papel esencial en la regulación del desarrollo de espinas dendríticas y están asociados a defectos en la morfología y el número de las espinas dendríticas (Cheng, Lau, & Doering, 2016; Torres D, Garcia, Tang, & Busciglio, 2018). La hevína se requiere para la formación estructural de botones sinápticos excitadores en los colículos superiores, así como el mantenimiento de dichas sinapsis y se ha registrado que la

pérdida de la misma conduce a inmadurez morfológica de dendritas corticales (Clarke et al., 2018; Kucukdereli et al., 2011; Risher et al., 2014).

Los astrocitos responden a una gran variedad de neurotransmisores como glutamato, el cual proviene de sinapsis excitatorias y tiene un papel esencial en la plasticidad sináptica para procesos de aprendizaje y memoria. Alrededor de un 80% del glutamato extracelular en la sinapsis es captada por los astrocitos para prevenir su acumulación extracelular mayor a 2 μM , controlar la liberación de glutamato a células vecinas que previene excitotoxicidad y enviarlo a las neuronas en forma de glutamina para su posterior conversión a glutamato nuevamente mediante glutaminasa (Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

Múltiples estudios han detallado que lesiones cerebrales, trauma en espina dorsal, infecciones, enfermedades neurodegenerativas y eventos isquémicos se caracterizan por una respuesta reactiva de los astrocitos ante el estado inflamatorio llamada astrogliosis. El grado de astrogliosis que es un componente esencial de la inmunidad innata del SNC, es dependiente de la naturaleza del daño y de los mecanismos de señalización específicos que tiene como objetivo la restauración de la homeostasis, limitar el daño tisular y preservar las funciones neurológicas posteriores al daño (Sofroniew, 2020).

La astrogliosis es un fenómeno continuo con cambios graduales que van desde alteraciones reversibles en la expresión génica, cambios morfológicos como hipertrofia del soma, engrosamiento de los procesos primarios y en grados severos generan la formación de cicatrices gliales con reordenamiento permanente del tejido (Anderson, Ao, & Sofroniew, 2014).

Los astrocitos pueden modificar sus propiedades de neuroprotección a neurotóxicas de manera transitoria mediante la exposición ante citocinas y quimiocinas derivadas de la microglía, neuronas o células endoteliales para provocar una respuesta inmune (Efremova et al., 2017; Orre et al., 2014).

Dentro de estos cambios, los astrocitos reactivos pueden ejercer efectos benéficos como promover la reparación de la BHE, eliminar especies reactivas de oxígeno, limitar la propagación del daño, contribuir a la reorganización de circuitos

neurales, retrasar la progresión de enfermedades neurodegenerativas y promover la recuperación de sinapsis después de una lesión axonal a través de mecanismos dependientes del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Pekny & Pekna, 2016; Sofroniew, 2020).

En eventos isquémicos o lesiones cerebrales predominan los astrocitos con fenotipo A2 inducidos por STAT3, los cuales muestran características anti inflamatorias y protectoras, regulan positivamente factores neurotróficos, regulan positivamente algunos genes responsables de la inducción de formación de sinapsis y axones para su regeneración y median la formación de la cicatriz glial (Liddel et al., 2017).

Sin embargo, también liberan interleucina 1 beta (IL-1 β) y óxido nítrico durante la inflamación contribuyendo al daño neuronal (Ávila-Muñoz & Arias, 2014). En fases crónicas de daño pueden formar una cicatriz glial compuesta casi en su totalidad por astrocitos recientemente proliferados estableciendo bordes compactos con procesos celulares alargados que se superponen para delimitar áreas con tejido severamente dañado, necrosis o infección (Pekny & Pekna, 2016; Zamanian et al., 2012).

En condiciones neuroinflamatorias ocasionadas por lipopolisacárido (LPS), la activación de la microglía reactiva libera una mezcla de citocinas y proteínas del complemento que consiste fundamentalmente en el factor de necrosis tumoral (TNF α), IL-1 α y C1q suficientes para activar de manera robusta a los astrocitos e inducirlos mediante el factor nuclear kappa (NF κ B), a un fenotipo llamado activado o A1, que se define como un astrocito pro inflamatorio y que puede tener funciones dañinas.

El fenotipo A1 se asocia con pérdida de funciones basales como la disminución en la capacidad para inducir la formación y función de sinapsis, inhabilidad para fagocitar debris de mielina, incapacidad para promover crecimiento neural y son una fuente importante de los componentes de la cascada del complemento necesarios para impulsar la pérdida de sinapsis mediada por C4b y C3 (Liddel et al., 2017). Este fenotipo se ha encontrado tanto en el envejecimiento normal principalmente en el hipocampo, el estriado (Clarke et al., 2018) y en regiones del cerebro involucradas en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer (EA), Huntington, Enfermedad de Parkinson (EP) y Esclerosis múltiple (Liddel et al., 2017).

La activación de astrocitos se produce por la exposición a diferentes señales y moléculas proinflamatorias, como el TNF α , que es un factor que se ha involucrado en la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas.

1.2 TNF α

El factor de necrosis tumoral alfa es una citocina proinflamatoria involucrada en la fase inicial y aguda de la respuesta inmune innata, la regulación de quimiocinas, la liberación de citocinas, reclutamiento de células inmunes, adhesión de moléculas y procesos de apoptosis, entre otros.

Diversos estudios refieren que puede cruzar la BHE y niveles altos de TNF α correlacionan con la disfunción cognitiva del modelo experimental de esclerosis múltiple, deterioro cognitivo post operatorio y en patologías neurodegenerativas como EP, EA, demencia asociada al virus de inmunodeficiencia humana y anormalidades de la BHE (Decourt, Lahiri, & Sabbagh, 2017; Dobbs et al., 1999; Habbas et al., 2015; L'Episcopo et al., 2018; Silva et al., 2017; Terrando et al., 2010).

El TNF α es sintetizado como una proteína de transmembrana (tmTNF), que actúa por contacto de célula a célula para mediar un subconjunto de actividades benéficas y como TNF soluble (solTNF), que produce efectos pro inflamatorios sistémicos (Probert, 2015). La unión de tmTNF al dominio extracelular de los receptores TNFR1/p55 o TNFR2/p75 o de solTNF a TNFR1/p55 induce el reclutamiento de la proteína adaptadora del dominio de muerte asociado a receptor de TNF, que a su vez recluta el dominio de muerte asociado a Fadd activando caspasas 8, 10 y NF κ B para inducir apoptosis a células dañadas e infectadas (Olmos & Lladó, 2014).

La reducción de dichos receptores y solTNF en una célula tiene efectos deletéreos ya que reduce una vía principal de regulación de muerte celular, exponiendo a las células a necrosis no regulada por otros receptores, incrementa la resistencia a otros patógenos y puede generar aumento en el volumen de daño en modelos isquémicos (Probert, 2015).

Se considera que la microglía es la principal fuente sintetizadora y liberadora de solTNF de manera fisiológica y durante inflamación en el SNC y se ha descrito que

genera un aumento de sus niveles en presencia de LPS bacterial e interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) (Welser-Alves & Milner, 2013).

Las neuronas expresan constitutivamente TNFR1 y TNFR2 para activar la apoptosis frente a estímulos neurotóxicos, mientras que en los oligodendrocitos y células precursoras de oligodendrocitos expresan TNRF2 necesarios para su proliferación, la reparación de mielina e inducción directa de muerte (Probert, 2015).

Los astrocitos tienen la capacidad de expresar el mRNA de $\text{TNF}\alpha$, TNFR1 y secretar sTNF en respuesta a una variedad de estímulos biológicos como LPS, $\text{IFN}\gamma$ e $\text{IL-1}\beta$ (Chung & Benveniste, 1990; Rodgers, Lin, Langan, Iwakura, & Chou, 2020). En condiciones patológicas, el $\text{TNF}\alpha$ liberado por astrocitos puede regular los estados inmunológicos y metabólicos de la microglía: puede inducir el reclutamiento de la polarización M1 y aumentar su habilidad migratoria a áreas con daño mediante la liberación de quimiocinas como CCL2 (M. He et al., 2016; K. Wang et al., 2017).

Bajo condiciones inflamatorias, la presencia de $\text{TNF}\alpha$ induce a los astrocitos al reingreso del ciclo celular, proliferación activa y la reactivación de vías asociadas a propiedades de las células precursoras neurales como el potencial neurogénico y diferenciación.

Se ha propuesto un mecanismo de retroalimentación en el cual esta citocina se ve involucrada tanto en neuroinflamación como en la potenciación de excitotoxicidad.

Ante un daño, las células T infiltradas en el parénquima cerebral liberan $\text{IFN}\gamma$, lo que activa induce la expresión de $\text{TNF}\alpha$, éste promueve la producción y liberación de $\text{TNF}\alpha$ de la microglía a través de la señalización de TNFR1, consecuentemente, $\text{TNF}\alpha$ induce la liberación de glutamato mediante uniones estrechas que actúa en el receptor microglial mGluR2 para inducir una mayor producción de la citocina.

En los astrocitos, la concentración de $\text{TNF}\alpha$ por encima de cierto umbral $>300\text{pM}$ estimula al TNFR1 incrementando las concentraciones de glutamato en la hendidura sináptica ya que induce exocitosis de glutamato e inhibe la recaptura del mismo (Olmos & Lladó, 2014).

En las neuronas lesionadas, el TNF α es un mediador parácrino de la inflamación mediante TNFR1, cuya concentración se incrementa en las sinapsis excitadoras al inducir un aumento en los receptores de Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) permeables a Ca²⁺ y receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA). Lo anterior produce una entrada excesiva de Ca²⁺ que induce muerte neuronal y genera especies reactivas de oxígeno que interrumpen el transporte de glutamato en astrocitos vecinos y mantiene a la microglía en un estado reactivo liberando más TNF α (Stellwagen, Beattie, Seo, & Malenka, 2005) (Figura 3).

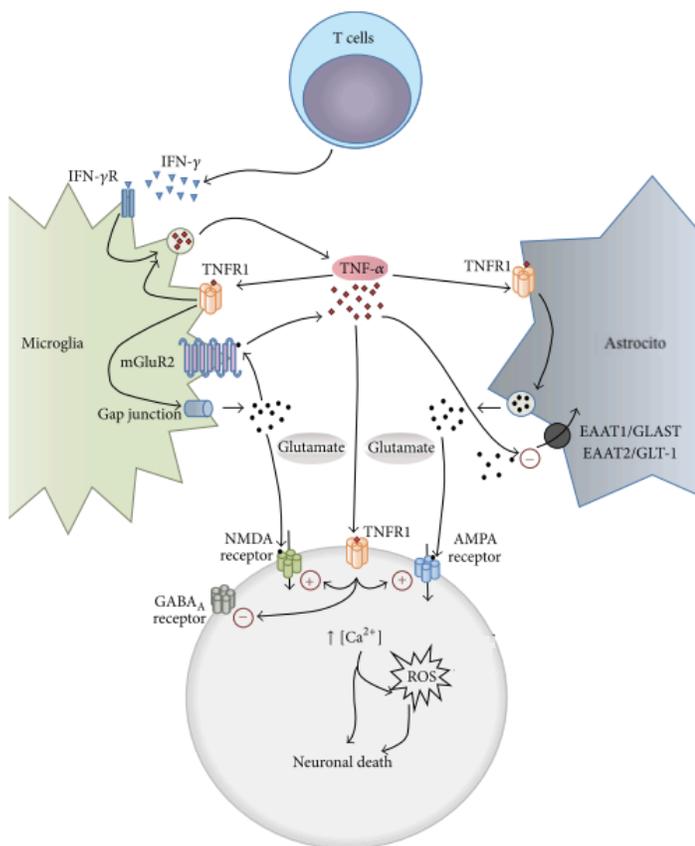


Figura 3. Mecanismo de TNF α en neuroinflamación y excitotoxicidad. Se muestra la interacción de TNF α con microglía reactiva, astrocitos reactivos y neurona. Modificado de Olmos & Lladó, (2014).

Como complemento a esta teoría, la exposición de TNF α en cultivos primarios de astrocitos y células de glioma H4, regula a la baja la expresión de transportadores de aminoácidos excitadores 1/2 (EAAT1, EAAT2) inhibiendo la recaptura de glutamato y

aumentando el glutamato extracelular (Korn, Magnus, & Jung, 2005; Sitcheran, Gupta, Fisher, & Baldwin, 2005; Z. Wang et al., 2003).

También, en cultivos de astrocitos primarios de corteza inhibe la expresión de glutamina sintetasa resultando en una mayor excitotoxicidad (Zou et al., 2010), aumenta la expresión de glutaminasa en astrocitos y la generación de especies reactivas de oxígeno mediante la misma (K. Wang et al., 2017).

Por otro lado, la exposición crónica al TNF α regula a la alta la expresión de la subunidad GluR1 de AMPARs dependientes de Ca²⁺ generando un efecto tóxico en rebanadas y cultivos hipocampales de ratón (Bernardino et al., 2005; Ogoshi et al., 2005; Stellwagen & Malenka, 2006).

No obstante, se ha visto que el TNF α puede tener efectos en las funciones de los circuitos neuronales cuando se inhibe la actividad neuronal y se libera TNF α por la glía lo que incrementa las corrientes de AMPA a NMDA en las sinapsis existentes, induce aumento en la amplitud y frecuencia de mEPSC (Habbas et al., 2015) y a la inversa, causa endocitosis de los receptores de GABA_A disminuyendo la fuerza sináptica inhibitoria, participando en la homeostasis de las redes neuronales y el fortalecimiento de las mismas (Stellwagen et al., 2005; Stellwagen & Malenka, 2006).

1.3 Ácido glutámico

Los astrocitos responden también a estímulos relacionados con la actividad neuronal. Como se ha descrito, los astrocitos no propagan potenciales de acción como las neuronas, sin embargo, se ha observado que responden ante estímulos químicos, eléctricos y mecánicos mostrando aumentos regulados en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Ávila-Muñoz & Arias, 2014; Parri, Gould, & Crunelli, 2001).

Se conoce que el glutamato liberado como transmisor sináptico en el cerebro es absorbido por los astrocitos circundantes y amidado a la glutamina, un aminoácido no neuroexcitador, que luego se transfiere a las neuronas para su reconversión a glutamato (Bröer & Brookes, 2001).

El glutamato funge como un modulador de la actividad de los astrocitos y se ha demostrado que los astrocitos ante la presencia de glutamato inducen 4 tipos de señales mediadas por el receptor metabotrópico glutamatérgico 5 (mGluR5):

1. Picos inmediatos de Ca^{2+} intracelular localizados de entre 150-800 nM, observados a bajas concentraciones de estímulos.

Y cuando estas respuestas se sincronizan en toda la célula resultan en diferentes señales:

2. Elevaciones sostenidas de picos de Ca^{2+} basales repetitivos con periodos de tiempo entre picos en donde el Ca^{2+} vuelve a su concentración basal; la frecuencia de los picos depende de la estimulación de los receptores.
3. Oscilaciones de Ca^{2+} , definidas como incrementos repetitivos de $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro de una célula y son observados ante una concentración de estímulos mayor.
4. Ondas de Ca^{2+} , definidas como propagaciones radiales de incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico que se origina en una célula hacia otros astrocitos adyacentes.

Las modalidades de señalización astrocítica, oscilaciones y ondas, se transmiten fácilmente a neuronas circundantes que muestran aumentos prolongados en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Nedergaard, Ransom, & Goldman, 2003).

Las oscilaciones de Ca^{2+} en los astrocitos dependen de la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares mediado por IP_3 y se ha observado que estas pueden ser localizadas en partes de un solo proceso de un astrocito actuando como micro dominios donde la señalización puede ser independiente de otros procesos y del soma (Nett, Oloff, & Mccarthy, 2002).

Las ondas de Ca^{2+} a otros astrocitos están correlacionadas y se muestran de manera asincrónica y con un retraso en su aparición. Además, se ha observado que astrocitos de tálamo *in situ* muestran incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ independientes de actividad sináptica pero son capaces de despolarizar neuronas lo suficiente para elicitar

potenciales de acción con actividades correlacionadas entre una neurona y grupos de hasta 5 astrocitos (Parri et al., 2001).

