



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
BIOTECNOLOGÍA

Influencia de los receptores tipo Toll y las vías JAK/STAT y WNT en precursores neurales

Celia Calvo Fernández

Tutor: Dra. María Victoria Moreno Manzano

Cotutor: Marina Sánchez Petidier

Curso académico 2019-2020



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer a Vicky la enorme oportunidad que me ha dado permitiendo integrarme en su equipo y desarrollar este trabajo recibiendo sus consejos. Por supuesto a Marina, por dedicar su tiempo y paciencia a enseñarme tantas cosas. A todos los compañeros del laboratorio por su acogida y ayuda.

A mis padres, por estar conmigo, animarme y querer siempre lo mejor para mí. Y por último a mis amigos, por compartir conmigo esta etapa y estar a mi lado siempre.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

TLR: Receptor tipo Toll

NPC: Células precursoras neurales

BSA: Albúmina de suero bovino

BCA: Ácido Bicinconínico

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

LPS: Lipopolisacáricos

DAMP: Patrones moleculares endógenos asociados al daño

NFTA: Factor Nuclear de las células T activadas

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

GSK3: Glicógeno Sintasa Quinasa 3

LRR: Repeticiones ricas en leucina

TIR: Dominio del receptor Toll/interleucina-1

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

MyD88: Proteína adaptadora del Factor de diferenciación mieloide-88

TRIF: TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon- β

IFN: Interferón

IL: Interleucina

LEF/TCF: Factor de Transcripción Nuclear del Factor Linfoide Potenciador del Factor de Células T

RPC: Células progenitoras de la retina

IRF: Factor de regulación del interferón

IRAK: Quinasa asociada a IL-1R

GFAP: Proteína fibrilar glial ácida

JAK: Janus quinasas

SEM: Desviación estándar de la media

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción

Fzd: Receptor Frizzled

JNK: Jun quinasas

NGS: Normal Goat Serum

CNTF: Receptor del Factor neutrófico ciliar

TBS: Tampón Tris salino

TUJ: β Tubulina III

OLIG2: Factor de transcripción de oligodendrocitos

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

WT: Wild-Type

KO: Knockout

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización de los diferentes tipos de TLRs.....	4
Figura 2. Esquema de las posibles diferenciaciones de cada fenotipo en estudio: WildType, TLR2 knockout y TLR4 knockout en células precursoras neurales del cerebro	6
Figura 3. Esquema de la vía de señalización JAK-STAT	8
Figura 4: Diagrama de la ruta de señalización WNT: ruta canónica y no canónica. ...	10
Figura 5. Relación entre las vías de señalización JAK-STAT y WNT en diferenciación de NPCs.....	12
Figura 6. Gráficas del porcentaje de NPCs TUJ, OLIG2 y GFAP positivas tras una semana de diferenciación en los 3 fenotipos de estudio.....	28
Figura 7. Gráficas del porcentaje de NPCs TUJ, OLIG2 y GFAP positivas en condiciones de proliferación en los 3 fenotipos. Imágenes de la inmunofluorescencia.....	31
Figura 8. Gráficas del porcentaje de NPCs doble positivas por OLIG2 y GFAP en los tres fenotipos.	32
Figura 9. Gráficas del porcentaje de NPCs marcadas por STAT3 y pSTAT3 en condiciones de diferenciación en los 3 fenotipos. Imágenes de la inmunofluorescencia.. ..	33
Figura 10. Gráfica del porcentaje de NPCs marcadas tanto por STAT3 como por pSTAT3 en los 3 fenotipos.....	34
Figura 11.. Gráfica del porcentaje de NPCs marcadas tanto por STAT3 como por GFAP en los tres fenotipos.	35
Figura 12. Gráficas del ensayo de Western blot de las proteínas STAT1 y p STAT1 tras la activación de NPCs con Interferón gamma.	36
Figura 13. Gráficas del ensayo de Western blot de la proteína STAT3 y p STAT3 tras la activación de NPCs con Interferón gamma.	37
Figura 14. Gráficas del ensayo de Western blot de las proteínas GSK3 β y pGSK3 β para cada uno de los fenotipos y el nivel basal de estos tras la activación de NPCs con Interferón gamma.. ..	39
Figura 15. Gráficas del ensayo de Western blot de las proteínas ERK y pERK para cada uno de los fenotipos y el nivel basal de estos tras la activación de NPCs con Interferón gamma.....	40

Figura 16. Gráficas del ensayo de Western blot de la proteína JNK para cada uno de los fenotipos y el nivel basal de estos tras la activación de NPCs con Interferón gamma

..... 41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación de los Receptores Tipo Toll (TLRs)</i>	2
Tabla 2: <i>Componentes de los medios de cultivo</i>	18
Tabla 3: <i>Anticuerpos primarios empleados en la inmunocitoquímica</i>	20
Tabla 4: <i>Anticuerpos secundarios empleados en la inmunocitoquímica</i>	21
Tabla 5: <i>Anticuerpos primarios empleados en el Western Blot</i>	23
Tabla 6: <i>Anticuerpos secundarios empleados en el Western blot</i>	24

RESUMEN

Los receptores tipo Toll (TLRs) son conocidos por tener un papel esencial en la inmunidad innata, pero además de esto, en los últimos años, son reconocidos por su participación en procesos de neurogénesis en células precursoras neurales (NPC) de cerebro, así como en su diferenciación. Sin embargo, no existen antecedentes sobre estos procesos en NPCs de la médula espinal. Este estudio se centra en la influencia de los TLRs tipo 2 y 4, que se expresan en la médula espinal y sus precursores neurales, mediante la realización de ensayos con NPCs derivados de ratones *Wild-Type*, *TLR2 knockout* y *TLR4 knockout*. En primer lugar, se estudia la naturaleza multipotente de esta población, en cada genotipo, estudiando la proporción de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos en condiciones de proliferación y diferenciación. Por otro lado, se evalúa la respuesta de las rutas de señalización JAK-STAT y WNT en respuesta a interferón gamma de forma comparativa en los NPCs derivados de los tres fenotipos WT, TLR2 y TLR4 KO.

Los resultados obtenidos mostraron que la ausencia de TLR2 y TLR4 tiene una influencia sobre el proceso de diferenciación de NPCs de médula espinal, aumentando el número de precursores neurales, con una respuesta limitada de las vías JAK/STAT y WNT en presencia de interferón gamma.

Los TLRs están implicados en la correcta activación de las rutas WNT vía ERK y JAK/STAT en cuanto al proceso de diferenciación.

PALABRAS CLAVE: Receptores tipo Toll, células precursoras neurales, *TLR2 knockout*, *TLR4 knockout*, vía de señalización JAK/STAT y vía de señalización WNT.

ABSTRACT

Toll receptors (TLRs) are known to play an essential role in innate immunity, but in addition to this, in recent years, they have been recognized for their involvement in neurogenesis processes in neural precursor cells (NPCs) in the brain, as well as in their differentiation. However, there is no history of these processes in spinal cord PCNs. This study focuses on the influence of TLRs type 2 and 4, which are expressed in the spinal cord and its neural precursors, by conducting trials with NPCs derived from Wild-Type mice, TLR2 knockout and TLR4 knockout. First, the multipotent nature of this population is studied, in each genotype, by studying the proportion of neurons, oligodendrocytes and astrocytes under conditions of proliferation and differentiation. On the other hand, the response of the JAK-STAT and WNT signalling pathways in response to gamma interferon is evaluated in a comparative way in the NPCs derived from the three phenotypes WT, TLR2 and TLR4 KO.

The results obtained showed that the absence of TLR2 and TLR4 has an influence on the process of differentiation of spinal cord NPCs, increasing the number of neural precursors, with a limited response of the JAK/STAT and WNT pathways in the presence of gamma interferon.

TLRs are involved in the correct activation of WNT pathway via ERK and JAK/STAT pathway in terms of the differentiation process.

KEY WORDS: Toll-like receptors, neural progenitor cells, TLR2 knockout, TLR4 knockout, JAK/STAT pathway and WNT pathway.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Receptores tipo Toll (TLRs)	1
1.2. Receptores tipo Toll en precursores neurales (NPCs) del sistema nervioso	5
1.3. Las vías de señalización JAK-STAT y WNT y su relación con TLRs en NPCs	7
1.3.1. Influencia de estas vías en la diferenciación de NPCs de médula espinal .	10
2.HIPÓTESIS.....	13
3.OBJETIVOS.....	15
4.MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1. Extracción y cultivo primario de NPCs de ratón.....	17
4.1.1. Experimento de diferenciación	18
4.1.2. Activación con Interferón gamma	19
4.2. Inmunocitoquímica	19
4.3. Extracción y cuantificación de proteínas	21
4.4. Western Blot-SDS PAGE	22
4.5. Software de análisis de resultados	24
4.5.1. Cuantificación celular	24
4.5.2. Densitometría de bandas	25
4.6. Análisis estadístico.....	25
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1. La expresión de TLR2 y TLR4 afecta a la diferenciación de los NPCs derivados de médula espinal neonatal de ratón	27
5.2. La fosforilación de STAT3 y astrogliogénesis	32
5.3. La influencia de los TLRs en las vías de señalización JAK-STAT y WNT.....	35
5.3.1. Proteínas involucradas en la ruta JAK-STAT por Western blot	35
5.3.2. Proteínas involucradas en la ruta WNT por Western blot	38
6.CONCLUSIONES.....	43

7.LÍNEAS FUTURAS.....	45
8.BIBLIOGRAFÍA.....	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Receptores tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll (TLRs) pertenecen a una familia de receptores que fueron por primera vez identificados a raíz del descubrimiento de la proteína Toll en *Drosophila melanogaster* (Anderson *et al.*, 1985) . A su vez, son la primera clase de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que fue identificada (Chen *et al.*, 2019), lo que significa que tienen un papel esencial en la activación de la inmunidad innata y por consiguiente la activación de la respuesta inmunológica adaptativa, al reconocer y unirse a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Heiman *et al.*, 2014) , como son los carbohidratos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) y patrones moleculares endógenos asociados al daño (DAMP) como la fibrina (Akira *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2019; Lehnardt, 2010).

Hasta ahora han sido identificados diez miembros de la familia de TLRs en humanos y doce en ratones, siendo del TLR1 al TLR9 expresados en ambos, TLR10 únicamente en humanos y TLR11, TLR12 y TLR13 solo en ratones (Roach *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los Receptores Tipo Toll (TLRs). Elaboración propia.

Tipo	Especies	Localización	Ligando	Adaptador
TLR1	Humano, ratón	Membrana plasmática	Lipopéptidos triacilados	MyD88-TIRAP
TLR2	Humano, ratón	Membrana plasmática	Lipopéptidos triacilados, quitina, porinas, glicolípidos	MyD88-TIRAP
TLR3	Humano, ratón	Endolisosoma	ARN de doble cadena (virus)	TRIF
TLR4	Humano, ratón	Membrana plasmática	Lipopolisacáridos	MyD88-TIRAP; TRIF-TRAM
TLR5	Humano, ratón	Membrana plasmática	Flagelina	MyD88
TLR6	Humano, ratón	Membrana plasmática	Lipoproteínas diaciladas	MyD88-TIRAP
TLR7	Humano, ratón	Endolisosoma	RNA de cadena simple (ricos en GU)	MyD88
TLR8	Humano, ratón	Endolisosoma	RNA de cadena simple (ricos en GU y AU)	MyD88
TLR9	Humano, ratón	Endolisosoma	ADN no metilado con motivos CpG	MyD88
TLR10	Humano	Endolisosoma	Desconocido	MyD88
TLR11	Ratón	Membrana plasmática	Flagelina y profilina	
TLR12	Ratón	Endolisosoma	Profilina	
TLR13	Ratón	Endolisosoma	ARN ribosomal 23S	

Los TLRs son glicoproteínas compuestas por dos dominios principales: uno de ellos formado por repeticiones ricas en leucina (LRR) y el dominio del receptor Toll/interleucina-1 (TIR). Cuando se produce la unión de un ligando, este último dominio produce un cambio conformacional que lleva a iniciar la cascada de señalización intracelular a través de interacciones con adaptadores, los cuales son reclutados (Kawai & Akira, 2005). Una vez ocurre esto, se activa la expresión de gran cantidad de genes imprescindibles en la respuesta inflamatoria y la producción y liberación de citoquinas y quimioquinas dependientes del Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) (Heiman *et al.*, 2014).

La activación de la señalización de los TLRs está mediada por cinco adaptadores (Figura 1): la proteína adaptadora del factor de diferenciación mieloide-88 (MyD88), TRIF (*TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon- β*), TIRAP, TRAM y SARM1. Todos ellos contienen el dominio TIR, y es a través de las interacciones de estos dominios de los TLRs y de sus adaptadores, como tiene lugar la activación de la señalización (O'Neill & Bowie, 2007). Una vez tiene lugar esta unión, los TLRs forman homo- o heterodímeros y de esta manera se inician las vías dependientes de MyD88 y TRIF. Estas dos proteínas pueden unirse directamente al TLR o hacerlo de manera indirecta a través de TIRAP o TRAM. (Chen *et al.*, 2019). La vía dependiente de MyD88 es la responsable de la mediación de la mayoría de las señales de los TLRs, excepto TLR3 que siguen la vía dependiente de TRIF, y de la señalización del dominio del receptor de la interleucina-1 (IL-1) (Liu *et al.*, 2016). Los TLR4 son los únicos dentro de la familia de TLRs capaces de llevar a cabo la señalización a través de las dos vías, tanto la de MyD88 como la de TRIF.

Como se puede observar en la figura 1, la vía dependiente de MyD88 da lugar a la activación de las proteínas quinasas IRAK (IRAK1 y IRAK4), importantes mediadoras de la señalización que a través la fosforilación de TRAF6 dan lugar a la activación de diversos factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, Factor de Regulación del Interferón I (IRFs) y de MAPK, y una vez se encuentran activados pueden ser translocados al núcleo favoreciendo así la transcripción de genes que participan en la inflamación como COX2, iNOS y citoquinas como IL1 β (Leulier & Lemaitre, 2008; Heiman *et al.*, 2014).

Por otro lado, la vía dependiente de TRIF tiene lugar en los endosomas y la llevan a cabo únicamente los TLRs tipo 3 y 4 produciendo una respuesta a través del Factor 6 asociado al receptor del TNF (TRAF6), TRAF3 y la proteína quinasa 1 (RIP1). Esto provoca la activación del Factor de Regulación del Interferón 3 y 7 (IRF3 y IRF7) mediante su fosforilación, los cuales podrán ser translocados al núcleo donde favorecen la activación de NF- κ B y transcripción de citoquinas (O'Neill & Bowie, 2007; Luo *et al.*, 2019; Lacagnina *et al.*, 2018). El TLR4 utiliza el adaptador TRAM como puente para unirse a TRIF, el cual se encuentra en la membrana de los endosomas (Fitzgerald *et al.*, 2003).

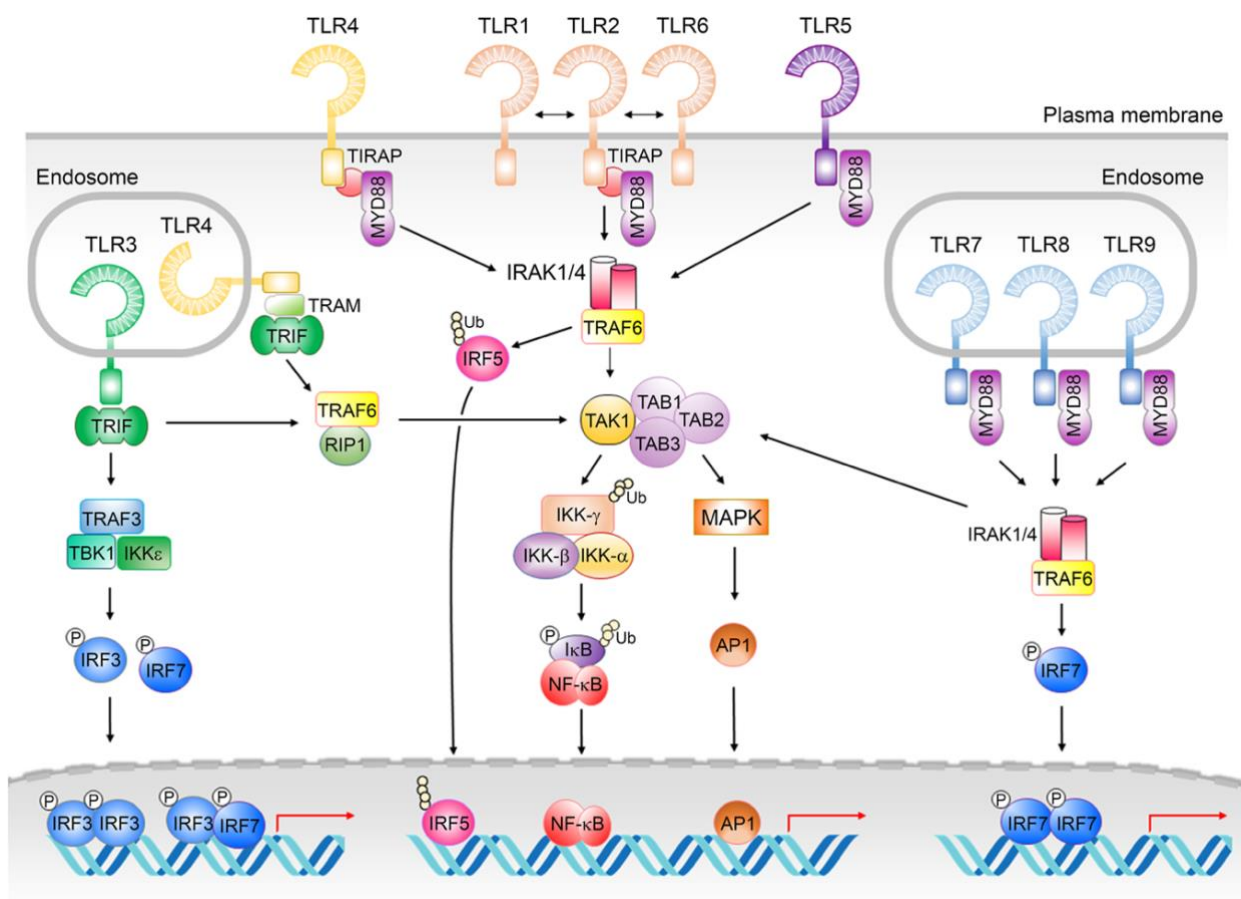


Figura 1. Vías de señalización de los diferentes tipos de TLRs. Figura obtenida de (Chen *et al.*, 2019).