Estas propagaciones de Ca^{2+} citosólico en los astrocitos son resultado de la inducción de secreción de ATP (Arcuino et al., 2002). El ATP procede de células individuales que muestran un incremento transitorio en la permeabilidad membranal y tienen apertura de canales membranales no selectivos, de esta manera, funge como mensajero difusor de la comunicación de ondas a través de sus procesos a la mayoría de astrocitos contiguos mostrando oscilaciones (Codazzi, Teruel, & Meyer, 2001).

Se ha observado que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal se mantiene elevada sobre los niveles de reposo mientras que el glutamato está presente en el medio (Charles, Merrill, Dirksen, & Sanderson, 1991).

Se ha demostrado que en presencia continua de 10-100 μM de glutamato en cultivos de astrocitos corticales la respuesta inotrópica inducida por glutamato podría cambiar los niveles de Ca^{2+} disponible en el espacio extracelular para modular la fusión de vesículas sinápticas neuronales y la liberación de neurotransmisores exhibiendo las cuatro respuestas básicas de Ca^{2+} : picos, elevaciones sostenidas, ondas intracelulares oscilatorias y ondas intercelulares regenerativas (Kim, Rioult, & Cornell-Bell, 1994).

Concluyendo así que el glutamato activa los receptores metabotrópicos y ionotrópicos en los astrocitos, lo que lleva a un aumento en su Ca^{2+} intracelular y una posterior liberación de glutamato a las células circundantes (Paixão & Klein, 2010).

La inducción de estas cuatro respuestas representa una forma de excitabilidad astrocítica con importancia funcional en la comunicación que tienen los astrocitos con los mismos o con células circundantes como las neuronas, se ha observado que promueven cambios morfológicos como la formación de filipodia en la superficie y margen celular de astrocitos, generan actividad sináptica excitatoria espontánea e inducen liberación de vesículas extracelulares (Araque, Sanzgiri, Parpura, & Haydon, 1998; Cornell-Bell, Thomas, & Caffrey, 1992; Cornell-Bell, Thomas, & Smith, 1990; Hassinger et al., 1995; Parri et al., 2001; Xu et al., 2007).

Otra posible vía que no se ha explorado tanto como modulador de la actividad de los astrocitos es la vía de señalización de Wnt.

1.4 Vía Wnt

El nombre Wnt es el resultado de una fusión del nombre del gen de polaridad del segmento *Drosophila wingless* que significa sin alas y el nombre del homólogo en vertebrados, *integrado o int-1* (Komiya & Habas, 2008). Los ligandos de Wnt son un conjunto de glicoproteínas que son secretadas y aciladas mediante porcupine, esencial para su secreción y actividad de señalización. Aunque es poco probable que las proteínas Wnt totalmente procesadas sean solubles en el medio extracelular para difundirse de las células secretoras a las receptoras, se ha pensado que necesitan viajar rodeadas de lipoproteínas o mediante exosomas para mantenerse solubles y activas (Langton, Kakugawa, & Vincent, 2016).

La desregulación a la alta o a la baja de la vía Wnt está asociada con diversas enfermedades como cáncer colorectal, cáncer de glándula adrenal, cáncer de mama, melanoma, carcinomas hepatocelulares, espina bífida y tiene un gran impacto en el progreso del envejecimiento (García-Velázquez & Arias, 2017) así como en enfermedades neurodegenerativas como EA, EP y Enfermedad de Huntington (L'Episcopo et al., 2018; Nusse & Clevers, 2017).

Los ligandos de Wnt son secretados de manera autócrina y parácrina mediante diversas vías principales para la activación de su señalización: la vía canónica y las no canónicas. Ambas se activan a través de la unión de ligandos con el extremo N-terminal del dominio rico en cisteína extracelular de los siete receptores de la familia Frizzled (Fzd), para prevenir señalización excesiva que de otro modo podría conducir a una mala regulación de la diferenciación o proliferación celular (Christof Niehrs, 2012).

La actividad de los Wnts dependerá del contexto celular y los receptores disponibles, mientras que los correceptores específicos regulan su señalización al producir una secuencia de respuestas intracelulares de las que dependerá la vía activada (Oliva et al., 2018) y que los llevará a usar diferentes factores de transcripción. Sin embargo, los agonistas canónicos y no canónicos pueden competir por los receptores inhibiendo su señalización o incluso generar una activación cruzada.

En primera instancia, la vía canónica o vía Wnt/ β -catenina requiere el reclutamiento del correceptor de lipoproteína de baja densidad 5/6 (LRP5/6), ya que su dominio extracelular media la interacción con Wnt-Fzd, formando un complejo ternario.

La unión de Wnt a Fzd-LRP5/6 induce la agrupación de la proteína citoplasmática Dishevelled (Dvl) a unirse con Fzd en la membrana plasmática, la cual transduce todas las principales vías de Wnt, esto conlleva a una cascada de transducción de señales formando un signalosoma mediado por caveolina o clatrina (Christof Niehrs, 2012), en donde se promueve la fosforilación del dominio intracelular de LRP5/6 por las enzimas Glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3 β) y Caseína quinasa-1 α (CK-1 α).

Una vez que LRP5/6 es fosforilada, es reconocido por axina para reclutar el complejo de destrucción de β -catenina, así escapa la ubiquitinación y degradación proteasomal. En consecuencia, la estabilización de β -catenina (Acebron & Niehrs, 2016) en el citoplasma sirve como co-regulador y se transloca al núcleo (Komiya & Habas, 2008) para finalmente asociarse con los factores de transcripción de células T (TCF) y Factor potenciador linfoide (LEF), induciendo la transcripción de una amplia variedad de genes (Figura 4).

En la ausencia de activación de Wnt, β -catenina es fosforilada por el complejo de destrucción que consiste en las proteínas GSK-3 β , CK-1 α , Adenoma poliposis coli (APC) y axina, esta β -catenina fosforilada es ubiquitinizada por la proteína que contiene repeticiones de transducina β que contiene E3 ubiquitina ligasa proteica dirigiéndola a degradación proteasomal (Ma & Hottiger, 2016).

Numerosos estudios sobre la vía Wnt/ β -catenina describen su activación asociada a diferenciación celular, proliferación, destino celular, formación del eje dorsal y antero-posterior en embriogénesis, organogénesis del corazón, huesos, pulmones, hígado y piel, formación de colas en diversos animales, remodelación axonal, plasticidad sináptica, crecimiento de neuritas (Acebron & Niehrs, 2016; Komiya & Habas, 2008; Christof Niehrs, 2012).

Por otro lado, las vías no canónicas para su activación son: Wnt/ Polaridad celular planar (PCP) y Wnt/ Ca^{2+} (Figura 4).

La señalización de Wnt/PCP puede actuar dependiendo del contexto, ya sea en oposición a, en coordinación o independientemente de la señalización de β -catenina (Mattes et al., 2018). En la activación de esta vía son necesarios los correceptores de la proteína quinasa Tyr 7 (PTK7) o el receptor huérfano similar a la tirosina quinasa (ROR) (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018).

Se ha descrito que la vía Wnt/PCP altera el mecanismo de reordenamiento del citoesqueleto de actina, desarrolla la localización polarizada de los cilios en el oído, orienta estructuras epiteliales como folículos capilares, induce el movimiento celular dirigido de poblaciones de células mesénquimas durante la neurulación, migración neuronal y esta asociado con la polarización en el crecimiento del cono axonal (C. W. He, Liao, & Pan, 2018; Yang & Mlodzik, 2015). Forma parte de la regulación de los movimientos celulares polarizados durante la gastrulación que dan forma al eje del cuerpo de los vertebrados (Jussila & Ciruna, 2017) y su desregulación conduce al cierre incompleto del tubo neural desarrollando espina bífida (Oliva et al., 2018).

En la vía Wnt/ Ca^{2+} , Wnt/Fzd se une al receptor acoplado a proteínas G y las fosfolipasas C (Martinez, Torres, Vio, & Inestrosa, 2019) finalizando con la activación del factor nuclear de células T activadas potenciando la fosforilación de TCF/LEF suprimiendo así la vía canónica de Wnt (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018).

Se ha asociado a esta vía con el proceso de separación de tejidos durante la gastrulación, regulación negativa de la formación del eje dorsal, movimiento de extensión convergente durante gastrulación, formación tardía del corazón y su desregulación esta asociada con cáncer, inflamación y neurodegeneración (Komiya & Habas, 2008; Christof Niehrs, 2012).

No obstante, la vía de Wnt canónica puede regular vías no canónicas, y viceversa, mediante la regulación de los mismos componentes de la cascada de señalización (Shu et al., 2019).

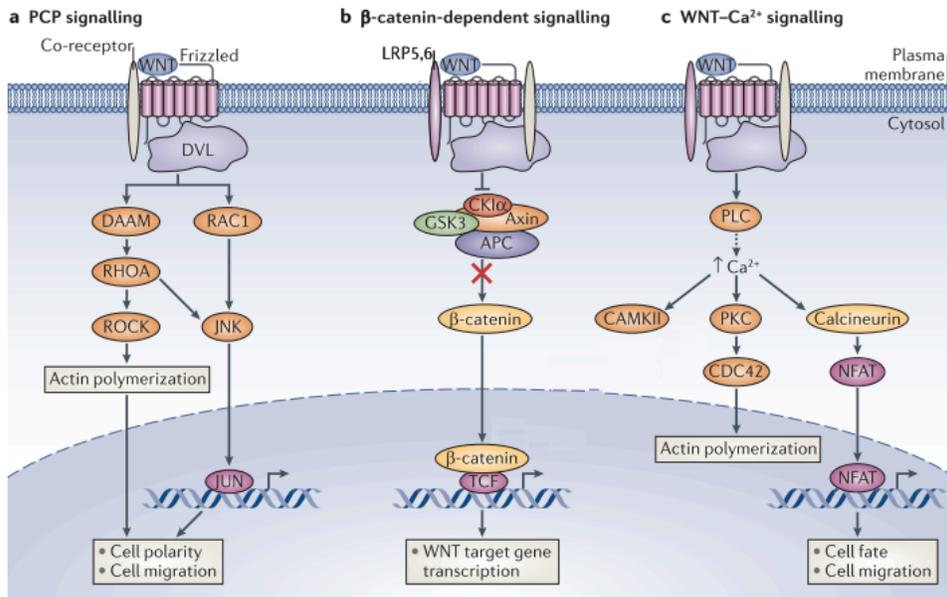


Figura 4. Vías de señalización de Wnt. Se muestra en (a) vía de señalización de Polaridad celular planar, (b) la vía de señalización dependiente de β -catenina y (c) vía de señalización dependiente de Ca^{2+} Modificado de Christof Niehrs, (2012).

1.4.1 Wnt en el Sistema Nervioso

Wnt juega un papel crítico en el SNC en donde se ha visto que su familia de ligandos se expresa en todas las etapas de desarrollo del cerebro y continúan expresándose en el cerebro adulto tanto en condiciones normales como patológicas.

Se ha descrito su diversidad en distintas regiones del cerebro: Wnt1 en la sustancia nigra, Wnt3a y Wnt4 son secretadas por células troncales neurales en las regiones dorsales, Wnt5a es secretado en CA1, giro dentado y cerebelo y Wnt7a/b son secretados en áreas ventrales e hipocampo (C. M. Chen et al., 2017; Gogolla, Galimberti, Deguchi, & Caroni, 2009; L'Episcopo et al., 2018; Sharif et al., 2018).

En etapas tempranas del desarrollo cerebral, su pico más alto de expresión es entre el E14-E16 en humanos (Eze, Bhaduri, Haeussler, Nowakowski, & Kriegstein, 2021) y son fundamentales para la formación y correcto cierre del tubo neural (Oliva et al., 2018), por otro lado, en la re especificación de células se expresa para dar una identidad posterior para formar el mesencéfalo, romboencéfalo y médula espinal (Carron & Shi, 2016; Noelanders & Vleminckx, 2017).

Wnt está activo en las células progenitoras neurales tempranas de la zona ventricular en donde la estabilidad de β -catenina disminuye las salidas del ciclo celular ya que regula la transcripción de *c-myc* que promueve la fase G1 a través de la inducción de la ciclina D y disminuye p21 de los progenitores para mantener divisiones simétricas controlando la proliferación y la renovación de estas células (Christof Niehrs & Acebron, 2012) y en divisiones asimétricas ya que su disminución en la señalización conduce a mayor diferenciación de la glía radial en progenitores intermedios maduros y neuronas (Bielen & Houart, 2014), para especificarlos a lo largo del eje dorso-ventral (Chandrasekaran et al., 2016) y diferenciarlos (Bengoa-Vergniory & Kypka, 2015; Inestrosa & Varela-Nallar, 2015; Muroyama, Kondoh, & Takada, 2004).

En la posterior diferenciación neuronal Wnt participa en la activación transcripcional de genes proneurales como neurogenina 1 (*Ngn1*), neurogenina 2 (*Ngn2*), *NeuroD1*, *Prox1* y *Brn3a* (Arredondo, Valenzuela-Bezanilla, Mardones, & Varela-Nallar, 2020; Bengoa-Vergniory et al., 2017; Bengoa-Vergniory & Kypka, 2015; Freeman, 2010; Kalani et al., 2008; Kondo et al., 2011; Kuwabara et al., 2009).

De los 19 agonistas Wnt, un ligando puede tener diferentes funciones dependiendo del contexto celular, pueden cooperar o competir entre sí con agonistas y antagonistas y pueden interactuar con varios receptores y correceptores. Entre los agonistas más estudiados por sus efectos neuronales *in vitro* se encuentran Wnt3a/b, Wnt5a y Wnt7a/b, los cuales regulan diversos mecanismos de plasticidad sináptica y de estabilidad de las sinapsis en sitios pre y postsinápticos que pueden estar asociados a procesos como la consolidación de la memoria y el aprendizaje.

Los agonistas de Wnt están involucrados en la remodelación axonal ya que dirigen la remodelación de microtúbulos (Stanganello et al., 2019) e inducen un aumento en el tamaño del cono de crecimiento axonal (Hall, Lucas, & Salinas, 2000; Onishi, Hollis, & Zou, 2014; S. A. Purro et al., 2008).

Diversos ligandos de Wnt modulan la expresión de proteínas presinápticas como *Rim1*, *Piccolo*, *Erc2* y *CTBP1* (Martinez et al., 2019), promueven un incremento en la acumulación de proteínas presinápticas como bassoon, sinaptofisina (Gogolla et al., 2009; Varela-Nallar, Grabowski, Alfaro, Alvarez, & Inestrosa, 2009), sinapsina1 (Hall et

al., 2000), vGlut1 (Ciani et al., 2011; Varela-Nallar et al., 2009) e incrementan el número de vesículas sinápticas en la zona activa (Ciani et al., 2015).

De manera postsináptica, la vía de señalización de Wnt induce la expresión de proteínas como *PSD-95*, *Homer1* y *Shank1* (Farías et al., 2009; Martínez et al., 2019). También, la señalización de Wnt incrementa el número y tamaño de espinas dendríticas (Ciani et al., 2011), aumenta la localización de receptores NMDA en la superficie de espinas dendríticas (McLeod et al., 2018) e incrementa los niveles de receptores GABA_A (Cuitino et al., 2010).

Se ha descrito que la actividad neuronal promueve la expresión y liberación de ligandos de Wnt para regular la remodelación sináptica en el cerebro adulto promoviendo el ensamblaje y la estabilidad sináptica (Dickins & Salinas, 2013; Inestrosa & Varela-Nallar, 2014; Silvia A. Purro, Galli, & Salinas, 2014).

Los efectos en la plasticidad sináptica mediante la señalización de Wnt pueden subyacer a procesos cognitivos como la consolidación de la memoria y su activación en respuesta a estímulos sensoriales demuestra que inducen cambios funcionales duraderos que conducen a cambios conductuales que mejoran el rendimiento de los animales (Oliva, Vargas, & Inestrosa, 2013).