Los del tipo 2 se encuentran en la membrana plasmática y se reúnen dando lugar a heterodímeros junto con TLR1 o TLR6 (Takeuchi *et al.*, 2002; Okun *et al.*, 2010), lo que les otorga una mayor especificidad de los ligandos (Lacagnina *et al.*, 2018). Estos heterodímeros provocan el inicio de la señalización intracelular dependiente de MyD88, el cual mediante el adaptador TIRAP activa las quinasas IRAK y continúa la señalización previamente descrita culminando con la activación de diversos factores de transcripción.

Por otro lado, el TLR4 fue el primero de la familia en ser identificado en mamíferos, y el más estudiado de todos (Medzhitov *et al.*, 1997), debido a que es el único cuya señalización puede seguir la vía dependiente de MyD88 o TRIF utilizando como intermediarios TIRAP o TRAM respectivamente. El ligando clásico de este tipo de receptores son los lipopolisacáridos (LPS), se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas (Strain *et al.*, 1983). Con la unión de estos ligandos, se inicia una serie de reacciones moleculares que acaban provocando la activación de NF-κB, MAPK, AP-1 o del Factor de Regulación del Interferón (IRF) y culminando con la

transcripción de los mediadores inflamatorios como IL-6 o IL-1 β (Hori & Nishida, 2008; Heiman *et al.*, 2014; Lacagnina *et al.*, 2018; Medzhitov *et al.*, 1998).

1.2. Receptores tipo Toll en precursores neurales (NPCs) del sistema nervioso

Tanto la activación de los TLR4 como la activación de los heterodímeros de TLR2 se ha comprobado que afecta a la proliferación de las NPCs en adultos, llevando a la secreción de citoquinas proinflamatorias (Okun *et al.*, 2010). Tal y como se representa en la figura 2, ambos tipos de TLRs muestran funciones opuestas en la proliferación y diferenciación de estas. Mientras que una ausencia en TLR2 provoca una disminución de la neurogénesis y única producción de astrocitos, una disminución en TLR4 muestra mayor proliferación y diferenciación neuronal (Rolls *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Shechter *et al.*, 2008 se demuestra que el TLR4 tiene un efecto regulador negativo sobre la proliferación de células progenitoras de la retina (RPCs). Una deficiencia de este tipo de TLR en ratón mostró una mayor proliferación de RPCs.

En hipocampo, se ha demostrado que la deficiencia de TLR2 perjudica a la neurogénesis, mientras que la deficiencia de TLR4 provoca un aumento en la proliferación y diferenciación neuronal. Se observó también que ambos tipos regulaban el destino y autorenovación celular de las NPCs (Rolls *et al.*, 2007).

En cuanto a NPCs humanas, los TLRs 2 y 4 se encuentran expresados. La activación de los TLR4 a través de lipopolisacáridos lleva a la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos y a su supervivencia, mientras que, si estos son inhibidos por un antagonista, se promueve la muerte celular o apoptosis (Grasselli *et al.*, 2018).

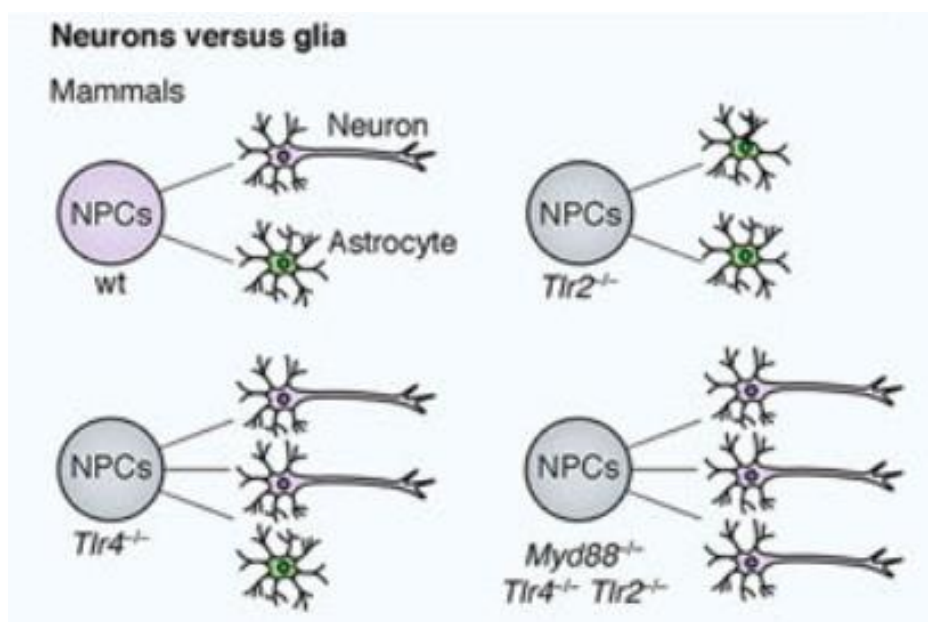


Figura 2. Esquema de las posibles diferenciaciones de cada fenotipo en estudio: WildType, TLR2 knockout y TLR4 knockout en células precursoras neurales del cerebro. Figura obtenida de (Anthony *et al.*, 2018).

Las células precursoras neurales (NPCs) derivadas del canal endimario de la médula espinal, son células ciliadas que se disponen formando una capa delgada expuestas al cuarto ventrículo de la médula espinal. Son estos cilios lo que les permite mantener y controlar el flujo del líquido cefalorraquídeo (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001; Moreno-Manzano, 2020; Sabelström *et al.*, 2014). El desarrollo de estas células y su diferenciación dan lugar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Nicolas *et al.*, 2013). La determinación del destino de las NPCs, así como su diferenciación requieren de la señalización de los TLRs, los cuales se ha visto que se encuentran implicados en la neuroinflamación asociada a un gran número de condiciones neurológicas y neurodegenerativas del Sistema Nervioso Central (Heiman *et al.*, 2014; Anthony *et al.*, 2018). Numerosos estudios demuestran la relevancia de su función de protección y defensa del organismo a través del inicio de cascadas de señalización inflamatorias en respuesta a lesiones, infección y estrés en neuronas, astrocitos y microglía (Lacagnina *et al.*, 2018; Okun *et al.*, 2010).

Ante una lesión de la médula espinal, las NPCs proliferan y se diferencian dando lugar en la mayor parte a astrogliá y en una menor proporción a neuronas y oligodendrocitos, es por ello por lo que se dice que son una vía importante de regeneración del sistema nervioso central. Es esa astrogliá, a la que se le denomina astrogliá reactiva, que da lugar a la cicatriz glial que se forma alrededor de la lesión de

la médula espinal (Okano *et al.*, 2005). Los astrocitos reactivos producen gran cantidad de cambios en la expresión de genes en respuesta a estas lesiones, principalmente encontramos la Proteína Fibrilar Glial Ácida (GFAP) como marcador de este aumento de expresión (Han-Chung *et al.*, 2016).

En definitiva, no existen precedentes a cerca de la función que este tipo de receptores ejercen sobre las NPCs de la médula espinal.

1.3. Las vías de señalización JAK-STAT y WNT y su relación con TLRs en NPCs

Ruta de señalización dependiente de JAK-STAT

La ruta JAK-STAT debe su nombre a las dos familias de proteínas que se encuentran involucradas: las quinasas Janus (JAK) y el Transductor de Señal y Activador de la Transcripción (STAT). Las primeras engloban cuatro tirosinas quinasas (JAK1, JAK2, JAK3 Y TYK2), mientras que las segundas agrupan a siete factores de transcripción (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B Y STAT6) (Nicolas *et al.*, 2013; Laurence *et al.*, 2012).

Como se puede ver en la figura 3, la activación de la ruta JAK-STAT mediante la unión de un ligando, ya sean hormonas, factores de crecimiento o citoquinas como Interferón gamma (IFN γ) e Interleucina-6 (IL-6) (Kisseleva *et al.*, 2002; Han-Chung *et al.*, 2016), al receptor en la membrana plasmática, da lugar al reclutamiento de las proteínas JAK produciendo su activación y la fosforilación de los STATs, los cuales forman un dímero que puede ser translocado al núcleo para unirse a las secuencias de ADN y activar así la expresión de genes (Tapia *et al.*, 2017; Nicolas *et al.*, 2013).

Existen diferentes mecanismos que permiten controlar la actividad de esta vía, como el estado de fosforilación de las proteínas JAK y STAT o la actividad quinasa de JAK (Nicolas *et al.*, 2013).