Posterior al tiempo de adquisición de la memoria espacial utilizando el laberinto acuático de Morris se encontró un incremento de Wnt5a en el hipocampo de ratas hasta 7 días después y de Wnt7 posterior a 30 días que correlaciona con la retención de la memoria por el mismo periodo. Además, reportaron incremento de células granulares positivas a Wnt7 posterior al aprendizaje de la tarea de memoria espacial (Tabatadze et al., 2012).

También, utilizando la prueba de campo abierto se ha reportado que la infusión a largo plazo de agonistas de Wnt en ratas muestran un aumento en el número de cruces en el área central sugiriendo que los agonistas de Wnt pueden tener efectos que reduzcan la ansiedad (Ortiz-Matamoros & Arias, 2018).

Se ha observado que componentes de la vía de Wnt son necesarios para la consolidación de la memoria aversiva a largo plazo *in vivo*. Se ha descrito que posterior

al miedo condicionado hay un incremento en la expresión de β -catenina en la amígdala basolateral que correlaciona con un incremento de GSK-3 β fosforilada en la amígdala 2 horas posteriores al condicionamiento (Maguschak & Ressler, 2008). Además, la infusión de Wnt1 antes del estímulo aversivo exhibió un menor tiempo en la respuesta de congelación, previene la consolidación de la memoria aversiva (Maguschak & Ressler, 2011).

Adicionalmente, se ha visto que trastornos del estado de ánimo se asocian con deterioro de la plasticidad neuronal como en el trastorno bipolar, en donde la regulación de Wnt mediante litio o ácido valproico e inhibidores de GSK-3 β pueden ejercer efectos neurotróficos o neuroprotectores (Gould & Manji, 2002; Oliva et al., 2013).

Se ha encontrado que alteraciones en la regulación de GSK-3 β están asociados con esquizofrenia, la psicosis maniaco-depresiva, así como en algunos de los déficits cognitivos desarrollados en la misma, donde se ha observado un decremento de β -catenina y decremento en la fosforilación de Serina9 en cerebro de pacientes (Inestrosa, Montecinos-oliva, & Fuenzalida, 2012; Lovestone, Killick, Di Forti, & Murray, 2007).

Recientemente, se ha demostrado que de manera consecuente a un daño hipocampal Wnt7a se encuentra expresado a la alta en la fase de re inervación del día 3 al 7 post lesión asociado al crecimiento del cono axonal y ramificación de dendritas (García-Velázquez & Arias, 2021). Aunado a esto, otros estudios han señalado que hay una regulación a la baja de la activación de la vía canónica de Wnt en el cerebro envejecido en diferentes áreas como en el hipocampo, en donde β -catenina disminuye en el núcleo, por lo tanto, hay un incremento de GSK-3 β (Marques Orellana et al., 2015).

1.4.2 Wnt en astrocitos

En condiciones fisiológicas, los astrocitos producen ligandos endógenos de Wnt e incluso expresan receptores Fzd, LRP5/6, Norrin y antagonistas como la proteína 1 relacionada con frizzled secretada (SFRP). Se ha observado que los astrocitos liberan Wnt1, Wnt2b, Wnt3a, Wnt4, Wnt7a/b, Wnt9a, Wnt11, Wnt16 de manera constitutiva posterior a 24 horas de cultivo (Arredondo et al., 2020; Gonzalez & Rodríguez, 2017; Guérit et al., 2021) y Wnt5a desde el día 1 hasta el día 14 en cultivos primarios (Paganoni,

Bernstein, & Ferreira, 2010). Por otro lado, en astrocitos envejecidos se ha visto que se produce una disminución significativa de la expresión de agonistas de Wnt (Miranda et al., 2012).

El ligando Wnt3 derivado de astrocitos tiene una gran importancia en el hipocampo ya que se ha visto que promueve la proliferación de neuroblastos en la zona subgranular y de progenitores hipocampales adultos, induce la diferenciación de células progenitoras neurales de manera parácrina, regula la expresión del gen pro neural *NeuroD1* y se observó que la vía Wnt es suficiente para estimular neurogénesis *in vivo* en ratas adultas (Arredondo et al., 2020; Lie et al., 2005; Miranda et al., 2012; Okamoto et al., 2011).

Se ha encontrado que Wnt5a es liberado principalmente por astrocitos en comparación de la microglía en ratones adultos (Halleskog et al., 2012). Wnt5 derivado de astrocitos en el mesencéfalo ventral funciona como regulador de proliferación e induce el fenotipo dopaminérgico en precursores neuronales que expresan *Nurr1*, indicando que es una fuente importante de Wnts durante el desarrollo (Castelo-Branco et al., 2006).

Los agonistas de Wnt derivados de astrocitos son necesarios para mantener la integridad de los pies terminales de la unidad neurovascular y la abundancia vesicular de la BHE (Guérit et al., 2021).

Algunos componentes de la vía Wnt como β -catenina regulan positivamente la expresión de EAAT2 en astrocitos derivados de progenitores humanos e *in vivo* y su sobre expresión resulta en una reducción significativa de glutamato en el medio; río abajo, TCF1 regula la expresión de EAAT2 y TCF3 regula la expresión de GS (Lutgen, Narasipura, Sharma, Min, & Al-Harhi, 2016). Además, se ha observado que la expresión de *wingless* mediante la glía regula la acumulación de receptores glutamatérgicos y la función sináptica en la unión neuromuscular en *Drosophila* (Kerr et al., 2014).

El antagonismo de la vía canónica de Wnt resulta en la activación de GSK-3 β que regula positivamente a NF κ B induciendo una cascada de señalización proinflamatoria, ya que mientras GSK-3 β es un regulador negativo de β -catenina, regula positivamente a NF κ B al dirigir a I κ B, el principal inhibidor de NF κ B, hacia degradación proteasomal,

esto lleva a una activación exacerbada de la microglía y astrocitos reactivos con una consecuente neurotoxicidad. Por otro lado, cuando Wnt esta activo la acumulación de β -catenina forma un complejo con la subunidad p50 de NF κ B previniendo su transcripción regulando a la baja la inflamación y generando los fenotipos anti inflamatorios M2 en microglía y A2 en astrocitos (Jang, Jung, Kim, Jho, & Yoon, 2017; L'Episcopo et al., 2014, 2018).

En estudio de cultivos de astrocitos primarios donde se generó astrogliosis mediante dos mecanismos diferentes: LPS o extracto de médula lesionada, se demostró que diversos agonistas Wnt se expresan dependiente de la forma de activación. Con el uso de LPS 24 horas posteriores a la incubación, se encontró un aumento en la expresión de Wnt3, Wnt5 y Wnt11. Por otro lado, con el uso de extracto de médula lesionada se vio un cambio significativo de Wnt5b, Wnt7b 24 horas posteriores sugiriendo que la expresión de estos ligandos es regulada diferencialmente del estímulo proinflamatorio (Gonzalez & Rodríguez, 2017).

En un estudio con un modelo de Esclerosis lateral amiotrófica en ratones transgénicos que expresan el gen mutado SOD1 g93A, se demostró que hay un aumento en la expresión de mRNA y de proteínas de Wnt3a en la etapa temprana (95 días), etapa media (108 días) y en la etapa tardía (122 días). De igual manera, mediante inmunofluorescencia mostraron que existe una mayor colocalización de células positivas a Wnt3a con astrocitos positivos a la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) en la materia gris de las astas ventrales motoras de los ratones transgénicos adultos a 122 días y de manera correlativa encontraron más β -catenina nuclear en células de la espina dorsal (Y. Chen et al., 2012). Esto sugiere que la expresión de este ligando puede tener una función neuroprotectora bajo las condiciones inflamatorias y durante la progresión de esta enfermedad.

En la EP se ha destacado que los mecanismos de inflamación glial contribuyen a la degeneración nigro estriatal dopaminérgica. En cultivos de astrocitos derivados de mesencéfalo ventral lesionado mediante la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,4,6-tetrahidropiridina (MPTP) como modelo de Síndrome parkinsoniano se encontró un incremento en la expresión de Wnt1, además, mediante una hibridación *in situ* se

confirmó su colocalización con astrocitos positivos a GFAP y se observó un incremento en la transcripción de mRNA de Wnt1 en astrocitos *ex vivo* derivados de mesencéfalo lesionado con MPTP. Los astrocitos del mesencéfalo ventral reactivos mediante quimiocinas proinflamatorias derivadas de la microglía sobreexpresadas en este modelo: CCL3, CXCL10 y CXCL11, responden induciendo la expresión y liberación de Wnt1 24 horas posteriores (L'Episcopo et al., 2011).

Por otro lado, se ha observado que Wnt3 secretado por astrocitos muestra cambios importantes en etapas de envejecimiento. Mediante inmunohistoquímica y qRT-PCR se observó que en ratas jóvenes de 4 semanas de edad Wnt3 se muestran colocalizado con astrocitos en el giro dentado, en comparación con ratas envejecidas de 22 meses donde hay una expresión a la baja de Wnt3/Wnt3a y a su vez, se vio un decremento en la expresión de NeuroD1. Adicionalmente, vieron que células troncales neuronales derivadas de ratas envejecidas de 9 meses de edad pueden diferenciarse a neuronas ante la exposición de Wnt3 derivado de astrocitos, sugiriendo que Wnt producido por astrocitos regula la diferenciación y maduración de neuronas en el envejecimiento (Okamoto et al., 2011).

1.5 DKK1

Las proteínas Wnt y sus antagonistas están estrictamente restringidas tanto temporalmente como espacialmente durante el desarrollo. La señalación de Wnt está regulada extracelularmente por la presencia de antagonistas como SFRP, el factor inhibidor de Wnt: WIF-1, Cerberus, Wise/SOST y también Dickkopf.

La expresión más temprana de la proteína 1 relacionada con Dickkopf se observa en la gástrula donde se expresa en el organizador Spemann. Por ello, las glicoproteínas DKK juegan un papel importante en el desarrollo de vertebrados, ya que son expresadas mayoritariamente en el mesodermo anterior, son inductores embrionicos de desarrollo de estructuras anteriores como la cabeza, median el ectodermo neuronal, controlan el destino celular embrionario, proliferación de osteoblastos, bloquean la actividad ventralizante y posterior de la señalización cigótica para promover el patrón axial dorso anterior (Carron & Shi, 2016; Cruciat & Niehrs, 2013), regulan el desarrollo de las extremidades, de vértebras y de los ojos (C. Niehrs, 2006).

En los vertebrados, esta familia de proteínas comprende 4 isoformas: DKK1, DKK2, DKK3 y DKK4. Entre ellos DKK1, DKK2 y DKK4 actúan intracelularmente para modular los componentes de la maquinaria de transducción de señales o extracelularmente para modular las interacciones ligando-receptor (Baetta & Banfi, 2019; Cruciat & Niehrs, 2013). Sin embargo, se ha visto que DKK3 no afecta a la señalización de la vía canónica de Wnt y tampoco se une a los receptores Kremen.

La desregulación de DKK se ha encontrado implicada en diversas patologías que conllevan microambientes inflamatorios como cáncer, artritis reumatoide, osteoartritis, nefritis lúpica, enfermedades neurodegenerativas, eventos isquémicos, arterosclerosis, neumonía, diabetes, entre otras (Baetta & Banfi, 2019; Chae & Bothwell, 2019; Götze, Wolter, Reifenberger, Müller, & Sievers, 2010; Huang, Liu, & Liu, 2018) y puede modular de manera directa e indirecta la inflamación relacionada con una mayor producción de citocinas (Jaschke et al., 2022).

Dentro de dichas isoformas, DKK1 ha sido la más estudiada por su unión al dominio C-terminal rico en cisteína de LRP5/6 para inhibir la formación del complejo Wnt-Fz-LRP5/6 en la vía canónica de Wnt, del modo que se activa la cinasa GSK-3 β (Caricasole et al., 2004). DKK1 puede actuar en conjunto con su receptor transmembranal Kremen1/2 formando un complejo ternario con LRP5/6 regulando su endocitosis y degradación inhibiendo la señalización de Wnt (Y. Li et al., 2010; Mao et al., 2002). De esta manera, DKK1 se une a regiones extracelulares de LRP5/6 que no son requeridas para interactuar funcionalmente con Wnts o Fzd, por lo que, no compete contra Wnt por el sitio de unión (Y. Zhou, Liu, Xu, & Wang, 2010; Zorn, 2001).

Adicionalmente, los ratones knockout para DKK1 tienen dos fenotipos principales: carecen de estructuras cráneo faciales de la cabeza y muestran malformaciones en las extremidades anteriores y polidactilia, asimismo, la inyección de anticuerpos anti DKK1 conducen al desarrollo de microcefalia y su deficiencia completa resulta en letalidad embrionaria (Glinka et al., 1998; Mukhopadhyay et al., 2001; C. Niehrs, 2006).

La desregulación de la señalización de Wnt puede tener implicaciones a nivel conductual. Se ha descrito que la infusión de DKK1 en la amígdala basolateral antes del aprendizaje del condicionamiento aversivo interfiere con la consolidación de la memoria

aversiva exhibiendo menor tiempo en conducta de congelamiento posterior a 48 horas (Maguschak & Ressler, 2011), lo cual coincide con los resultados observados a 24 horas (Marzo et al., 2016).

Por otro lado, en ratones transgénicos que inducen DKK1, se ha observado en la tarea de laberinto acuático de Morris que les toma el doble de tiempo de encontrar la plataforma, permanecen menos tiempo y hay una disminución en el número de cruces en el cuadrante de la plataforma, demostrando dificultades en recordar y aprender la ubicación de la plataforma, por lo tanto, déficits en la adquisición de memoria (Marzo et al., 2016). Además, se ha reportado utilizando la prueba de reconocimiento de objeto que la infusión crónica de DKK1 en el hipocampo de ratas altera la consolidación de la memoria espacial (Ortiz-Matamoros & Arias, 2018).

En el SNC, se han correlacionado niveles altos de DKK1 en plasma de pacientes que sufrieron eventos isquémicos, accidentes cerebrovasculares agudos y hemorragia intracerebral (Ke, Yang, Luo, Zhang, & Chen, 2020; Z. Li et al., 2017; Seifert-Held et al., 2011; G. Wang et al., 2019; Zhu et al., 2018) y se ha descrito que la tasa de incidencia de infarto cerebral incrementa en pacientes con altos niveles de DKK1 en suero (X. W. He et al., 2016).

En modelos con roedores, hay una inducción temprana de DKK1 en neuronas del núcleo isquémico y área de penumbra posterior a eventos isquémicos transitorios y permanentes (Mastroiacovo et al., 2009). Se han descrito neuronas inmunoreactivas a DKK1 en CA1 y CA3 posterior a 24 horas de daño isquémico global, incremento en el contenido proteico y expresión de DKK1 en hipocampo hasta 48 horas posteriores a daño y es inducido mediante excitotoxicidad mediada por altas concentraciones de NMDA *in vitro* (Cappuccio et al., 2005).

De igual manera, se ha observado un incremento en la expresión de DKK1 en células de glioblastoma, en tejido tumoral y en líquido cefalorraquídeo de pacientes con gliomas (Y. Zhou et al., 2010). Aunado a ello, se ha descrito que la hipermetilación del promotor de DKK1 es más frecuente en glioblastoma de segundo grado (Götze et al., 2010; Rheinbay et al., 2013).

También, se ha descrito que deficiencias de la vía Wnt están involucrados con

trastornos cognitivos que derivan en enfermedades neurológicas. Por ejemplo, la expresión temprana de neuronas reactivas a DKK1 está asociado a epilepsia de lóbulo temporal donde se ha detectado mayoritariamente en el citoplasma y en el área perinuclear del hipocampo y corteza olfatoria, también, ha sido encontrada en neuronas de pacientes con esclerosis hipocampal (Busceti et al., 2007).

Diversos modelos de EA demuestran correlaciones con la expresión de DKK1, puesto que, tiene la capacidad para mediar la fosforilación de tau y se ha visto elevada en el líquido cefalorraquídeo, plasma y tejido de pacientes (Caricasole et al., 2004; Huang et al., 2018).