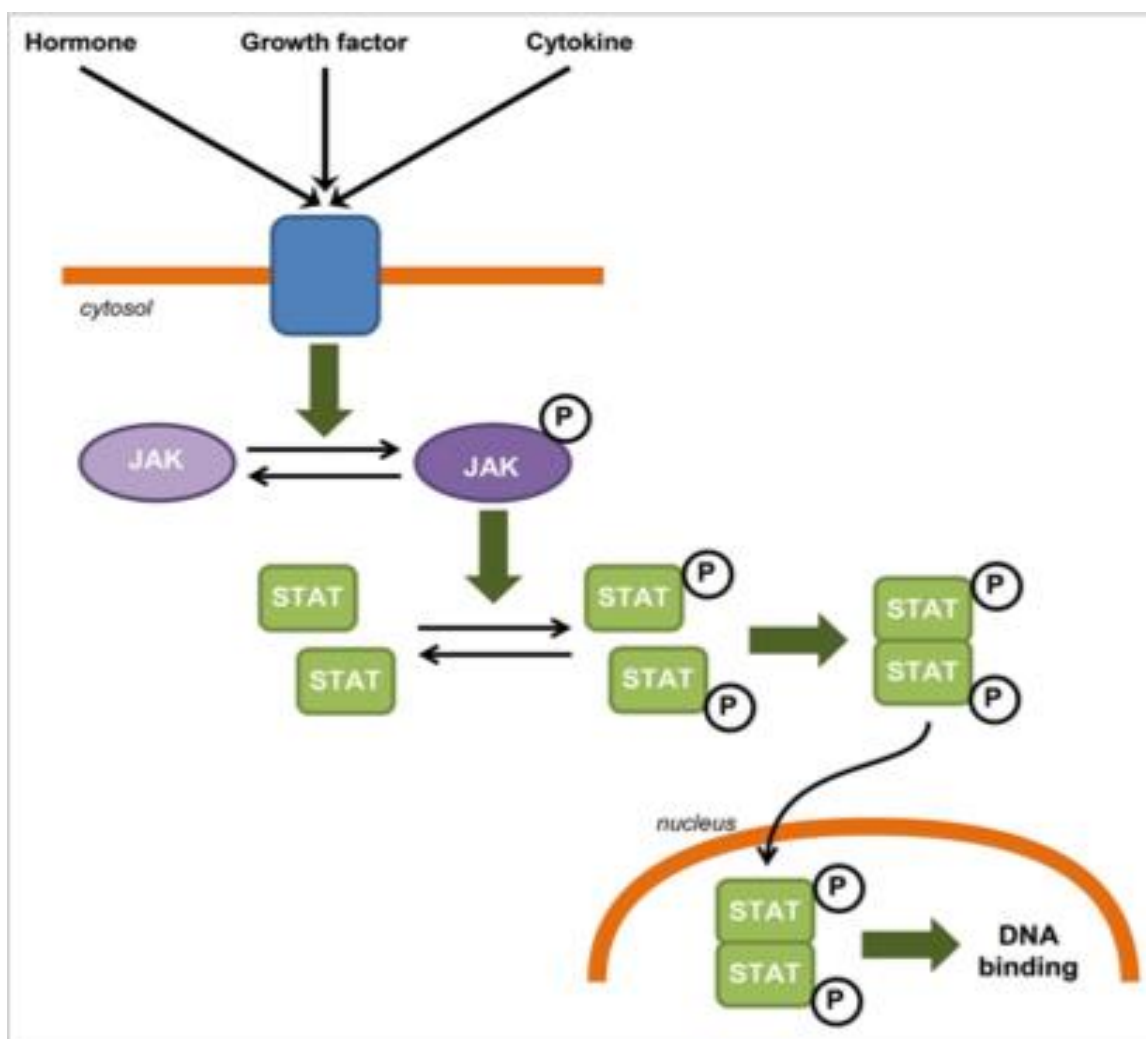


Figura 3. Esquema de la vía de señalización JAK-STAT: mediante la unión del ligando al receptor se produce la fosforilación de las proteínas JAK y consiguiente fosforilación y dimerización de las STATs, las cuales son translocadas al núcleo para la activación de la transcripción de genes. Figura obtenida de (Nicolas et al., 2013).

Estudios previos han demostrado que la activación de la ruta JAK-STAT está asociada con la formación de la cicatriz glial en lesión de la médula espinal, así como la regeneración de axones y por tanto, su papel protector (WANG *et al.*, 2015). Concretamente, se ha demostrado que STAT3 se encuentra activada en zonas de lesión con astrocitos reactivos (Yao, 1997) , jugando un papel esencial en la formación de la cicatriz y frenando la inflamación (Streit *et al.*, 1998). Por todo ello, la presencia de NPCs en la médula espinal incrementa la capacidad de esta para regenerarse ante posibles lesiones (Horner *et al.*, 2000).

Vía de señalización intracelular de la ruta de WNT

La vía de señalización WNT se puede dividir en dos tipos: la ruta canónica y la no canónica dependiendo de cual es el ligando que la activa (Figura 4). En la ruta canónica o dependiente de β -catenina, cuando el ligando de WNT se une al receptor *Frizzled* (Fzd), se produce la unión entre este y el *Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6* (LRP5/6) (MacDonald & He, 2012) formando un complejo que se une a la β -catenina y permite su translocación al núcleo, donde al unirse al factor de transcripción nuclear LEF/TCF forman un complejo que activa la expresión de genes que participan en la proliferación y diferenciación celular. Cuando no hay un ligando de WNT esta ruta se encuentra inactiva y la β -catenina es entonces degradada en el citoplasma por la Glicógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3) y la caseína quinasa 1 mediante una serie de fosforilaciones y ubiquitinaciones (Gao *et al.*, 2020).

Por otro lado, las rutas independientes de la presencia de la β -catenina se llaman rutas no canónicas, y estas inactivan la ruta canónica. En la vía Wnt/PCP se produce la interacción del ligando WNT y los receptores Fzd provocando la activación de Guanosin Trifosfatasas (GTPasas), quinasas RhoA, Rac y las quinasas Jun (JNK). La vía WNT/Ca²⁺ activa, mediante ligandos Fzd y el Factor Nuclear de las células T activadas (NFAT), la señalización de la proteína G, regulando así el destino celular (Gao *et al.*, 2020).

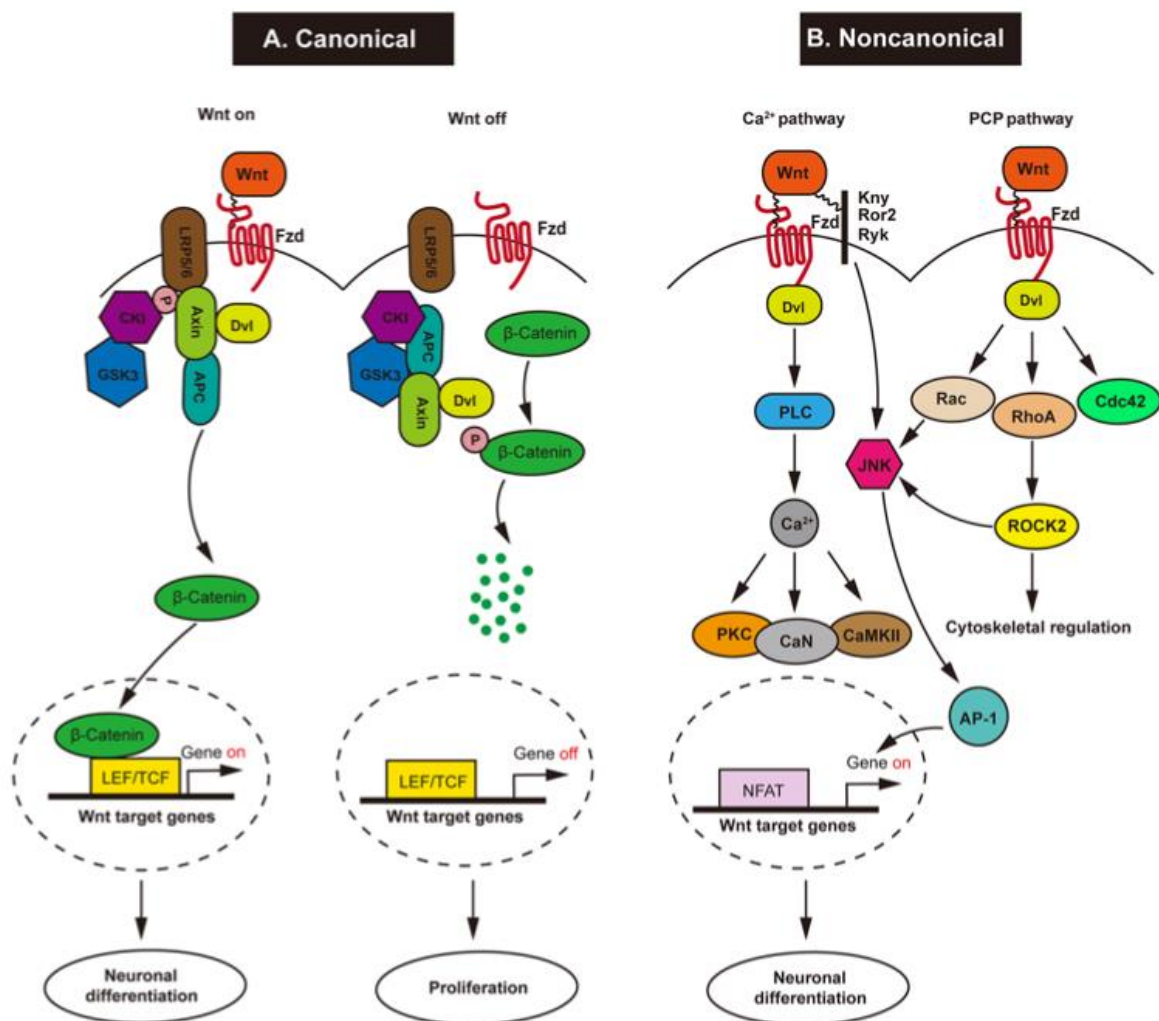


Figura 4: Diagrama de la ruta de señalización WNT: ruta canónica y no canónica. Figura obtenida de (Gao et al., 2020)

1.3.1. Influencia de estas vías en la diferenciación de NPCs de médula espinal

Tanto la vía de señalización JAK-STAT como la WNT se ha demostrado que tienen funciones sobre la proliferación y diferenciación de las NPCs (Wang et al., 2015), y es que estos son eventos muy importantes en la regeneración de lesiones de la médula espinal (Yun Hee et al., 2010).