Se ha indicado que β -amiloide induce la expresión de DKK1 en cultivos hipocampales (Purro, Dickins, & Salinas, 2012) y mediante inmunohistoquímica, también se ha observado la presencia de DKK1 en la corteza temporal y materia blanca de pacientes con EA. En cerebro de pacientes con EA, también, se han descrito otros elementos de la señalización de Wnt desregulados como un incremento de GSK-3 β y una disminución de β -catenina (Caricasole et al., 2004). Igualmente, se ha descrito que la exposición de células a DKK1 durante 24 horas incrementa significativamente la abundancia de tau fosforilada (J. Wang, Jing, Song, & Xing, 2016).

En el modelo de ratón transgénico de EA, TgCNRD8, se reportó un incremento en la expresión de DKK1 en corteza e hipocampo, así como la colocalización de LRP5/6 y DKK1 en neuronas de la corteza del ratón de 7 meses. En otro modelo transgénico, Tg2576, se observaron neuronas positivas para DKK1 en la corteza e hipocampo a los 14 meses (Rosi et al., 2010).

DKK1 puede provocar la expresión a la baja de genes proneurales como NeuroD1 en cultivos neuronales (Kondo et al., 2011; Kuwabara et al., 2009), deficiencia en procesos de plasticidad neuronal, número reducido de neuritas y neuritas más cortas asociado con reorganización y cambios en tubulina y actina (Ortiz-Matamoros & Arias, 2018) y se ha correlacionado con una disminución de la neurogénesis en el envejecimiento (Seib et al., 2013).

En cultivos hipocampales la exposición de DKK1 disminuye el número y el tamaño

de la agrupación de proteínas sinápticas como VAMP2, sinapsina1, cask, bassoon y grip (Purro et al., 2012) así mismo, induce el rápido desensamblaje de sinapsis maduras hipocampales promoviendo la dispersión de proteínas presinápticas como sinapsina1 y en la zona postsináptica se dispersa PSD-95 conduciendo a la eliminación de la sinapsis (Dickins & Salinas, 2013).

En co-cultivos de neuronas-astrocitos del mesencéfalo ventral se observó que DKK1 antagoniza la neuroprotección inducida por los astrocitos contra la toxicidad de MPP+ en modelo de EP y aplicado a precursores neurales antes de co cultivarse con astrocitos resulta en la reducción significativa de neuronas proliferativas y en el potencial de diferenciación, sugiriendo que DKK1 inhibe el proceso de neurogénesis de precursores neurales multipotentes (L'Episcopo et al., 2011; Marchetti et al., 2013).

Diversos microambientes proinflamatorios han demostrado que los astrocitos inducen un incremento en la expresión de DKK1 cuando son expuestos a moléculas como IFN γ en modelos de VIH en donde su replicación en astrocitos es dependiente de su capacidad para regular a la baja la señalización de β -catenina (Huang et al., 2018; W. Li, Henderson, Major, & Al-Harhi, 2011).

De igual manera, cuando los astrocitos se encuentran infectados con VIH se favorece la apertura de los hemicanales de conexina43 e incrementando la expresión y secreción de DKK1, adicionalmente, secciones de cerebro de pacientes con encefalitis por VIH muestran marcaje de DKK1 en astrocitos reactivos (Orellana et al., 2014).

2 Planteamiento del problema

Los astrocitos son capaces de responder a la señalización de la vía Wnt, así como producir y liberar diferentes ligandos de la misma. Sin embargo, se desconoce si a través de la activación mediada por TNF α o la estimulación por glutamato son capaces de incrementar o disminuir el contenido del antagonista DKK1 y afectar su distribución celular.

3 Hipótesis

Los astrocitos regularán el contenido del antagonista DKK1 de manera diferencial ante la estimulación producida por el neurotransmisor glutamato o la citocina inflamatoria TNF α .

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Analizar los cambios en el contenido proteico del antagonista de la vía de Wnt, DKK1 y estudiar su distribución celular ante la presencia de dos estímulos diferentes: TNF α o ácido glutámico.

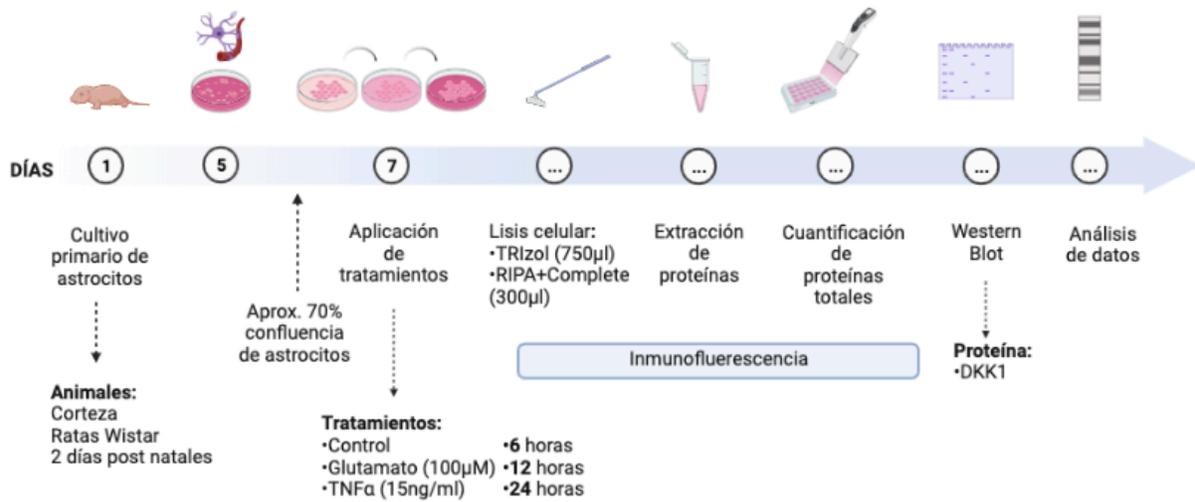
4.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar el cultivo de astrocitos primarios de rata.
2. Analizar el contenido de DKK1 en astrocitos expuestos a glutamato y TNF α a diferentes tiempos de exposición.
3. Analizar la distribución celular de DKK1 en los astrocitos.
4. Cuantificar la localización diferencial en núcleo y citoplasma de astrocitos del antagonista DKK1.

5 Materiales y métodos

Esta tesis se llevó a cabo de acuerdo al siguiente esquema de diseño experimental:

DISEÑO EXPERIMENTAL



5.1 Desarrollo de cultivos primarios de astrocitos

Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a los cumplimientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999 'Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio' y la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Se aislaron astrocitos de la corteza de ratas macho Wistar de 2 días de edad de acuerdo al protocolo desarrollado por Morán y Patel (Morán & Patel, 1989). Se aislaron las cortezas cerebrales postnatales, eliminando las meninges y los vasos sanguíneos en solución de Krebs. Las suspensiones celulares disociadas se colocaron en cajas de Petri de 35mm con solución 1. El tejido se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se filtró 6 ml de solución 2 sobre el pellet sobrante. Se incubó a 37°C por 8 minutos. Se filtraron 6 ml de solución 4, se centrifugó a 3500 rpm por 3 minutos y se retiró el sobrenadante. Se filtraron 2 ml de solución 3, se disoció el tejido y mediante una malla se filtró para ser depositado en la solución 5, se centrifugó a 3500 rpm por 6 minutos y el pellet se disolvió en medio de cultivo (Tabla 1). El medio de cultivo consiste en medio basal de Eagle suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor 50°C

durante 30 min al 10%, glutamina 2 mM (Ávila-Muñoz & Arias, 2015a). Las cajas de Petri se incubaron a 37°C en 5% CO₂ en una incubadora de aire humidificado. El primer cambio de medio se realizó 5 días posteriores. Al llegar a un 70% aproximado de confluencia de astrocitos, se generaron los grupos control por medio de lisis de TRIzol o análisis de radioinmunoprecipitación, RIPA+Complete a 6, 12 y 24 horas y posteriormente se agregaron los tratamientos de TNF α (15 ng/ml, Cell Signaling Technology, 8902SF) y ácido glutámico (100 mM, Sigma, G-1626) en los mismos tiempos de incubación. Consecutivamente, los cultivos control y con el tratamiento fueron lisados usando 300 μ L de Buffer de lisis RIPA+Complete o 750 μ L de TRIzol Reagent (Ambion, 149307). El medio fue guardado en tubos Eppendorf de 2ml y estuvieron en refrigeración a 4°C para procedimientos posteriores.

5.2 Extracción de proteínas

Se empleó un protocolo previamente descrito (García-Velázquez & Arias, 2021) con modificaciones. Para la extracción de proteínas de cultivos primarios de astrocitos y adicionalmente el RNA total se utilizó el kit de suero/plasma (Qiagen) y uso de alcoholes.

Tabla 1. Composición de soluciones utilizadas para cultivo primario de astrocitos

Solución de Krebs		Solución 1	
NaCl	7.07g	Solución de Krebs	5ml
KCl	0.36g	H ₂ O destilada	45ml
KH ₂ PO ₄	0.166g	Albúmina	150mg
NaHCO ₃	2.14g	MgSO ₄ 3.8%	400μl
Glucosa	2.57g	Solución 3	
Rojo fenol	0.015g	Solución 1	4.9ml
Solución 2		DNAsa (Sigma, D-5025)	0.8μl
Solución 1	6.25ml	MgSO ₄ 3.8%	40μl
Tripsina (Sigma, T-4665)	1.6mg	Suero fetal bovino	1ml
Solución 4		Solución 5	
Solución 1	5.6ml	Solución 1	5ml
Solución 3	1ml	MgSO ₄ 3.8%	30μl
Medio de cultivo de astrocitos		CaCl ₂	6μl
Glucosa (Sigma, C6152)	750mg		
BMEM (Sigma, B-1520)	500ml		
Suero fetal bovino	10%		
Glutamina (Sigma, 61517)	160mg		
Penicilina	50 U/ml		
estreptomicina 50 Ig/ml	2.5ml		

5.3 Western Blot

Posteriormente a la extracción de proteínas se realizó cuantificación de éstas por medio del método de Lowry modificado. Se separaron las proteínas mediante electroforesis durante dos horas a 120 V en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y de 1.5 mm de grosor sumergido en buffer de electroforesis 1x (Tabla 2).

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente hidratada con metanol, en cámara húmeda con buffer de transferencia húmeda durante 2 horas aplicando 250 mA en cuarto frío a 4°C. A continuación, se bloqueó la membrana con una solución al 5% de leche libre de grasas en TBS 0.1% Tween-20 durante 2 horas a temperatura ambiente (Tabla 2).

Las incubaciones de anticuerpos primarios se realizaron durante toda una noche a 4°C para ratón monoclonal anti-DKK1 (1:1000; Abcam, cat. ab61275) y para conejo policlonal anti β -tubulina (1:1000; Sigma, cat. T2200) (Tabla 3).

A continuación, se lavaron las membranas tres veces durante 10 min cada uno con TBS-Tween 1x. Se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (Tabla 4) disueltos en solución de BSA 5%/1X-TBS/0.1% Tween-20 acoplado a peroxidasa: anti-mouse policlonal de conejo (1: 10000, Invitrogen, cat. 61-6520) y anti-rabbit policlonal de cabra (1:10000, Santa Cruz, cat. sc-2357). Se realizaron tres lavados de 10min cada uno en TBS-Tween y finalmente, se aplicó un reactivo quimioluminiscente HRP Immobilon (Millipore) a las membranas para su visualización en una película Kodak X-OMAT.

Los resultados se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico de las bandas obtenidas utilizando el software ImageJ (NIH), la intensidad de la señal fue normalizada con respecto a la señal para β -tubulina.

Tabla 2. Composición de soluciones utilizadas para Western Blot

Gel concentrador de la parte superior (12%)		Gel separador de la parte inferior (12%)	
Agua	1.7ml	Agua	3.2ml
Tris-HCl pH8.8 (0.5M)	750µl	Tris-HCl pH8.8 (1.5M)	2.6ml
Acrilamida 30%-bis 0.8%	0.5ml	Acrilamida 30%-bis 0.8%	4ml
APS 10%	15µl	APS 10%	100µl
TEMED	5µl	TEMED	10µl
Buffer de electrophoresis (10x) 1litro		Buffer de transferencia húmeda 3litros	
pH 8.3		pH 8.3	
Tris-base 25mM	29g	Tris-base 25mM	9.08g
Glicina 192mM	144g	Glicina 192mM	43.24g
SDS 10%	10g	Metanol 20%	600ml
<u>Buffer de electroforesis (1x)</u>			
Buffer de electroforesis (10x)	100ml		
Agua MiliQ	900ml		

Tabla 3. Anticuerpos primarios para Western Blot

Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
DKK1	ratón	Abcam, cat. ab61275	1:1000 µl
β-tubulina	conejo	Sigma, cat. T2200	1:1000 µl

Tabla 4. Anticuerpos secundarios para Western Blot

Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
Anti-mouse	conejo	Invitrogen, cat. 61-6520	1:10000 μ l
Anti-rabbit	cabra	Santa Cruz, cat. sc-2357	1:10000 μ l

5.4 Inmunofluorescencia

Se empleó el protocolo descrito por Quiroz-Baez et al. (2009), con algunas modificaciones. Se realizaron cultivos de astrocitos primarios con los diferentes tipos de tratamiento, a la misma concentración y bajo las mismas condiciones para las inmunofluorescencias. Posterior a la aplicación de tratamientos, las células fueron lavadas dos veces con 0.1M Buffer de fosfato sin sal, pH 7.4 (PB). Las células se fijaron con paraformaldehído 4%/ 0.1M PB durante 20 min a temperatura ambiente para después ser lavadas con 0.1M PB/0.3% TritonX-100 3 veces. Posteriormente, se permeabilizaron con la misma solución por 10 min y se bloquearon durante una noche con una solución consistente de 0.1M PB/3%Triton X-100% 5%BSA a 4°C. A continuación, se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo, después de 3 lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios. Finalmente, DAPI fue usado para teñir los núcleos celulares (1:700, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Las células fueron lavadas y cubiertas con medio de montaje fluorescente (DAKO), las laminillas fueron montadas para su análisis en microscopía confocal. Se utilizó un anticuerpo anti-GFAP de conejo (1:2000, Santa cruz biotechnology, cat. Sc-365062), como primer anticuerpo para la tinción de astrocitos y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo (1:2000, Santa cruz biotechnology, cat. Sc-2357), las células fueron visualizadas a 647nm de onda (roja). Para DKK1, se utilizó un anticuerpo monoclonal (1:1000, Abcam, cat. Ab61275) y como secundario un anticuerpo cabra anti-ratón (1:1000, Invitrogen, cat. 61-6520), visualizado a 488nm de onda (verde).

5.5 Análisis de imágenes y cuantificación de la distribución de DKK1

Para el análisis de inmunofluorescencia se tomaron 2-3 secciones de 3 cultivos diferentes por cada condición experimental y tiempo. Se cuantificó la distribución de las unidades de intensidad para DKK1 con el software ImageJ®. Por campo se seleccionaron aproximadamente de 6-8 astrocitos aleatorios. Tres imágenes por condición experimental y temporalidad fueron cuantificadas para un total de 17-18 astrocitos por condición. Se delimitó el contorno de los núcleos y del citoplasma de las células y se ajustó el umbral a default con fondo oscuro para analizar la cuantificación de partículas de DKK1 dentro del contorno del núcleo, se realizó lo mismo para los citoplasmas y se realizó el análisis estadístico de dicha cuantificación.

5.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la ayuda del software GraphPad PRISM® versión 6.0 (California, EU). La significancia estadística fue determinada mediante la prueba *t* de Student o ANOVA de una vía seguida de la prueba *post-hoc* Tukey. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas presentando un valor de significancia $p < 0.05$.

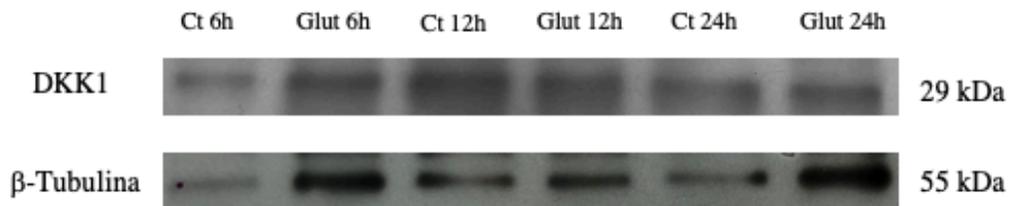
6 Resultados

6.1 Cambios en el contenido de DKK1 inducidos por ácido glutámico

Con el fin de detectar cambios diferenciales en los niveles de proteína del antagonista DKK1 en cultivos de astrocitos primarios expuestos ante un estímulo mediado por el neurotransmisor glutamato, evaluamos la cantidad de proteína mediante Western Blot a diferentes tiempos de exposición: 6, 12 y 24 horas (Figura 5A).