La vía de señalización WNT media la proliferación y diferenciación de las NPCs, pero a diferencia de la vía JAK-STAT, WNT lo hace a través de la proteína β-catenina. Es una vía fundamental para mantener la homeostasis de estas células (Shitasako et al., 2017), gracias a lo cual permite que exista un equilibrio entre la proliferación y diferenciación neural, cuando esto no es así resulta en numerosas patologías

neurológicas (Noelanders & Vleminckx, 2017). Además, su activación tras una lesión en la médula promueve su regeneración (Gao *et al.*, 2020).

La ruta JAK-STAT frente a lesiones de la médula espinal promueve la astrogliogénesis, es decir, la diferenciación de las NPCs en astrocitos. Esto ocurre mediante la activación del receptor del factor neutrófico ciliar (CNTF) que por consiguiente activa JAK1, STAT1 y STAT3. Estudios demuestran que STAT3 realiza un papel importante en la diferenciación glial dando lugar a astrocitos (Wang *et al.*, 2015; Bonni *et al.*, 1997). La activación de STAT3 se produce a través de gp130, un complejo de receptores de membrana capaz de producir la transducción de señales de citoquinas como IL-6. Gp130 activa JAK que a su vez fosforila STAT3 permitiendo su translocación al núcleo (Nakashima *et al.*, 1999).

Como vemos representada en la figura 5, ambas rutas se encuentran relacionadas en la diferenciación neural en el cerebro. La ruta JAK-STAT promueve la gliogénesis, es decir, la diferenciación de las NPCs a astrocitos, mientras que la activación de la señalización de WNT da lugar a la formación de neuronas.

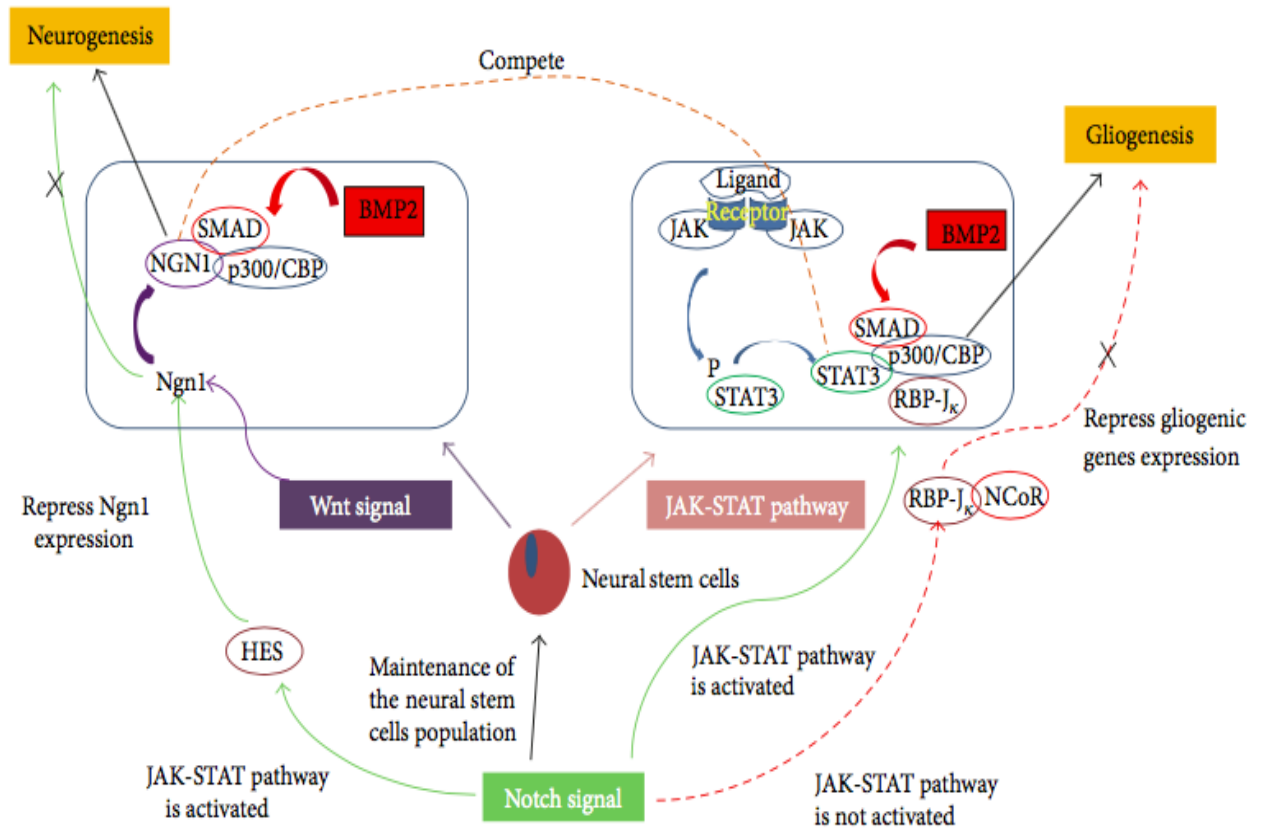


Figura 5. Relación entre las vías de señalización JAK-STAT y WNT en diferenciación de NPCs.
 Figura obtenida de (Lee et al., 2016)

2. HIPÓTESIS

Miembros de la familia de los TLRs, independientemente de su papel en la regulación de la respuesta innata a estímulos propios o adquiridos frente a patógenos, poseen un papel reconocido en procesos de neurogénesis en precursores neurales (NPC) de cerebro. Estos procesos están asociados a una intervención en la capacidad de autorenovación de los nichos neurogénicos, así como en los procesos de diferenciación. Sin embargo, no existen antecedentes en la bibliografía que extrapolen estos procesos a los NPC de la médula espinal y, por otro lado, los mecanismos moleculares que intervienen en estos procesos no están bien definidos. La médula espinal postnatal y adulta, de ratón, y sus precursores neurales, expresa TLR2 y 4, descrito por el trabajo previo de nuestro grupo de investigación (datos no publicados) y podrían contribuir al mantenimiento de este nicho neurogénico y a su especificación celular tal y como ocurre en cerebro. Ya que las rutas de señalización JAK/STAT y WNT están implicadas en los procesos anteriormente mencionados en NPCs, nuestra hipótesis de trabajo se fundamenta en la implicación de estas rutas como vías alternativas a las clásicamente asociadas a la respuesta innata en la activación de TLR2 o 4 en los NPCs de médula espinal.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la implicación de los TLR2 y 4, en los procesos de diferenciación de NPCs derivados de médula espinal de ratón, y su relación con las vías de señalización dependientes de JAK/STAT y WNT, y la relación entre ambas.

Para el desarrollo experimental del objetivo principal se plantean los siguientes objetivos concretos empleando NPCs derivados de médula espinal de ratones neonatos *wildtype* (WT), TLR2 *knockout* (KO2) y TLR4 *knockout* (KO4):

- Estudiar la proporción de cada linaje neural (neuronas, oligodendrocitos y astrocitos) en condiciones de proliferación, en presencia de factores tróficos, y de diferenciación de forma comparativa entre las diferentes líneas transgénicas (KO2 y 4) y su control (WT).
- Evaluar la respuesta de las vías de señalización JAK-STAT y WNT mediante su activación con Interferón gamma en los diferentes genotipos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Extracción y cultivo primario de NPCs de ratón

Previamente a la extracción de las médulas, se preparó una placa Petri en hielo con solución de lavado: DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12) y Penicilina/Estreptomocina dilución 1:25.

Se realizó la extracción de las médulas de ratones C57/BL6 proporcionados por el Dr. S.Akira (Universidad de Osaka, Osaka, Japón) de los fenotipos *Wild Type* (WT), *TLR2 knockout* (KO2) y *TLR4 knockout* (KO4) neonatos (5 a 7 días). Los animales utilizados para este trabajo fueron sacrificados por el personal acreditado con categoría B siguiendo los protocolos aprobados por el comité de cuidado animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Para ello se realizó la disección de la piel y fue retirada. A continuación, se retiró el tejido graso sobre las vértebras y mediante la ayuda de unas pinzas histológicas de punta fina, se sujetó la columna vertebral en la región cervical y con otras pinzas se rompieron y separaron cada una de las vértebras desde la región cervical hasta la región sacra. De esta forma queda expuesta la médula, la cual tras la realización del corte de las uniones que la anclan a las vértebras pudiendo ser extraída. Inmediatamente se colocaron las médulas sobre la placa Petri previamente preparada, y se llevaron a las cabinas de cultivos para trabajar en condiciones estériles.

Se realizaron tres lavados de la médula, para lo que esta se pasó a una nueva placa Petri con solución de lavado de manera que se limpiaron los restos no deseados que pudieran quedar adheridos en la extracción. A continuación, la médula se pasó a otra placa Petri con solución de lavado donde se disgregó mecánicamente utilizando unas tijeras de disección y después con una micropipeta se recogieron todos los trozos de la placa para pasarlos a un tubo Falcon de 15 ml donde se acabaron de disgregar con la ayuda de la micropipeta. Se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, tras lo cual se obtuvo una solución de tres fases. Se descartó el sobrenadante y el pellet formado por restos de células sanguíneas y meninges, mientras que la fase intermedia se recuperó y traspasó a un nuevo tubo Falcon de 15 ml en el que de nuevo se disgregó mecánicamente con la micropipeta. Se añadió 5 ml de solución de lavado y se volvió a centrifugar 5 minutos esta vez a 1200 rpm. Este paso se repite las veces necesarias hasta que quede una interfase limpia y libre de restos. Una vez limpia, esta interfase se resuspendió con 10 ml de medio completo de proliferación y se traspasó a una placa Petri de 60 cm donde se dejaron proliferar durante 4-5 días hasta la formación de neuroesferas. Pasado este periodo se traspasaron a placas en condiciones no

adherentes, placas Ultra Low Attach (ULA), y se mantienen durante una semana en condiciones de proliferación, cambiándole el medio cada 2-3 días hasta tener un cultivo limpio.

Las NPCs se mantienen en condiciones no adherentes en placas con medio de proliferación completo (Tabla 1) en condiciones de 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante para permitir así la formación de neuroesferas. Se realizaron cambios de medio cada dos o tres días.

Tabla 2: Componentes de los medios de cultivo.

Medio completo de proliferación	Medio de diferenciación	Hormona Mix
NeuroCult Basal Medium	DMEM F-12	DMEM F-12
Penicilina/ Estreptomicina (1X)	HEPES (5 mM)	Glucosa (0,6%)
Suplemento de proliferación	NaHCO ₃ (0,1%)	HEPES (5 mM)
Heparina (0,7 U/ml)	Glucosa (0,6%)	NaHCO ₃ (0,1%)
FGF (10 ng/ml)	Penicilina/ Estreptomicina (1X)	Progesterona (0,2 nM)
EGF (20 ng/ml)	L-Glutamina (2mM)	Selenito sódico (0,3 uM)
	Hormona Mix (1X)	Putrescina (0,1 mg/ml)
	Insulina (10 mg/ul)	Apotransferina (0,8 mg/ml)
	FBS (2 g/10ml)	

4.1.1. Experimento de diferenciación

El primer paso realizado el recubrimiento de vidrios redondos con el Matrigel Matrix (Corning) diluído 1:20 en DMEM-F12, este realiza función de sustrato sobre la que quedan adheridas las células. Se dejó gelificar durante una hora a temperatura ambiente y después se separaron los vidrios y colocaron en cada pocillo. Se realizaron dos lavados con DMEM para eliminar los restos de Matrigel.

Se realizó el sembrado de $4 \cdot 10^4$ células/cm², para lo que primero se recogieron las neuroesferas y se disgregaron con Acutasa (*StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent Thermo*) durante 3 minutos a 37°C. Después se añadió DMEM para inactivar la Acutasa y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante dejando el pellet y este se resuspendió con 1 ml de medio de cultivo. Se tiñeron con TripánBlue dilución 1:2 y se contaron las células utilizando la cámara Neubauer. Se sembraron las células y añadió medio completo de proliferación (Tabla 2) sin el factor de crecimiento EGF.

Al día siguiente se realizó un cambio de medio completo sin EGF a medio de diferenciación (Tabla 2) y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante. Se realizaron cambios con el medio de diferenciación cada dos días y tras 7 días de diferenciación espontánea, se eliminó el medio y las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) 4% durante 10 minutos.

4.1.2. Activación con Interferón gamma

Para la realización de este experimento se prepararon placas de 6 pocillos con Matrigel del mismo modo que en el apartado anterior. Se realizó el sembrado de $5 \cdot 10^6$ células por pocillo, para lo que previamente fueron tratadas con Acutasa para disgregar las neuroesferas. Se incubaron en medio completo de proliferación a 37°C, CO₂ al 5% y humedad constante hasta el día siguiente.

Al día siguiente se cambió el medio completo a medio sin factores de crecimiento al que se le añadió el Interferón γ (*Recombinant Murine IFN- γ* ; Referencia: 315-05 de Peprotech) a concentración 100 ng/ml a los diferentes tiempos establecidos. Una vez pasados esos tiempos se paró la activación poniendo las placas en hielo. Se les retiró el medio y se añadió PBS (-Ca/Mg) en cada pocillo. A continuación, se rasparon las células y se recogió cada pocillo en un tubo Eppendorf de 1,5ml. Se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm y 4°C y se aspiró el sobrenadante dejando el pellet en el cual se encuentran las células. Estos tubos se guardaron a -80°C hasta su extracción de proteínas.

4.2. Inmunocitoquímica

Se preparó una cámara húmeda en la cual se colocaron los cubres seleccionados y estos fueron bloqueados con la solución de Triton-100X al 0,1% y *Normal Goat Serum*

(NGS) al 3% en PBS durante 1 hora. Se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario (Tabla 3) a cada uno de los cubres. A su vez se preparó un control negativo en ausencia de anticuerpo primario. Por último, se dejaron durante toda la noche a 4°C.

Tabla 3: *Anticuerpos primarios empleados en la inmunocitoquímica.*

Anticuerpo primario	Especie	Código	Referencia	Dilución
GFAP	<i>Chicken</i>	ab134436	Abcam	1:1000
STAT3	<i>Rabbit</i>	Sc-482	Santa Cruz Biotechnology	1:500
pSTAT3	<i>Mouse</i>	Sc-8059	Santa Cruz Biotechnology	1:500
β Tubulina III (TUJ-1)	<i>Mouse</i>	MO15013	Neuromics, Edina, MN, USA	1:400
OLIG-2	<i>Rabbit</i>	AB9610	Merck Millipore	1:400

Al siguiente día el anticuerpo primario se recogió y se realizaron tres lavados de 5 minutos de PBS 1X de manera que se eliminaron los restos de anticuerpo primario. Se adicionó el anticuerpo secundario (Tabla 4) y se dejó actuar durante 1 hora en oscuridad y temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados de 5 minutos de PBS 1X. Se añadió la tinción fluorescente de núcleos DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) dilución 1:1000 en PBS 1X, dejándola actuar exactamente 5 minutos. El último paso es el montaje de los cubres sobre los portas, para lo que se aplicó una gota de *Fluorsave™ Reagent*, el cual sirve para preservar la fluorescencia.

Tabla 4: Anticuerpos secundarios empleados en la inmunocitoquímica.

Anticuerpo secundario	Código	Referencia	Dilución
Alexafluor 488 goat anti-Mouse	A11001	Invitrogen, USA	1:400
Alexafluor 555 goat anti-Rabbit	A21428	Invitrogen, USA	1:400
Alexafluor 647 goat anti-Chicken	A21449	Invitrogen, USA	1:400

4.3. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas de las células es importante mantener todo a 4°C y preparar el mismo día el tampón de lisis compuesto por Tris-HCl de pH 8 a 50mM, NaCl a 150mM, SDS al 0,1%, NONIDET P-40, DOC al 0,5% y agua destilada. Se realizó con las células activadas con el Interferón. γ reservadas a -80°C.

Se añadió el tampón de lisis en cada tubo, se vorteo y resuspendió mecánicamente con la micropipeta. Se dejó actuar durante 30 minutos en hielo, entre los cuales cada 5 minutos aproximadamente se dio vórtex. Se centrifugaron todos los tubos 10 minutos a 13000 rpm y 4°C y a continuación se recogió el sobrenadante en el cual se encontraban las proteínas. Es importante anotar la cantidad de sobrenadante recogido para su posterior cuantificación.

La cuantificación de las proteínas se realizó por el método BCA (Ácido Bicinconínico), para el cual se utilizó el *BCA Protein Assay Kit* (Referencia: 23227 de *Thermo Scientific*) y una placa de 96 pocillos de fondo plano. En ella se cargó el patrón de BSA (*Bovine Seric Albumine*) (20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3 y 0 mg/mL) y las muestras por duplicado. Se realizó la mezcla del reactivo de BCA según el protocolo de la casa comercial y se añadió a todos los pocillos. Se dejó incubar 30 minutos a 37°C en el *Thermo Shaker* a 300 rpm. Pasado este tiempo se midió la absorbancia de cada pocillo de la placa con el espectrofotómetro (VICTOR) a 570 nm. Con los resultados obtenidos de las absorbancias se obtuvo la concentración mediante regresión lineal utilizando la recta patrón.

4.4. Western Blot-SDS PAGE

Para la preparación de las muestras, se calculó el volumen de cada una de ellas a cargar para obtener una cantidad de 20 μg a la cual se le añadió *el Loading Buffer* correspondiente a cada tubo de muestra y pusieron a hervir a 95°C durante 5 minutos en el *Thermo Mixer* para así desnaturalizar las proteínas. A continuación, se puso en otro tubo Eppendorf la mezcla de muestra y *Loading Buffer* con agua MilliQ estéril según la concentración de cada muestra, para conseguir el volumen final deseado para cargar en los geles. Los tubos ya preparados se reservaron en hielo hasta ser cargados en el gel.