El análisis densitométrico no mostró diferencias estadísticamente significativas posterior a las 6 horas comparado con la condición control ($p= 0.6272$, prueba t de Student), además, no se observaron cambios estadísticamente significativos posterior a 12 horas de tratamiento ($p= 0.5393$, t de Student). En contraste, posterior a las 24 horas de exposición al ácido glutámico, los niveles de la proteína DKK1 muestran una reducción estadísticamente significativa de casi un 50% ($t= 3.357$, $p= 0.0284$, t de Student) (Figura 5B). Estos resultados indican que posterior a 24 horas de exposición a ácido glutámico hay un decremento en los niveles de DKK1 en los astrocitos.

A)



B)

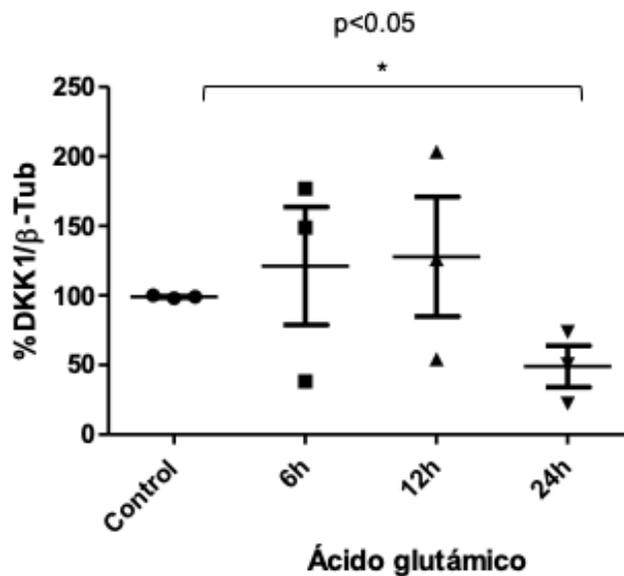


Figura 5. Efectos del tratamiento de ácido glutámico sobre DKK1. A) Western Blot representativo del contenido proteico de DKK1 posterior a 6, 12 y 24 horas tras el tratamiento de ácido glutámico. El contenido de DKK1 disminuye posterior a 24 horas de exposición a ácido glutámico. B) Los datos corresponden al análisis densitométrico de DKK1 normalizadas con β -Tubulina representados por media \pm SEM, $n=3$ cultivos de astrocitos independientes. Prueba t de Student, $*p < 0.05$ con respecto al control.

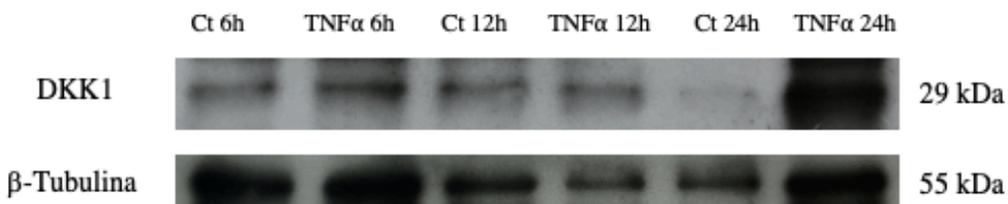
6.2 Cambios en el contenido de DKK1 inducidos por TNF α

De la misma manera, analizamos si existen cambios en el contenido proteico de DKK1 ante un estímulo proinflamatorio por TNF α posterior a 6, 12 y 24 horas (Figura 6A).

La tendencia observada de incrementar los niveles del antagonista DKK1 ante 6 horas de exposición a TNF α requeriría ampliar el número de experimentos para observar

diferencias estadísticamente significativas ($p= 0.0908$, t de Student), por otra parte, este antagonista no mostró cambios significativos a las 12 horas en comparación a la condición control ($p= 0.4655$, t de Student). Respecto a las 24 horas se observó un ligero incremento ($p= 0.1660$, t de Student) posterior al tratamiento (Figura 6B). Los datos indican que en estos tiempos de exposición ante $TNF\alpha$ no genera cambios estadísticamente significativos de los niveles de DKK1 en astrocitos.

A)



B)

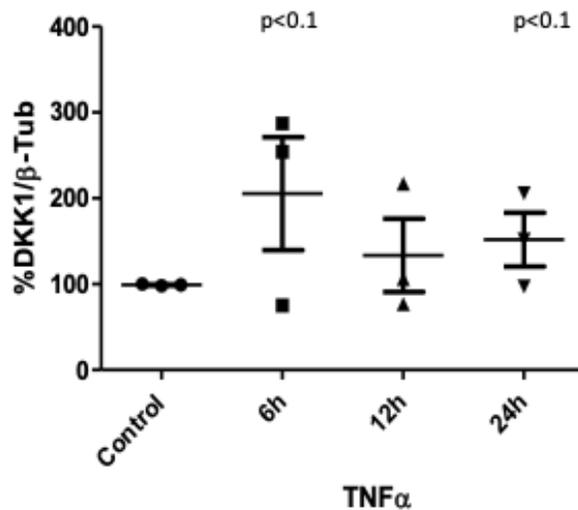


Figura 6. Efectos del tratamiento de $TNF\alpha$ sobre DKK1. A) Western Blot representativo y análisis densitométrico del contenido de DKK1 6, 12 y 24 horas posteriores a tratamiento de $TNF\alpha$. B) El contenido proteico de DKK1 tiene una tendencia a aumentar posterior al tratamiento proinflamatorio. Los datos se muestran normalizadas con β -Tubulina representados por media \pm SEM, $n=3$ cultivos de astrocitos independientes. Prueba t de Student.

6.3 Cambios en la localización celular de DKK1 posterior a 6 horas

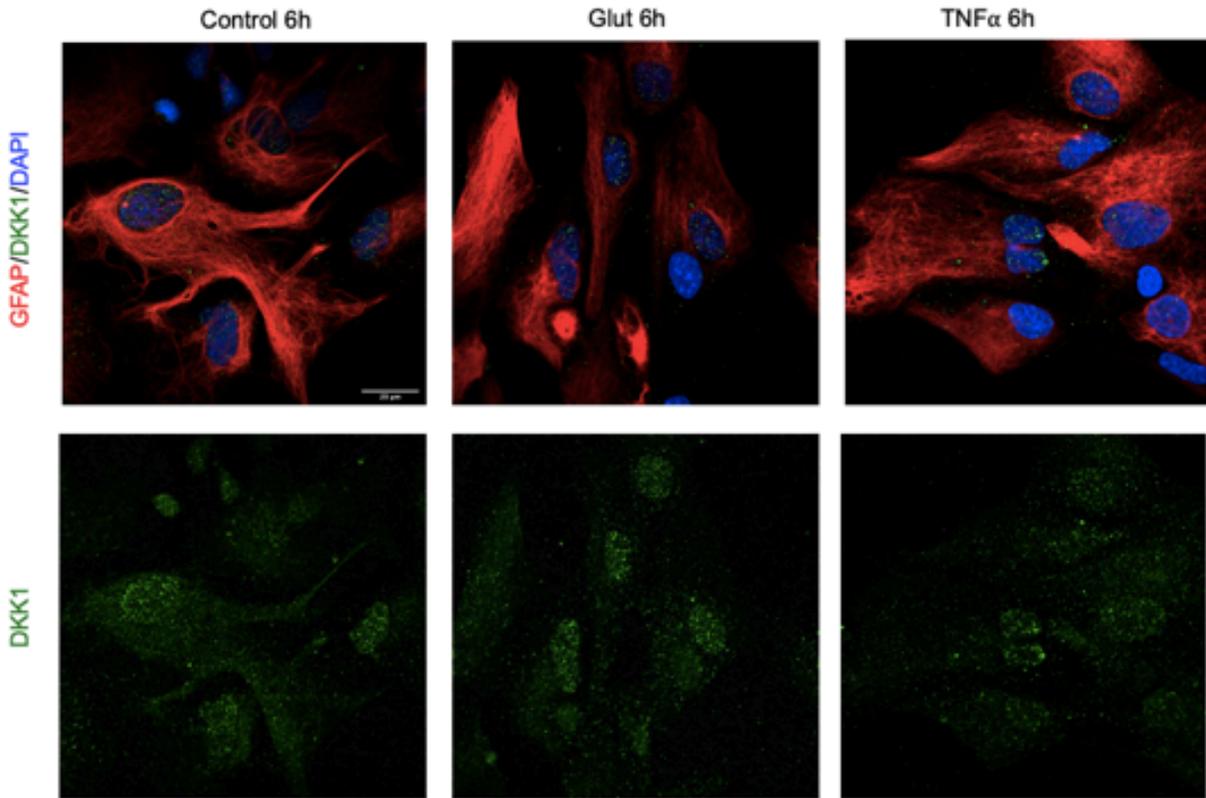
En vista de que en otro modelo celular se ha descrito que DKK1 puede tener una localización nuclear y modificar la expresión de algunos genes (Adam et al., 2012), se analizó la localización nuclear o citoplasmática de este antagonista posterior a los diferentes tratamientos con ácido glutámico o $\text{TNF}\alpha$.

Los astrocitos al estar expuestos a ácido glutámico durante 6 horas muestran un marcaje de DKK1 mayormente concentrado dentro del núcleo en comparación a la condición de $\text{TNF}\alpha$ donde se muestra un marcaje de DKK1, en general, más disperso entre las células a diferencia de la condición control (Figura 7A).

Posteriormente, cuantificamos las unidades de intensidad de DKK1 dentro del núcleo y del citoplasma de los astrocitos. Mediante un ANOVA encontramos un incremento significativo en el marcaje de DKK1 dentro del núcleo ($p= 0.0535$, prueba *post-hoc* Tukey, $q= 3.489$) en comparación con su condición control, por lo que, podría sufrir una relocalización nuclear ante estas condiciones (Figura 7B). Sin embargo, dentro del núcleo no observamos cambios significativos de DKK1 posterior a 6 horas de tratamiento con $\text{TNF}\alpha$ ($q= 2.480$, prueba *post-hoc* Tukey).

A la par, se observó DKK1 en el citoplasma tras 6 horas de tratamiento con ácido glutámico y $\text{TNF}\alpha$. Los resultados de un ANOVA muestran que no existen cambios significativos posteriores al tratamiento de ácido glutámico con respecto a su control ($q= 1.231$, prueba *post-hoc* Tukey). Por otro lado, existe una tendencia a un incremento de DKK1 dentro del citoplasma posterior a $\text{TNF}\alpha$ respecto a su condición control, pero no se encontraron cambios estadísticamente significativos ($q= 1.584$, prueba *post-hoc* Tukey) (Figura 7B).

A)



B)

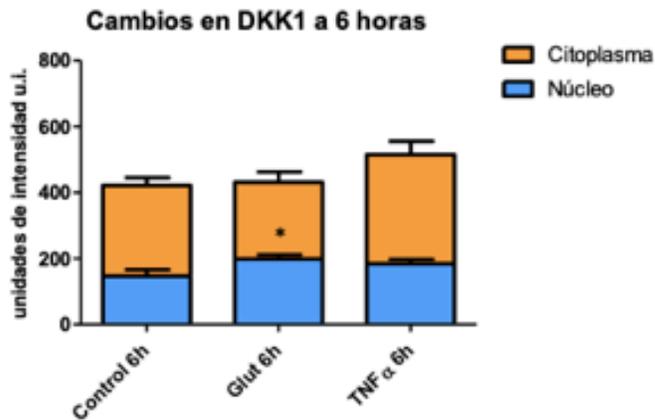


Figura 7. Análisis de la distribución celular de DKK1 en astrocitos posterior a 6 horas de tratamientos. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de DKK1 (verde) de astrocitos marcados con GFAP (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul) después de 6 horas de tratamiento con ácido glutámico y TNF α . B) Cuantificación de unidades de intensidad de DKK1 en el núcleo y citoplasma de astrocitos. Las barras representan el promedio \pm SEM e imágenes de 3 campos de 3 cultivos de astrocitos independientes. Prueba ANOVA seguida de prueba *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$ respecto a las condiciones control. Barra de escala equivalente a 20 μ m.

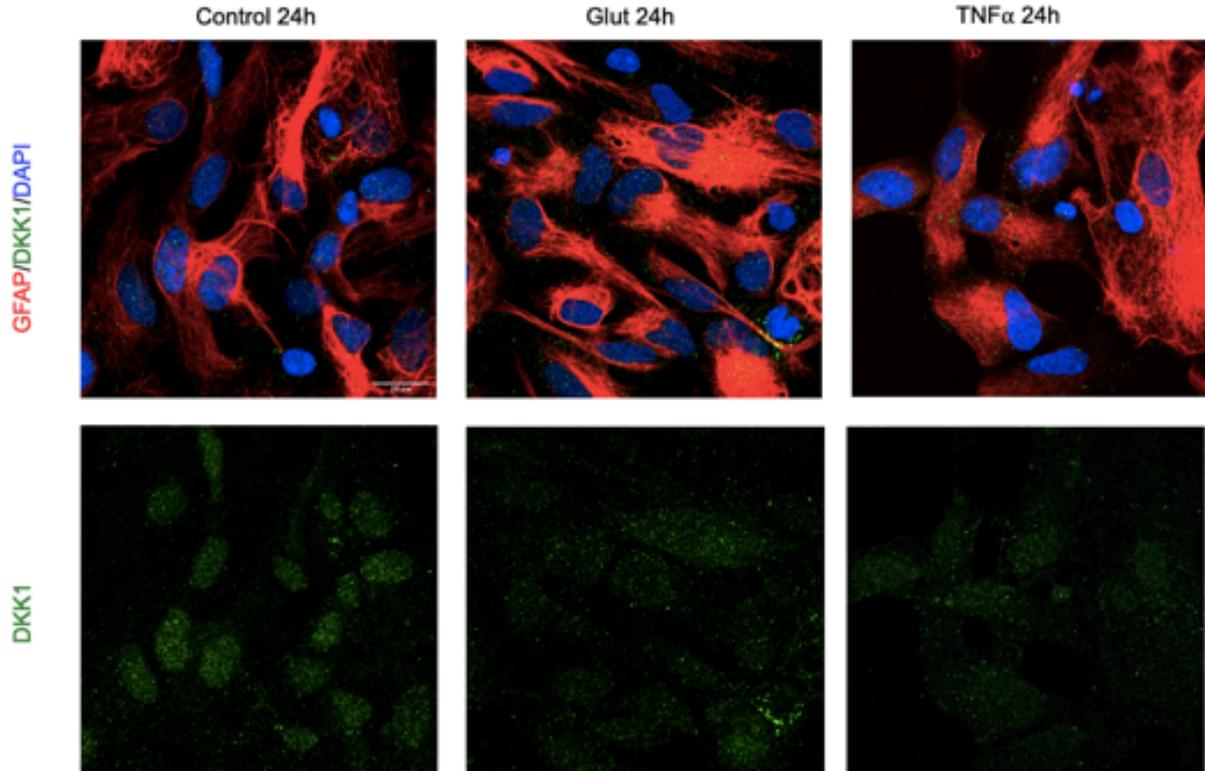
6.4 Cambios en la localización celular de DKK1 posterior a 24 horas

Igualmente, se realizaron inmunofluorescencias de astrocitos expuestos a 24 horas de tratamiento con ácido glutámico y $\text{TNF}\alpha$. De manera general, de acuerdo con las imágenes de inmunofluorescencia, se puede observar que la señal de DKK1 es más abundante en comparación a las condiciones de 6 horas (Figura 8A).