Para la preparación de los geles de electroforesis en primer lugar se montaron los cristales en la plataforma de 1,5mm comprobando que no hubiera fugas. Se preparó primero el gel separador al 10%. La mezcla se añadió con una pipeta Pasteur entre los cristales dejando aproximadamente 1,5 cm para el gel concentrador y se añadió un poco de isopropanol para facilitar su polimerización. Una vez este gelificó, se preparó el gel concentrador a concentración 2,5% de la misma manera, y se añadió esta mezcla hasta el borde habiendo previamente eliminado el isopropanol. Se colocó el peine de 15 pocillos rápidamente y se dejó polimerizar. Cuando el gel ya había polimerizado se retiró el peine y se colocó en el cassette de electroforesis.

Se prepararon el TBS y TBS-T. El TBS compuesto de Tris-Base a 20mM y 150mM de NaCl pH 7,5 y el TBS-T se preparó de la misma forma que el TBS añadiendo 0,1% de Tween.

Se montó la cubeta de electroforesis con el gel y el tampón de electroforesis 1X compuesto por Tris-base a 25mM, glicina a 190 mM, SDS 0,1% y agua MilliQ. A continuación, las muestras se pusieron en el Thermo Mixer a 95°C durante un minuto y luego se les dio un spin. Las muestras y el Marker (*PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*; Referencia: 26619 de *Thermo Scientific*) se cargaron en el gel y entonces se enchufó la cubeta a la fuente de alimentación programándolo a 100V durante 1 hora aproximadamente.

El siguiente paso que se realizó fue la transferencia o *electroblotting*, para lo que previamente se prepararon: el buffer de transferencia, membranas de PVDF y papeles Whatman. El buffer de transferencia está compuesto por Tris 25mM, glicina a 190mM, metanol al 20% y agua MilliQ. La membrana de PVDF se activó con metanol durante 30

segundos. Se añadió el buffer de transferencia a una cubeta donde se realizó el proceso de ensamblaje del cassette en el siguiente orden: ánodo, esponja, 3 papeles Whatman, membrana, Gel, 3 papeles Whatman, esponja y cátodo. Se introdujo el cassette en la cubeta con el buffer de transferencia y se conectó a la fuente de alimentación dejándolo correr a 400mA (al ser dos membranas) durante una hora y media.

Pasado el tiempo de transferencia, se recuperaron las membranas y se colocaron en cubetas pequeñas. Se tiñó la membrana durante 5 minutos aproximadamente en movimiento con Rojo Ponceau y se enjuagó varias veces con agua destilada hasta que las bandas de proteínas eran visibles, para comprobar que la transferencia se había hecho de manera correcta. Después se realizó un lavado con TBS-Tween de 5 minutos para eliminar la coloración. A continuación, las membranas se bañaron en solución de bloqueo (BSA 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente y en movimiento. Y pasado este tiempo las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario en BSA 1% (Tabla 5) durante toda la noche a 4°C en movimiento.

Tabla 5: Anticuerpos primarios empleados en el Western Blot.

Anticuerpo primario	Especie	Código	Referencia	Dilución
STAT1	<i>Rabbit</i>	Sc-346	Santa Cruz Biotechnology	1:300
pSTAT1	<i>Rabbit</i>	Sc-16570-R	Santa Cruz Biotechnology	1:300
STAT3	<i>Mouse</i>	Sc-482	Santa Cruz Biotechnology	1:300
pSTAT3	<i>Mouse</i>	Sc-8059	Santa Cruz Biotechnology	1:300
GSK3b	<i>Mouse</i>	Sc-7291	Santa Cruz Biotechnology	1:200
pGSK3b	<i>Rabbit</i>	8566S	Cell Signaling	1:1000
β Tubulin Loading control	<i>Mouse</i>	MA5-16308- HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
44/42 MAPK (ERK 1/2)	<i>Mouse</i>	Sc-514302	Santa Cruz Biotechnology	1:500
Phospho-44/42 MAPK (pERK 1/2)	<i>Rabbit</i>	4370	Cell Signaling	1:2000

Al día siguiente se recogió el anticuerpo primario y se lavaron las membranas tres veces con TBS-T en movimiento. Se dejaron incubar con el anticuerpo secundario en BSA 1% (Tabla 6) durante una hora en movimiento lento, y tras este tiempo el anticuerpo secundario se retiró y se lavaron las membranas tres veces con TBS-T durante 5 minutos. A continuación, las membranas están listas para ser reveladas, para lo que primero se preparó el sustrato HRP-ECL (*Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate*; Referencia:32132 de *Thermo Scientific*) mezclando sus dos reactivos en proporción 1:50, se cubrieron las membranas con esta solución y se incubaron 2 minutos en oscuridad. Luego se colocaron las membranas en un plástico liso y se introdujeron una a una en el Transiluminador *Alliance Q9 Advance* de Uvitec para obtener las imágenes.

Tabla 6: Anticuerpos secundarios empleados en el Western blot.

Anticuerpo secundario	Código	Referencia	Dilución
Mouse-HRP	sc-2005	Santa Cruz Biotechnology	1:5000
Rabbit-HRP	sc-2004	Santa Cruz Biotechnology	1:20000

Como se continuó con la incubación de más anticuerpos, las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con TBS-Twin y a continuación se incubaron en solución de Stripping (*Restore™ Western Blot Stripping Buffer*; Referencia: 21059 de *Thermo Scientific*) en agitación durante 12 minutos para así eliminar los anticuerpos previos. Tras esto se realizaron otros tres lavados de TBS-T y se repitió el proceso de bloqueo, incubación con anticuerpo primario e incubación con anticuerpo secundario que se ha descrito previamente.

4.5. Software de análisis de resultados

4.5.1. Cuantificación celular

Las imágenes de las células tras la inmunocitoquímica fueron tomadas con el microscopio vertical de fluorescencia (*LEICA DM6000 Vertical*) con el aumento 40X, con los filtros correspondientes para cada fluorescencia.

Para la cuantificar las células se utilizó el programa *ImageJ-Fiji*, con el que se contaron los núcleos con fluorescencia DAPI y las células de los demás marcajes. Las

células contadas como DAPI sirven de valor de número total de células para normalizar los demás valores con otros marcajes.

4.5.2. Densitometría de bandas

Para el análisis de las bandas de proteínas de las membranas se utilizó el programa ImageJ-Fiji. Con él se calculó el área de las intensidades de las bandas y con eso se realizó la normalización con su *house keeping* (beta-3-tubulina).

4.6. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad Prism 8, con el cual se realizó para cada grupo de resultados el análisis estadístico ONE-way ANOVA utilizando el test de comparación múltiple de Tukey y teniendo en cuenta un valor significativo de P-valor menor a 0,05. Representación de todas las gráficas como Media \pm desviación estándar de la media (SEM).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. La expresión de TLR2 y TLR4 afecta a la diferenciación de los NPCs derivados de médula espinal neonatal de ratón

Rolls *et al.*, (2007) demostraron en su estudio que los tipos 2 y 4 de TLRs además de encontrarse presentes en las NPCs derivadas de hipocampos de ratones adultos y llevar a cabo una función esencial en la neurogénesis, intervienen en funciones de proliferación y diferenciación de estas aunque de manera contrapuesta. La ausencia de TLR2 disminuye el proceso de neurogénesis, mientras que la ausencia de TLR4 la aumentaba, dando lugar a una mayor proliferación y diferenciación de neuronas.

En un estudio previo realizado en el laboratorio de Regeneración Neuronal y Tisular con el objetivo mismo de estudiar el efecto de los receptores tipo Toll en la diferenciación de NPCs, se realizó un ensayo de diferenciación espontánea durante 7 días en células de los fenotipos WT, KO2 y KO4. Se realizó el estudio de la proporción de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos marcados con anticuerpos específicos para la detección de la proteína β -Tubulina III (TUJ) como marcador de neuronas tempranas, factor de transcripción de oligodendrocitos (OLIG2) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para el marcaje astrocítico. Los resultados se representaron en las gráficas que se muestran en la figura 6 (Sánchez-Petidier *et al.*, 2017).