A continuación, se cuantificaron las unidades de intensidad de DKK1. De manera nuclear, los resultados de un ANOVA indican que no hay cambios significativos de DKK1 posterior a 24 horas de tratamiento de ácido glutámico comparado a la condición control ($q= 0.8137$, prueba *post-hoc* Tukey). En contraste, la exposición de astrocitos ante el tratamiento de $\text{TNF}\alpha$ reduce significativamente DKK1 nuclear posterior a 24 horas en comparación a su control ($p= <0.05$, $q= 4.144$, prueba *post-hoc* Tukey,) y al tratamiento de ácido glutámico ($p= 0.0025$, prueba *post-hoc* Tukey, $q= 4.771$) (Figura 8B).

El análisis de DKK1 en el citoplasma demuestra que no hay cambios significativos en los astrocitos con tratamiento de ácido glutámico ($q= 0.2021$, prueba *post-hoc* Tukey) o $\text{TNF}\alpha$ posterior a 24 horas en comparación a la condición control ($q= 0.6461$, prueba *post-hoc* Tukey) (Figura 8B).

A)



B)

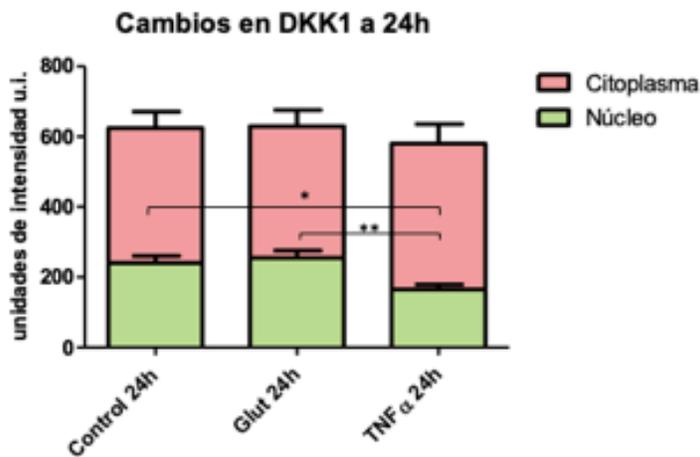


Figura 8. Análisis de la distribución celular de DKK1 en astrocitos posterior a 24 horas de tratamientos. A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de DKK1 (verde) de astrocitos marcados con GFAP (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul) después de 24 horas de tratamiento con ácido glutámico y $TNF\alpha$. B) Cuantificación de unidades de intensidad de DKK1 dentro del núcleo y citoplasma de astrocitos. Las barras representan el promedio \pm SEM e imágenes de 3 campos de 3 cultivos de astrocitos independientes. Prueba ANOVA seguida de prueba *post-hoc* Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a las condiciones control. Barra de escala equivalente a 20 μm .

7 Discusión

Los astrocitos son células sumamente sensibles al microambiente en el que se encuentran y son fundamentales en la formación, maduración, refinamiento de sinapsis y de circuitos neuronales. Por ello, son mediadores importantes de mecanismos fisiológicos y patológicos para diversas enfermedades neurológicas y esto los vuelve un blanco trascendental para su estudio.

En el SNC, la vía de Wnt tiene funciones esenciales para el desarrollo del encéfalo, favorece mecanismos de plasticidad sináptica como la dendritogénesis, neurogénesis, guía axonal y establecimiento de circuitos neuronales (Dickins & Salinas, 2013; García-Velázquez & Arias, 2021; C. W. He et al., 2018). Los astrocitos liberan agonistas de Wnt generando señales de supervivencia, inhibiendo GSK-3 β y la comunicación entre astrocitos-neuronas mediante Wnts puede tener roles neuroprotectores y restauradores durante enfermedades neurodegenerativas (Arredondo et al., 2020; Gonzalez & Rodríguez, 2017; Guérit et al., 2021).

Evidencia de diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas en roedores demuestran que los receptores de Wnt y la liberación de sus ligandos por parte de los astrocitos pueden tener funciones mediadoras y protectoras hacia las neuronas y otras células expuestas en el microambiente inflamatorio (Y. Chen et al., 2012; L'Episcopo et al., 2011; Okamoto et al., 2011; Sonn, Nakamura, & Renault-mihara, 2019).

La activación de la señalización de Wnt está inhibida por la presencia de antagonistas como DKK1 y su desregulación está asociada a diversas enfermedades como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y gliomas (Baetta & Banfi, 2019; Chae & Bothwell, 2019).

Sin embargo, la mayoría de los estudios que reflejan la importancia de Wnt en el cerebro se han realizado enfocados en neuronas y poco se conoce sobre cómo otros tipos celulares como los astrocitos modulan la vía de señalización de Wnt. Debido a ello, quisimos estudiar bajo qué condiciones los astrocitos pueden modular el contenido proteico de DKK1 y si este tendría algún cambio en su distribución celular que pudiera

tener algún efecto sobre la señalización de Wnt ante tratamientos basales o inflamatorios.

El grupo del laboratorio previamente ha reportado que los astrocitos tienen la capacidad de expresar mRNA de DKK1 de manera basal (Alobayan, 2019), lo que indica que los astrocitos pueden modular esta vía de señalización sin algún estímulo externo.

Mediante la técnica de Western Blot en diferentes intervalos de tiempo estudiamos las diferencias del contenido proteico de DKK1 en los astrocitos bajo condiciones fisiológicas empleando ácido glutámico. El ácido glutámico es un modulador de la actividad de astrocitos donde induce respuestas mediante incrementos de $[Ca^{2+}]_i$, lo que representa una forma de excitabilidad astrocítica, genera actividad sináptica espontánea, puede liberar vesículas extracelulares y son de gran importancia funcional en la comunicación entre ellos y las neuronas (Bazargani & Attwell, 2016; Kim et al., 1994; Parri et al., 2001), dado estas características, el glutamato es usado para imitar la exposición de las células gliales a redes neuronales activas.

A partir de estar expuestos a ácido glutámico, encontramos que se genera una tendencia a aumentar los niveles de DKK1 posterior a 6 horas, sin embargo, promueve un decremento significativo a las 24 horas. Estos resultados sugieren que el ácido glutámico puede modular la señalización de Wnt en los astrocitos y también indicaría que la vía de Wnt puede estarse activando posterior a 24 horas, por lo que, el antagonista se encuentra disminuido para regular funciones sinápticas que puedan conllevar mecanismos de neuroplasticidad.

Por otro lado, se ha descrito el uso de cultivos *in vitro* expuestos a citocinas pro inflamatorias como TNF α , IL-1 α y C1q como modelo de efectos neuroinflamatorios de enfermedades neurodegenerativas (Liddelow & Barres, 2017; Rodgers et al., 2020).

Se ha observado que patologías que contienen TNF α a la alta como en la exposición de VIH, eventos isquémicos, glioblastoma e incluso en enfermedades como arterioesclerosis, los astrocitos liberan antagonistas de Wnt como DKK1 para modular su señalización (W. Li et al., 2011; Mastroiacovo et al., 2009; Orellana et al., 2014; Seifert-Held et al., 2011). Estudios previos en el laboratorio han demostrado que los astrocitos

generan cambios en la expresión de ligandos de Wnt como Wnt5a y Wnt7a ante el tratamiento de $TNF\alpha$ (Alobayan, 2019).

Los resultados de la exposición de astrocitos ante $TNF\alpha$ demuestran que a pesar de que detectamos DKK1, no fue suficiente para generar cambios significativos en los niveles de DKK1 dentro de las ventanas de tiempo estudiadas. Sin embargo, se observó una ligera tendencia a aumentar su producción en comparación a las condiciones de ácido glutámico.

Recientemente, se describió que DKK1 puede colocalizar parcialmente de manera nuclear en un subconjunto de sitios de transcripción activa para regular diversos genes incluyendo al marcador Aldehído deshidrogenasa1A1(ALDH1A1), el cual, es un marcador de diferenciación astrocítica en el desarrollo del SNC, colocaliza con GFAP y S100 en cerebro maduro en humanos y se ha visto que una mayor expresión de ALDH1A1 en glioblastoma y astrocitoma pilocítico correlaciona con una mejor prognosis en sus pacientes (Adam et al., 2012).

No obstante, en el modelo de EA en ratón transgénico, TgCNRD8, mediante inmunohistoquímica han mostrado que mayoritariamente la localización de DKK1 se encuentra en el citoplasma y dendritas apicales de neuronas piramidales (Rosi et al., 2010). Y en el modelo de tautopatía, P301S, se demostró un incremento en la expresión de DKK1 así como su localización en el citoplasma cerca de la membrana celular en neuronas del tallo cerebral (Rosi et al., 2010).

Aunque DKK1 no tiene una señalización de localización nuclear convencional, se ha propuesto que moléculas pequeñas de hasta 40kDa pueden ingresar al núcleo por difusión pasiva o ser importadas por interacción con otras proteínas que contienen una localización nuclear funcional (Aguilera et al., 2015).

Por ello, quisimos indagar si la producción de DKK1 mostraba diferencias en la localización celular de los astrocitos mediante inmunofluorescencias posteriores a tratamiento de ácido glutámico y $TNF\alpha$ dentro de dos cursos temporales: 6 y 24 horas.

De acuerdo con los resultados, fue interesante demostrar que efectivamente hay una cantidad importante de DKK1 de localización nuclear en condiciones basales.

Durante los diferentes estímulos se encontró un incremento significativo de marcaje de DKK1 dentro del núcleo tras la exposición de astrocitos al tratamiento con ácido glutámico posterior a 6 horas, estos cambios sugieren que la ubicación de DKK1 nuclear puede indicar que participa en la regulación de genes específicos bajo estas condiciones. En contraste, posterior a la incubación de $TNF\alpha$ durante 6 horas, no se observan cambios significativos de DKK1 de manera nuclear.

Por otro lado, no observamos cambios significativos de DKK1 dentro del citoplasma de astrocitos en la condición de ácido glutámico tras 6 horas. Se observa la distribución de DKK1 con una ligera tendencia a aumentar en el citoplasma después de 6 horas con el tratamiento de $TNF\alpha$, sin embargo, no hay cambios significativos con respecto a la condición basal.

Aunado a ello, la exposición posterior a 24 horas de ácido glutámico no generó cambios en la intensidad de DKK1 dentro del núcleo. No obstante, el tratamiento proinflamatorio generó una disminución significativa de DKK1 dentro del núcleo a las 24 horas en comparación a su condición control, esos resultados pueden coincidir con que el decremento de DKK1 nuclear en etapas tempranas de enfermedades que conllevan ambientes inflamatorios como cáncer pueden facilitar la progresión tumoral, ya que regula genes con acción antiproliferativa, implicados en apoptosis e inhibe genes diana de β -catenina como c-MYC y ciclina D1 (Aguilera et al., 2015). Esto sugiere que activando la señalización de Wnt/ β -catenina en astrocitos puede estar modulando la inflamación promoviendo un mecanismo compensatorio para limitar el proceso degenerativo y neuroprotección progresiva (L'Episcopo et al., 2018).

En cambio, en del citoplasma no encontramos cambios significativos posterior al tratamiento de ácido glutámico y $TNF\alpha$ después de 24 horas. En conjunto, los resultados indican que la exposición de astrocitos ante $TNF\alpha$ genera un cambio en la distribución celular de DKK1 en astrocitos, lo que podría estar regulando la señalización de Wnt ante dichas condiciones.

8 Conclusión

De acuerdo con el análisis de la exposición de cultivos de astrocitos primarios ante

tratamiento de ácido glutámico se muestra un decremento significativo de los niveles de DKK1 tras 24 horas de incubación, por lo que se sugiere que podría tener una función neuroprotectora en donde la vía de señalización activa de Wnt podría estar generando una retroalimentación negativa del antagonista en esta condición que simula redes neuronales activas. Además, después del tratamiento de $TNF\alpha$ se induce una tendencia a aumentar los niveles de DKK1, pero sin cambios significativos en comparación con su condición control, como se ha observado en diversas enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, el ácido glutámico genera una mayor localización de DKK1 dentro del núcleo posterior a 6 horas de tratamiento en comparación a la condición control. En cambio, $TNF\alpha$ no induce cambios significativos de DKK1 de manera nuclear posterior a 6 horas. En contraste, posterior a 24 horas el tratamiento de $TNF\alpha$ genera una disminución significativa de DKK1 dentro del núcleo en comparación al tratamiento de ácido glutámico y su condición basal (Figura 9). Concluyendo así que, los astrocitos responden de manera diferencial mediante la liberación y localización celular de DKK1 ante diversos estímulos lo cual podría tener implicaciones importantes puesto que podría modular aspectos de la plasticidad neuronal mediada por astrocitos.

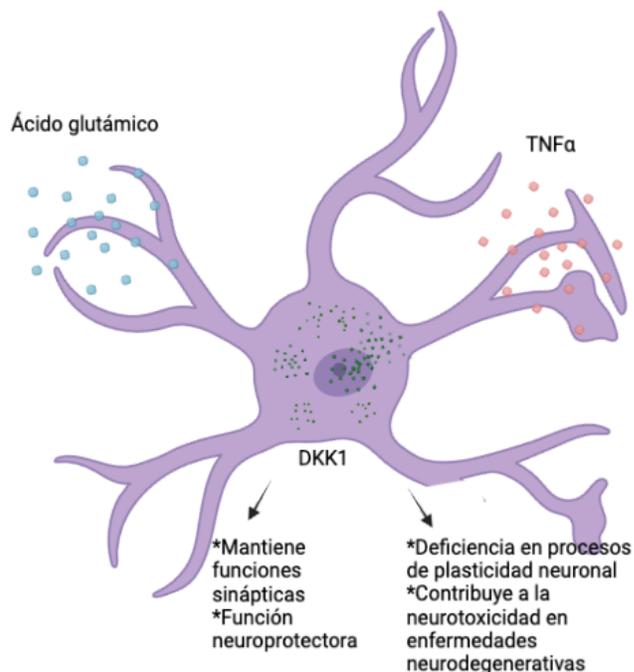


Figura 9. Efectos sobre la producción de DKK1. Efectos del tratamiento de ácido glutámico y $TNF\alpha$ sobre la producción de DKK1 en astrocitos que tiene repercusiones sobre la señalización de la vía Wnt.

Perspectivas

Dado que los resultados observados sugieren que existen efectos diferenciales sobre el contenido y distribución intracelular del antagonista DKK1 en astrocitos inducidos por glutamato y $TNF\alpha$ sería interesante analizar si esta expresión afecta las funciones neuronales utilizando co-cultivos astrocito-neurona. La presencia de $TNF\alpha$ generada en un ambiente proinflamatorio podría ser suficiente para inducir mayoritariamente un fenotipo específico de astrocito reactivo y modificar la función o morfología neural.

Así mismo, sería interesante indagar si ante concentraciones altas de ácido glutámico que puedan producir excitotoxicidad, explorar la respuesta de los astrocitos regulando los niveles de DKK1 que, a su vez se sabe puede regular la expresión de otros ligandos de la vía de señalización de Wnt en astrocitos o incluso en neuronas. Falta por explorar las consecuencias de la presencia de DKK1 nuclear que se ha relacionado con el control de la transcripción de algunos genes como el que codifica para la ALDH1A1 que participa en la diferenciación de los astrocitos. Queda abierta la pregunta sobre si diferentes poblaciones de astrocitos expresan de manera diferencial a DKK1 o si la respuesta a diversos estímulos varía dependiendo de la región en la que se estudien y del estado de activación previo en ellos. Por otro lado, el desarrollo de nuevos moduladores específicos para los astrocitos podrían proporcionar enfoques clínicos para inhibir transitoriamente las respuestas inflamatorias en el SNC para la prevención de trastornos relacionados con ambientes proinflamatorios como EA, EP o eventos isquémicos.

Dentro de las limitaciones de este trabajo encontramos que el análisis de los niveles de DKK1 se realizaron en una ventana temprana de exposición a los tratamientos, por lo que, aumentando los tiempos podría mostrar cambios en los niveles proteicos y observar cambios en la morfología de los astrocitos que se puedan producir como respuesta a dichos tratamientos. Por otro lado, tampoco se analizó la expresión de DKK1 a estos tiempos, lo que podría complementar los análisis realizados mediante Western Blot, así como, aumentar el número de experimentos realizados.

9 Referencias

- Acebron, S. P., & Niehrs, C. (2016). β -Catenin Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends in Cell Biology*, 26(12), 956–967. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.009>
- Adam, S. A., Schnell, O., Pöschl, J., Eigenbrod, S., Kretzschmar, H. A., Tonn, J. C., & Schüller, U. (2012). ALDH1A1 is a marker of astrocytic differentiation during brain development and correlates with better survival in glioblastoma patients. *Brain Pathology*, 22(6), 788–797. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00592.x>
- Aguilera, Ó., González-Sancho, J. M., Zazo, S., Rincón, R., Fernández, A. F., Tapia, O., ... Muñoz, A. (2015). Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*, 6(8), 5903–5917. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3464>
- Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, 176(1), 1570–1573. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>.
- Alobayan, R. (2019). *Caracterización de la vía de señalización Wnt en astrocitos y su papel en la neuroprotección*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neuroscience Letters*, 565, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1998). Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptordependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 6822–6829. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-17-06822.1998>
- Arcuino, G., Lin, J. H. C., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., ... Nedergaard, M. (2002). Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9840–9845. <https://doi.org/10.1073/pnas.152588599>
- Arredondo, S. B., Valenzuela-Bezanilla, D., Mardones, M. D., & Varela-Nallar, L. (2020). Role of Wnt Signaling in Adult Hippocampal Neurogenesis in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(September), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00860>
- Avila-Muñoz, E., & Arias, C. (2015). Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*, 63(11), 2010–2022.

<https://doi.org/10.1002/glia.22874>

- Ávila-Muñoz, E., & Arias, C. (2014). When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, *18*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.07.004>
- Baetta, R., & Banfi, C. (2019). Dkk (Dickkopf) Proteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *39*(7), 1330–1342. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312612>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Ben Haim, L., & Rowitch, D. H. (2016). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Bengoa-Vergniory, N., Gorroño-Etxebarria, I., López-Sánchez, I., Marra, M., Di Chiaro, P., & Kypta, R. (2017). Identification of Noncanonical Wnt Receptors Required for Wnt-3a-Induced Early Differentiation of Human Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*, *54*(8), 6213–6224. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0151-5>
- Bengoa-Vergniory, N., & Kypta, R. M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(21), 4157–4172. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2028-6>
- Bernardino, L., Xapelli, S., Silva, A. P., Jakobsen, B., Poulsen, F. R., Oliveira, C. R., ... Zimmer, J. (2005). Modulator effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience*, *25*(29), 6734–6744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1510-05.2005>
- Bielen, H., & Houart, C. (2014). The Wnt cries many: Wnt regulation of neurogenesis through tissue patterning, proliferation, and asymmetric cell division. *Developmental Neurobiology*, *74*(8), 772–780. <https://doi.org/10.1002/dneu.22168>
- Bröer, S., & Brookes, N. (2001). Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *Journal of Neurochemistry*, *77*(3), 705–719. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00322.x>
- Busceti, C. L., Biagioni, F., Aronica, E., Riozzi, B., Storto, M., Battaglia, G., ... Bruno, V. (2007). Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, *48*(4), 694–705. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01055.x>

- Cappuccio, I., Calderone, A., Busceti, C. L., Biagioni, F., Pontarelli, F., Bruno, V., ... Caricasole, A. (2005). Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *Journal of Neuroscience*, *25*(10), 2647–2657. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5230-04.2005>
- Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A. J., Caruso, A., ... Nicoletti, F. (2004). Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *Journal of Neuroscience*, *24*(26), 6021–6027. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1381-04.2004>
- Carron, C., & Shi, D. L. (2016). Specification of anteroposterior axis by combinatorial signaling during *Xenopus* development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *5*(2), 150–168. <https://doi.org/10.1002/wdev.217>
- Castelo-Branco, G., Sousa, K. M., Bryja, V., Pinto, L., Wagner, J., & Arenas, E. (2006). Ventral midbrain glia express region-specific transcription factors and regulate dopaminergic neurogenesis through Wnt-5a secretion. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *31*(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.09.014>
- Chae, W. J., & Bothwell, A. L. M. (2019). Dickkopf1: An immunomodulatory ligand and Wnt antagonist in pathological inflammation. *Differentiation*, *108*(May), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2019.05.003>
- Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Leist, M., Kobilák, J., & Dinnyés, A. (2016). Astrocyte differentiation of human pluripotent stem cells: New tools for neurological disorder research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *10*(215). <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00215>
- Charles, A. C., Merrill, J. E., Dirksen, E. R., & Sanderson, M. J. (1991). Intercellular signaling in glial cells: Calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron*, *6*(6), 983–992. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90238-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90238-U)
- Chen, C. M., Orefice, L. L., Chiu, S. L., LeGates, T. A., Hattar, S., Huganir, R. L., ... Kuruvilla, R. (2017). Wnt5a is essential for hippocampal dendritic maintenance and spatial learning and memory in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(4), E619–E628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615792114>
- Chen, Y., Guan, Y., Liu, H., Wu, X., Yu, L., Wang, S., ... Wang, X. (2012). Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is associated with glial proliferation in the adult spinal

- cord of ALS transgenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.006>
- Cheng, C., Lau, S. K. M., & Doering, L. C. (2016). Astrocyte-secreted thrombospondin-1 modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0256-9>
- Chung, I. Y., & Benveniste, E. N. (1990). Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes . Induction by lipopolysaccharide , IFN-gamma , and IL-1 beta. *Journal of Immunology*, 144:2999-3.
- Ciani, L., Boyle, K. A., Dickins, E., Sahores, M., Anane, D., Lopes, D. M., ... Salinas, P. C. (2011). Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10732–10737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018132108>
- Ciani, L., Marzo, A., Boyle, K., Stamatakou, E., Lopes, D. M., Anane, D., ... Salinas, P. C. (2015). Wnt signalling tunes neurotransmitter release by directly targeting Synaptotagmin-1. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9302>
- Clarke, L. E., Liddelow, S. A., Chakraborty, C., Münch, A. E., Heiman, M., & Barres, B. A. (2018). Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(8), E1896–E1905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800165115>
- Codazzi, F., Teruel, M. N., & Meyer, T. (2001). Control of astrocyte Ca²⁺ oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Current Biology*, 11(14), 1089–1097. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00326-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00326-8)
- Cornell-Bell, A. H., Thomas, P. G., & Caffrey, J. M. (1992). Ca²⁺ and filopodial responses to glutamate in cultured astrocytes and neurons. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 70(SUPPL.). <https://doi.org/10.1139/y92-264>
- Cornell-Bell, A. H., Thomas, P. G., & Smith, S. J. (1990). The excitatory neurotransmitter glutamate causes filopodia formation in cultured hippocampal astrocytes. *Glia*, 3(5), 322–334. <https://doi.org/10.1002/glia.440030503>
- Cruciat, C. M., & Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), 1–26.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015081>

Cuitino, L., Godoy, J. A., Farías, G. G., Couve, A., Bonansco, C., Fuenzalida, M., & Inestrosa, N. C. (2010). Wnt-5a modulates recycling of functional GABAA receptors on hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, *30*(25), 8411–8420.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5736-09.2010>

Decourt, B., Lahiri, D. K., & Sabbagh, M. N. (2017). Targeting tumor necrosis factor alpha for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.*, *14*(4), 412–425.

<https://doi.org/10.2174/1567205013666160930110551.Targeting>

Dickins, E. M., & Salinas, P. C. (2013). Wnts in action: from synapse formation to synaptic maintenance. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(162), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00162>

Dobbs, R. J., Charlett, A., Purkiss, A. G., Dobbs, S. M., Weller, C., & Peterson, D. W. (1999). Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurologica Scandinavica*, *100*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1999.tb00721.x>

Efremova, L., Chovancova, P., Adam, M., Gutbier, S., Schildknecht, S., & Leist, M. (2017). Switching from astrocytic neuroprotection to neurodegeneration by cytokine stimulation. *Archives of Toxicology*, *91*(1), 231–246. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1702-2>

Eze, U. C., Bhaduri, A., Haeussler, M., Nowakowski, T. J., & Kriegstein, A. R. (2021). Single-cell atlas of early human brain development highlights heterogeneity of human neuroepithelial cells and early radial glia. *Nature Neuroscience*, *24*(4), 584–594.

<https://doi.org/10.1038/s41593-020-00794-1>

Farhy-Tselnicker, I., & Allen, N. J. (2018). Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development*, *13*(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>

Farhy-Tselnicker, I., van Casteren, A. C. M., Lee, A., Chang, V. T., Aricescu, A. R., & Allen, N. J. (2017). Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron*, *96*(2), 428-445.e13.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.053>

Farías, 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. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15857–15866.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M808986200>

- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Glia*, 330(6005), 774–778. <https://doi.org/10.1126/science.1190928>
- García-Velázquez, L., & Arias, C. (2017). The emerging role of Wnt signaling dysregulation in the understanding and modification of age-associated diseases. *Ageing Research Reviews*, 37, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.06.001>
- García-Velázquez, L., & Arias, C. (2021). Differential Regulation of Wnt Signaling Components During Hippocampal Reorganization After Entorhinal Cortex Lesion. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 41(3), 537–549. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00870-x>
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., & Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665), 357–362. <https://doi.org/10.1038/34848>
- 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(4), 510–525. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.022>
- Gonzalez, P., & Rodríguez, F. J. (2017). Analysis of the expression of the Wnt family of proteins and its modulatory role on cytokine expression in non activated and activated astroglial cells. *Neuroscience Research*, 114, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2016.08.003>
- Götze, S., Wolter, M., Reifenberger, G., Müller, O., & Sievers, S. (2010). Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. *International Journal of Cancer*, 126(11), 2584–2593. <https://doi.org/10.1002/ijc.24981>
- Gould, T. D., & Manji, H. K. (2002). The Wnt signaling pathway in bipolar disorder. *The Neuroscientist*, 8(5), 497–511. <https://doi.org/10.1177/107385802237176>
- Guérit, S., Fidan, E., Macas, J., Czapalla, C. J., Figueiredo, R., Vijikumar, A., ... Liebner, S. (2021). Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance. *Progress in Neurobiology*, 199(xxxx), 101937. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101937>
- Habbas, S., Santello, M., Becker, D., Stubbe, H., Zappia, G., Liaudet, N., ... Volterra, A. (2015). Neuroinflammatory TNF α Impairs Memory via Astrocyte Signaling. *Cell*, 163(7), 1730–1741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.023>
- Hall, A. C., Lucas, F. R., & Salinas, P. C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation

in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*, 100(5), 525–535.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80689-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80689-3)

- Halleskog, C., Dijksterhuis, J. P., Kilander, M. B. C., Becerril-Ortega, J., Villaescusa, J. C., Lindgren, E., ... Schulte, G. (2012). Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-111>
- Hassinger, T. D., Atkinson, P. B., Strecker, G. J., Whalen, L. R., Dudek, F. E., Kossel, A. H., & Kater, S. B. (1995). Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *Journal of Neurobiology*, 28(2), 159–170. <https://doi.org/10.1002/neu.480280204>
- He, C. W., Liao, C. P., & Pan, C. L. (2018). Wnt signalling in the development of axon, dendrites and synapses. *Open Biology*, 8(10). <https://doi.org/10.1098/rsob.180116>
- He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., ... Sun, Y. E. (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nature Neuroscience*, 8(5), 616–625. <https://doi.org/10.1038/nn1440>
- He, M., Dong, H., Huang, Y., Lu, S., Zhang, S., Qian, Y., & Jin, W. (2016). Astrocyte-derived CCL2 is associated with m1 activation and recruitment of cultured microglial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(3), 859–870. <https://doi.org/10.1159/000443040>
- He, X. W., Wang, E., Bao, Y. Y., Wang, F., Zhu, M., Hu, X. F., & Jin, X. P. (2016). High serum levels of sclerostin and Dickkopf-1 are associated with acute ischaemic stroke. *Atherosclerosis*, 253, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.003>
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>
- Huang, Y., Liu, L., & Liu, A. (2018). Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sciences*, 209(May), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.019>
- Inestrosa, N. C., Montecinos-oliva, C., & Fuenzalida, M. (2012). Wnt Signaling : Role in Alzheimer Disease and Schizophrenia. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7, 788–807. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9417-5>
- Inestrosa, N. C., & Varela-Nallar, L. (2014). Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(1), 64–74.

<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt051>

- Inestrosa, N. C., & Varela-Nallar, L. (2015). Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1996-4>
- Jang, J., Jung, Y., Kim, Y., Jho, E. H., & Yoon, Y. (2017). LPS-induced inflammatory response is suppressed by Wnt inhibitors, Dickkopf-1 and LGK974. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep41612>
- Jaschke, N. P., Pählig, S., Sinha, A., Adolph, T. E., Colunga, M. L., Hofmann, M., ... Rachner, T. D. (2022). Dickkopf1 fuels inflammatory cytokine responses. *Communications Biology*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04368-8>
- Jussila, M., & Ciruna, B. (2017). Zebrafish models of non-canonical Wnt/planar cell polarity signalling: fishing for valuable insight into vertebrate polarized cell behavior. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.1002/wdev.267>
- Kalani, M. Y. S., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., ... Nusse, R. (2008). Wnt-mediated self-renewal of neural stem / progenitor cells.
- Ke, X., Yang, M., Luo, J. M., Zhang, Y., & Chen, X. Y. (2020). The role of serum Dickkopf-1 in predicting 30-day death in severe traumatic brain injury. *Brain and Behavior*, 10(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/brb3.1589>
- Kerr, K. S., Fuentes-Medel, Y., Brewer, C., Barria, R., Ashley, J., Abruzzi, K. C., ... Budnik, V. (2014). Glial wingless/wnt regulates glutamate receptor clustering and synaptic physiology at the Drosophila neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, 34(8), 2910–2920. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3714-13.2014>
- Kim, W. T., Rioult, M. G., & Cornell-Bell, A. H. (1994). Glutamate-induced calcium signaling in astrocytes. *Glia*, 11(2), 173–184. <https://doi.org/10.1002/glia.440110211>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75. Retrieved from www.landesbioscience.com
- Kondo, T., Matsuoka, A. J., Shimomura, A., Koehler, K. R., Chan, R. J., Miller, J. M., ... Hashino, E. (2011). Wnt signaling promotes neuronal differentiation from mesenchymal stem cells through activation of Tlx3. *Stem Cells*, 29(5), 836–846. <https://doi.org/10.1002/stem.624.Wnt>

- Korn, T., Magnus, T., & Jung, S. (2005). Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor- α . *The FASEB Journal*, 19(13), 1878–1880. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3748fje>
- Krishnamurthy, N., & Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, 62, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>
- Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., ... Eroglu, C. (2011). Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 440–449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104977108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1104977108>
- Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., ... Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 12(9), 1097–1105. <https://doi.org/10.1038/nn.2360>
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Morale, M. C., Serapide, M. F., ... Marchetti, B. (2014). Targeting Wnt signaling at the neuroimmune interface for dopaminergic neuroprotection/repair in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(1), 13–26. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt053>
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Serapide, M. F., Caniglia, S., Testa, N., Leggio, L., ... Marchetti, B. (2018). Microglia polarization, gene-environment interactions and wnt/ β -catenin signaling: Emerging roles of glia-neuron and glia-stem/neuroprogenitor crosstalk for dopaminergic neurorestoration in aged Parkinsonian brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00012>
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C., Cossetti, C., ... Marchetti, B. (2011). Reactive astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling link nigrostriatal injury to repair in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Neurobiology Dis*, 41(2), 508–527. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.10.023.L>
- Langton, P. F., Kakugawa, S., & Vincent, J. P. (2016). Making, Exporting, and Modulating Wnts. *Trends in Cell Biology*, 26(10), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.011>
- Li, W., Henderson, L. J., Major, E. O., & Al-Harhi, L. (2011). IFN- γ Mediates Enhancement of

- HIV Replication in Astrocytes by Inducing an Antagonist of the β -Catenin Pathway (DKK1) in a STAT 3-Dependent Manner. *The Journal of Immunology*, 186(12), 6771–6778.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100099>
- Li, Y., Lu, W., King, T. D., Liu, C. C., Bijur, G. N., & Bu, G. (2010). Dkk1 stabilizes wnt co-receptor LRP6: Implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS ONE*, 5(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011014>
- Li, Z., Chen, X., Zhang, X., Ren, X., Chen, X., Cao, J., ... Guo, F. (2017). Small Interfering RNA Targeting Dickkopf-1 Contributes to Neuroprotection After Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 61(2), 279–288. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0883-3>
- Liddelw, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddelw, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., ... Gage, F. H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437(7063), 1370–1375. <https://doi.org/10.1038/nature04108>
- Lovestone, S., Killick, R., Di Forti, M., & Murray, R. (2007). Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends in Neurosciences*, 30(4), 142–149.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.02.002>
- Lundgaard, I., Osório, M. J., Kress, B. T., Sanggaard, S., & Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*, 276, 161–173.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.050>
- Lutgen, V., Narasipura, S. D., Sharma, A., Min, S., & Al-Harhi, L. (2016). β -Catenin signaling positively regulates glutamate uptake and metabolism in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0691-7>
- Ma, B., & Hottiger, M. O. (2016). Crosstalk between wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>

- Maguschak, K. A., & Ressler, K. J. (2008). B-Catenin Is Required for Memory Consolidation. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1319–1326. <https://doi.org/10.1038/nn.2198>
- Maguschak, K. A., & Ressler, K. J. (2011). Wnt signaling in amygdala-dependent learning and memory. *Journal of Neuroscience*, *31*(37), 13057–13067. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3248-11.2011>
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., ... Niehrs, C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*, *417*(6889), 664–667. <https://doi.org/10.1038/nature756>
- Marchetti, B., L'Episcopo, F., Morale, M. C., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., ... Pluchino, S. (2013). Uncovering novel actors in astrocyte-neuron crosstalk in Parkinson's disease: The Wnt/ β -catenin signaling cascade as the common final pathway for neuroprotection and self-repair. *European Journal of Neuroscience*, *37*(10), 1550–1563. <https://doi.org/10.1111/ejn.12166>
- Marques Orellana, A. M., Vasconcelos, A. R., Leite, J. A., Lima, L. de S., Andreotti, D. Z., Munhoz, C. D., ... Scavone, C. (2015). Age-related neuroinflammation and changes in AKT-GSK-3 β and WNT/ β -CATENIN signaling in rat hippocampus. *Aging*, *7*(12), 1094–1111. <https://doi.org/10.18632/aging.100853>
- Martinez, M., Torres, V. I., Vio, C. P., & Inestrosa, N. C. (2019). Canonical Wnt signaling modulates the expression of pre- and postsynaptic components in different temporal patterns. *Molecular Neurobiology*.
- Marzo, A., Galli, S., Lopes, D., McLeod, F., Podpolny, M., Segovia-Roldan, M., ... Salinas, P. C. (2016). Reversal of Synapse Degeneration by Restoring Wnt Signaling in the Adult Hippocampus. *Current Biology*, *26*(19), 2551–2561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.024>
- Mastroiacovo, F., Busceti, C. L., Biagioni, F., Moyanova, S. G., Meisler, M. H., Battaglia, G., ... Nicoletti, F. (2009). Induction of the Wnt antagonist, Dickkopf-1, contributes to the development of neuronal death in models of brain focal ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *29*(2), 264–276. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.111>
- Mattes, B., Dang, Y., Greicius, G., Kaufmann, L. T., Prunsche, B., Rosenbauer, J., ... Scholpp, S. (2018). Wnt/PCP controls spreading of Wnt/ β -catenin signals by cytonemes in vertebrates. *ELife*, *7*, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.36953>

- McLeod, F., Bossio, A., Marzo, A., Ciani, L., Sibilla, S., Hannan, S., ... Salinas, P. C. (2018). Wnt Signaling Mediates LTP-Dependent Spine Plasticity and AMPAR Localization through Frizzled-7 Receptors. *Cell Reports*, 23(4), 1060–1071. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.119>
- Michinaga, S., & Koyama, Y. (2019). Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms20030571>
- Miranda, C. J., Braun, L., Jiang, Y., Hester, M. E., Zhang, L., Riolo, M., ... Kaspar, B. K. (2012). Aging brain microenvironment decreases hippocampal neurogenesis through Wnt-mediated survivin signaling. *Aging Cell*, 23(3), 542–552. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00816.x>.Aging
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A guide for the perplexed. *Glia*, 63(8), 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>
- Moran, J., & Patel, A. J. (1989). Stimulation of the N-methyl-d-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes. *Brain Research*, 486(1), 15–25. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91272-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91272-9)
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., ... Westphal, H. (2001). Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse. *Developmental Cell*, 1(3), 423–434. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00041-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00041-7)
- Müller, M. S., Fouyssac, M., & Taylor, C. W. (2018). Effective Glucose Uptake by Human Astrocytes Requires Its Sequestration in the Endoplasmic Reticulum by Glucose-6-Phosphatase-β. *Current Biology*, 28(21), 3481–3486.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.060>
- Muroyama, Y., Kondoh, H., & Takada, S. (2004). Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(4), 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.023>
- Nedergaard, M., Ransom, B., & Goldman, S. A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.08.008>
- Nett, W. J., Oloff, S. H., & Mccarthy, K. D. (2002). Hippocampal astrocytes in situ exhibit

- calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *Journal of Neurophysiology*, 87(1), 528–537. <https://doi.org/10.1152/jn.00268.2001>
- Niehrs, C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25(57), 7469–7481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210054>
- Niehrs, Christof. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
- Niehrs, Christof, & Acebron, S. P. (2012). Mitotic and mitogenic Wnt signalling. *EMBO Journal*, 31(12), 2705–2713. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.124>
- Noelanders, R., & Vleminckx, K. (2017). How Wnt Signaling Builds the Brain: Bridging Development and Disease. *Neuroscientist*, 23(3), 314–329. <https://doi.org/10.1177/1073858416667270>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods in Molecular Biology*, 814, 23–45. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Ogoshi, F., Yin, H. Z., Kuppumbatti, Y., Song, B., Amindari, S., & Weiss, J. H. (2005). Tumor necrosis-factor-alpha (TNF- α) induces rapid insertion of Ca²⁺-permeable α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole- propionate (AMPA)/kainate (Ca-A/K) channels in a subset of hippocampal pyramidal neurons. *Experimental Neurology*, 193(2), 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.12.026>
- Okamoto, M., Inoue, K., Iwamura, H., Terashima, K., Soya, H., Asashima, M., & Kuwabara, T. (2011). Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *The FASEB Journal*, 25(10), 3570–3582. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184697>
- Oliva, C. A., Montecinos-Oliva, C., & Inestrosa, N. C. (2018). *Wnt signaling in the Central Nervous System: new insights in health and disease. Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 153). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.018>

- Oliva, C. A., Vargas, J. Y., & Inestrosa, N. C. (2013). Wnts in adult brain: From synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(DEC), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00224>
- Olmos, G., & Lladó, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/861231>
- Onishi, K., Hollis, E., & Zou, Y. (2014). Axon guidance and injury-lessons from Wnts and Wnt signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, 27, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.05.005>
- Orellana, J. A., Sáez, J. C., Bennett, M. V. L., Berman, J. W., Morgello, S., & Eugenin, E. A. (2014). HIV increases the release of dickkopf-1 protein from human astrocytes by a Cx43 hemichannel-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 128(5), 752–763. <https://doi.org/10.1111/jnc.12492>
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H. P., Kooijman, L., Bossers, K., & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746–2760. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.06.004>
- Ortiz-Matamoros, A., & Arias, C. (2018). Chronic infusion of Wnt7a, Wnt5a and Dkk-1 in the adult hippocampus induces structural synaptic changes and modifies anxiety and memory performance. *Brain Research Bulletin*, 139(March), 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.03.008>
- Paganoni, S., Bernstein, J., & Ferreira, A. (2010). Ror1-Ror2 complexes modulate synapse formation in hippocampal neurons. *Neuroscience*, 165(4), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.056>
- Paixão, S., & Klein, R. (2010). Neuron-astrocyte communication and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 20(4), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.008>
- Parri, H. R., Gould, T. M., & Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature Neuroscience*, 4(8), 803–812. <https://doi.org/10.1038/90507>
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: Costs and benefits. *Physiological Reviews*, 94(4), 1077–1098.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>

- Pekny, M., & Pekna, M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 483–491.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.11.014>
- Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 302, 2–22.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>
- 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. *Journal of Neuroscience*, 28(34), 8644–8654.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2320-08.2008>
- Purro, S., Dickins, E., & Salinas, P. (2012). The secreted Wnt antagonist dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *Journal of Neuroscience*, 32(10), 3492–3498.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4562-11.2012>
- Purro, Silvia A., Galli, S., & Salinas, P. C. (2014). Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(1), 75–80. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt049>
- Quiroz-Baez, R., Rojas, E., & Arias, C. (2009). Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of α -, β - and γ -secretase expression. *Neurochemistry International*, 55(7), 662–670.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.06.012>
- Rheinbay, E., Suvà, M. L., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Patel, A. P., Shahid, M., ... Bernstein, B. E. (2013). An aberrant transcription factor network essential for Wnt signaling and stem cell maintenance in glioblastoma Wnt signaling and collaborating TFs that are essential for the maintenance and tumorigenicity of GBM CSCs. *Cell Rep*, 3(5), 1567–1579.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.021>
- Risher, W. C., Patel, S., Kim, I. H. wa., Uezu, A., Bhagat, S., Wilton, D. K., ... Eroglu, C. (2014). Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *ELife*, 3, 1–24.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04047>
- Rodgers, K. R., Lin, Y., Langan, T. J., Iwakura, Y., & Chou, R. C. (2020). Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Scientific*

Reports, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63766-2>

Rosi, M. C., Luccarini, I., Grossi, C., Fiorentini, A., Spillantini, M. G., Prisco, A., ... Casamenti, F. (2010). Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *Journal of Neurochemistry*, 112(6), 1539–1551.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06566.x>

Seib, D. R. M., Corsini, N. S., Ellwanger, K., Plaas, C., Mateos, A., Pitzer, C., ... Martin-Villalba, A. (2013). Loss of dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline. *Cell Stem Cell*, 12(2), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.010>

Seifert-Held, T., Pekar, T., Gattlinger, T., Simmet, N. E., Scharnagl, H., Stojakovic, T., ... Storch, M. K. (2011). Circulating Dickkopf-1 in acute ischemic stroke and clinically stable cerebrovascular disease. *Atherosclerosis*, 218(1), 233–237.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.015>

Sharif, Y., Jumah, F., Coplan, L., Krosser, A., Sharif, K., & Tubbs, R. S. (2018). Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clinical Anatomy*, 31(6), 812–823. <https://doi.org/10.1002/ca.23083>

Shu, Y., Xiang, M., Zhang, P., Qi, G., He, F., Zhang, Q., ... Tian, B. (2019). Wnt-5a promotes neural development and differentiation by regulating CDK5 via Ca²⁺/Calpain Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(6), 2604–2615.

<https://doi.org/10.1159/000495932>

Silva, A. A., Silva, R. R., Gibaldi, D., Mariante, R. M., dos Santos, J. B., Pereira, I. R., ... Lannes-Vieira, J. (2017). Priming astrocytes with TNF enhances their susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection and creates a self-sustaining inflammatory milieu. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0952-0>

Sitcheran, R., Gupta, P., Fisher, P. B., & Baldwin, A. S. (2005). Positive and negative regulation of EAAT2 by NF- κ B: A role for N-myc in TNF α -controlled repression. *EMBO Journal*, 24(3), 510–520. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600555>

Sloan, S. A., & Barres, B. A. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 27, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.005>

Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends in Immunology*, 41(9), 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>

- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sonn, I., Nakamura, M., & Renault-mihara, F. (2019). Polarization of Reactive Astrocytes in Response to Spinal Cord Injury is Enhanced by M2 Macrophage – Mediated Activation of Wnt / β -Catenin Pathway. *Molecular Neurobiology*.
- Souza, D. G., Almeida, R. F., Souza, D. O., & Zimmer, E. R. (2019). The astrocyte biochemistry. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 95, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.04.002>
- Stanganello, E., Zahavi, E. E., Burute, M., Smits, J., Jordens, I., Maurice, M. M., ... Hoogenraad, C. C. (2019). Wnt Signaling Directs Neuronal Polarity and Axonal Growth. *iScience*, 13, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.02.029>
- Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *Journal of Neuroscience*, 25(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>
- Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/nature04671>
- Su Akdemir, E., Yu-Szu Huang, A., & Deneen, B. (2020). Astrocytogenesis: where, when, and how. *F1000Research*, 9(233). Retrieved from <https://doi.org/10.12688/f1000research.22405.1>
- Tabatadze, N., Tomas, C., McGonigal, R., Lin, B., Schook, A., & Routtenberg, A. (2012). Wnt transmembrane signaling and long-term spatial memory. *Hippocampus*, 22(6), 1228–1241. <https://doi.org/10.1002/hipo.20991>
- Terrando, N., Monaco, C., Ma, D., Foxwell, B. M. J., Feldmann, M., & Maze, M. (2010). Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20518–20522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014557107>
- Torres D, M., Garcia, O., Tang, C., & Busciglio, J. (2018). Dendritic spine pathology and thrombospondin-1 deficits in Down syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 114, 1570–1573. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>.
- Varela-Nallar, L., Grabowski, C. P., Alfaro, I. E., Alvarez, A. R., & Inestrosa, N. C. (2009). Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural*

- Development*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-41>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- von Bartheld, C., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2017). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: a review of 150 years of cell counting. *Physiology & Behavior*, 524(18), 139–148. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Wang, G., Li, Z., Li, S., Ren, J., Suresh, V., Xu, D., ... Guo, F. (2019). Minocycline Preserves the Integrity and Permeability of BBB by Altering the Activity of DKK1–Wnt Signaling in ICH Model. *Neuroscience*, 415, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.038>
- Wang, J., Jing, Y., Song, L., & Xing, Y. (2016). Neuroprotective effects of Wnt/ β -catenin signaling pathway against A β -induced tau protein over-phosphorylation in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(4), 628–632. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.130>
- Wang, K., Ye, L., Lu, H., Chen, H., Zhang, Y., Huang, Y., & Zheng, J. C. (2017). TNF- α promotes extracellular vesicle release in mouse astrocytes through glutaminase. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0853-2>
- Wang, Z., Pekarskaya, O., Bencheikh, M., Chao, W., Gelbard, H. A., Ghorpade, A., ... Volsky, D. J. (2003). Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. *Virology*, 312(1), 60–73. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00181-8)
- Welser-Alves, J. V., & Milner, R. (2013). Microglia are the major source of TNF- α and TGF- β 1 in postnatal glial cultures; Regulation by cytokines, lipopolysaccharide, and vitronectin. *Neurochemistry International*, 63(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.04.007>
- Xu, J., Peng, H., Kang, N., Zhao, Z., Lin, J. H. C., Stanton, P. K., & Kang, J. (2007). Glutamate-induced exocytosis of glutamate from astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24185–24197. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700452200>
- Yang, Y., & Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/Planar cell polarity signaling: cellular orientation by facing the wind. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 623–646. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125315>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>

Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(6), 665–673.

<https://doi.org/10.1111/cns.13123>

Zhou, Y., Liu, F., Xu, Q., & Wang, X. (2010). Analysis of the expression profile of Dickkopf-1 gene in human glioma and the association with tumor malignancy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 138. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-138>

Zhu, Z., Guo, D., Zhong, C., Wang, A., Xie, X., Xu, T., ... He, J. (2018). Serum Dkk-1 (Dickkopf-1) Is a Potential Biomarker in the Prediction of Clinical Outcomes Among Patients With Acute Ischemic Stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1(39), 285–293. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311960>

Zorn, A. M. (2001). Wnt signalling: Antagonistic dickkopfs. *Current Biology*, 11(15), 592–595.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00360-8)

Zou, J., Wang, Y. X., Dou, F. F., Lü, H. Z., Ma, Z. W., Lu, P. H., & Xu, X. M. (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochemistry International*, 56(4), 577–584.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.12.021>