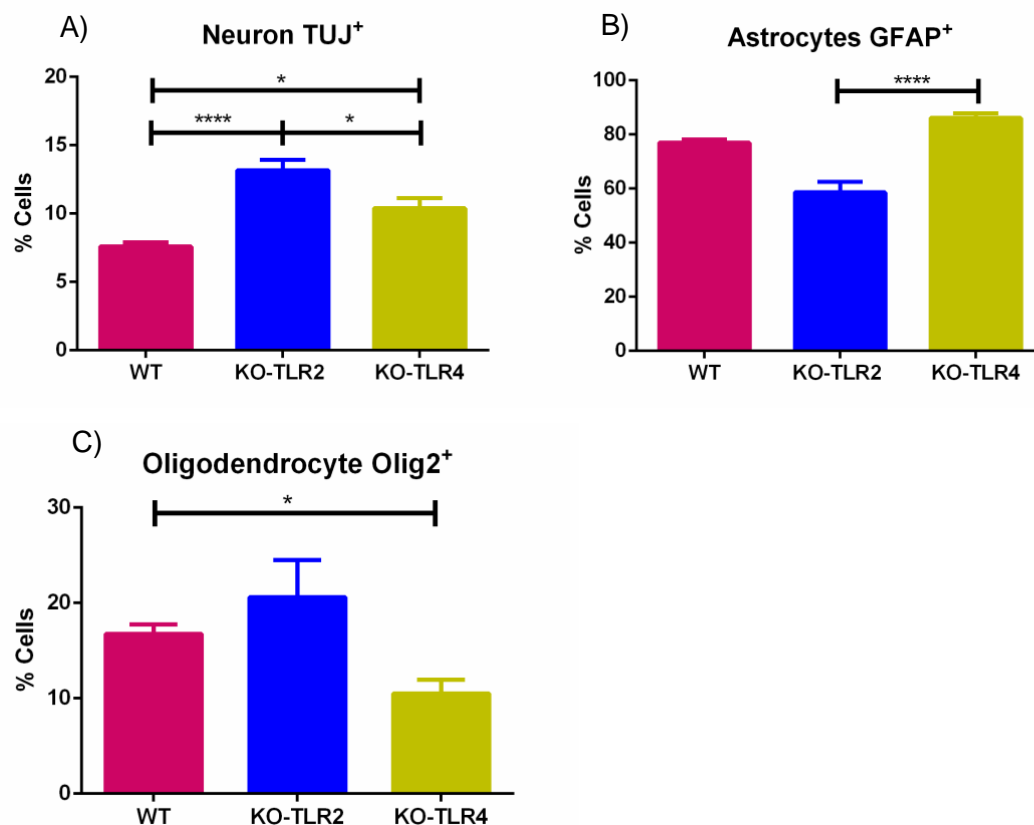


Figura 6. Porcentaje de células marcadas por A) TUJ, B) OLIG2 y C) GFAP en cultivo de NPCs tras una semana de diferenciación en los fenotipos wild-type, TLR2 knockout y TLR4 knockout. La representación se realizó como media \pm SEM. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=6); * p <0,05 (Sánchez-Petidier et al., 2017).

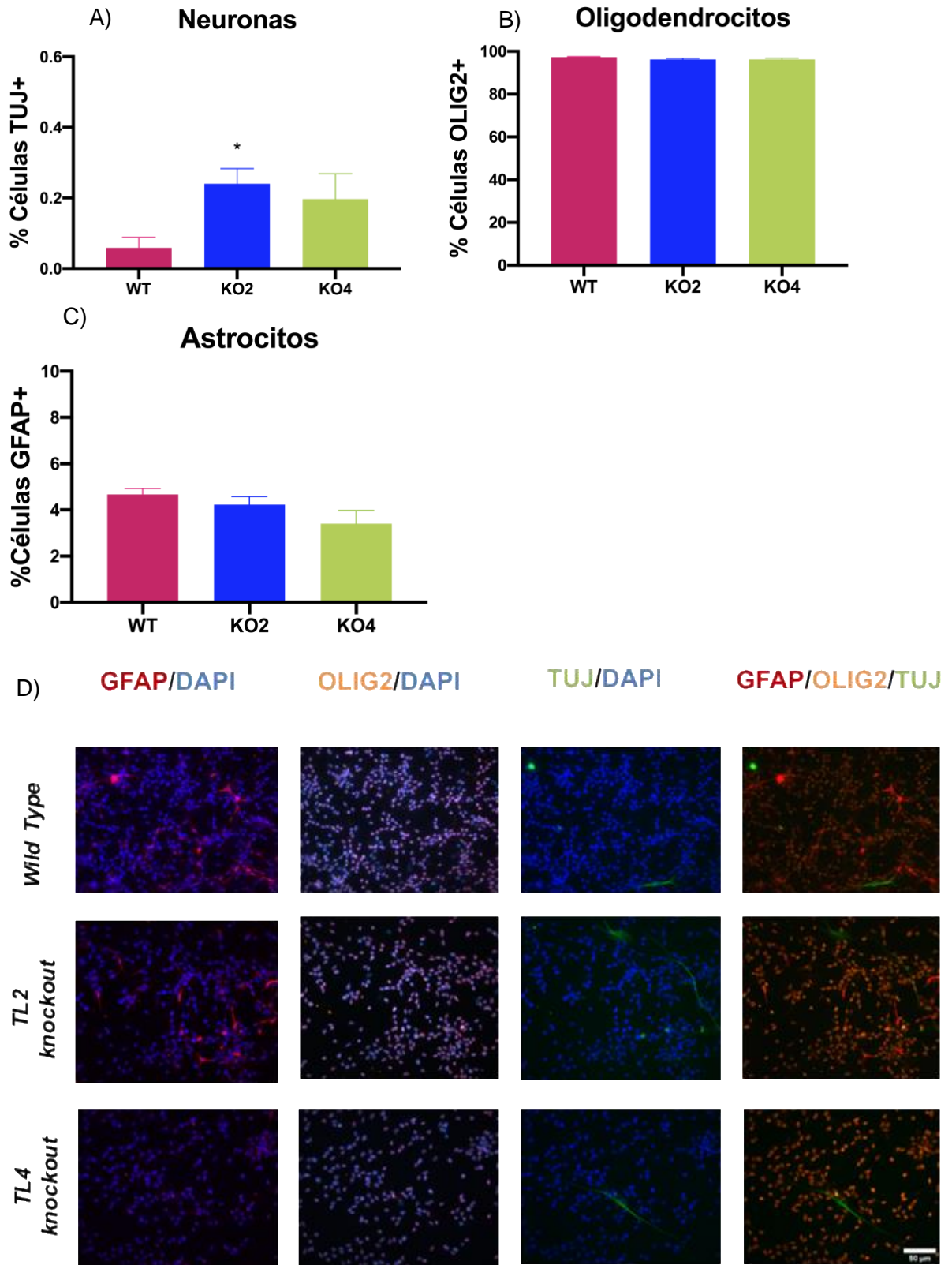
Estos resultados muestran que las NPCs se diferencian en mayor proporción en astrocitos (GFAP⁺), siendo entre el 60-80% del total de células, seguido de los oligodendrocitos (OLIG2⁺) que representan entre el 15-20% del total y en menor proporción las neuronas (TUJ⁺) que tienen un porcentaje de entre 7 y 12% (Figura 6).

La ausencia de TLR2 y TLR4 provoca una mayor diferenciación a neuronas, al menos en su estadio temprano identificado por la expresión de TUJ, con respecto al fenotipo WT, siendo el KO2 el que tiende a diferenciarse en mayor proporción a neuronas (casi el 15%).

En relación con la diferenciación astrocítica, siendo en los tres fenotipos la mayoritaria, existe un incremento significativo en la proporción en KO4 en comparación con KO2. Entre el KO4 y el WT no se aprecian diferencias.

La diferenciación a oligodendrocitos es mayor en KO2 que en WT y KO4, teniendo este último una proporción significativamente menor que el WT.

En vista de estos resultados, se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con los mismos marcadores en condiciones de proliferación en presencia de factores de crecimiento (figura 7) para los tres fenotipos y así compararlos con los resultados obtenidos tras la diferenciación.



E)

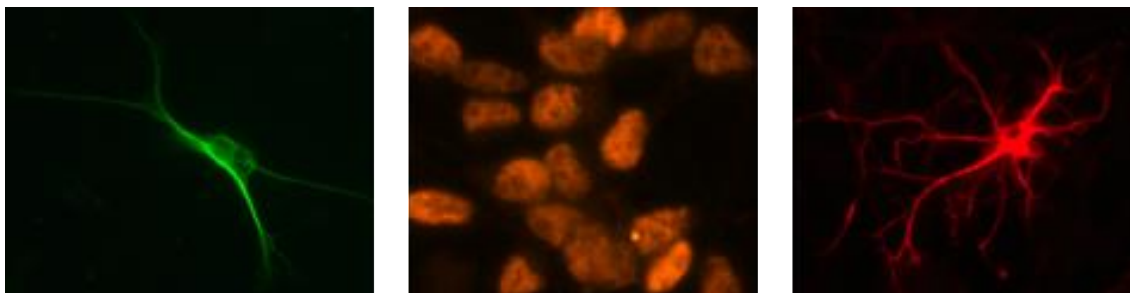


Figura 7. Representación gráfica de la proporción de A) neuronas (TUJ+), B) oligodendrocitos (OLIG2+) y C) astrocitos (GFAP+) en un ensayo de inmunocitoquímica con NPCs en proliferación. Test estadístico ONE-way ANOVA (N=2); * $p < 0,05$ versus la condición WT. D) Imágenes de la inmunofluorescencia a 40X. E) Imágenes de cada tipo celular: neurona (verde), oligodendrocitos (naranja) y astrocitos (rojo).

Como se puede observar en las gráficas de la figura 7, en condiciones de proliferación, los tres fenotipos tienen un marcaje mayoritario de precursor de oligodendrocitos mayor al 90% sin mostrar ninguna diferencia entre ellos. Lo mismo ocurre con el marcaje de astrocitos, el cual representa un porcentaje de entre el 3 y 5% para los tres fenotipos sin mostrar diferencias significativas entre ellos, aunque se puede apreciar una menor proporción en el KO4.

En cuanto al marcaje de neuronas, sí que existe un incremento significativo en la proporción de KO2 con respecto al WT. El KO4 también se ve incrementado pero no de manera significativa.

Por otro lado, se analizó la proporción de dobles marcajes positivos de las células y se encontró un doble marcaje OLIG⁺-GFAP⁺, representado en la figura 8. No se encontraron marcajes doble positivos con TUJ. Se muestra una diferencia significativa en una disminución del KO4 con respecto al WT. Comparando los resultados de GFAP⁺ de la figura 7, observamos que la totalidad de marcaje para astrocitos que encontramos es OLIG⁺ también.

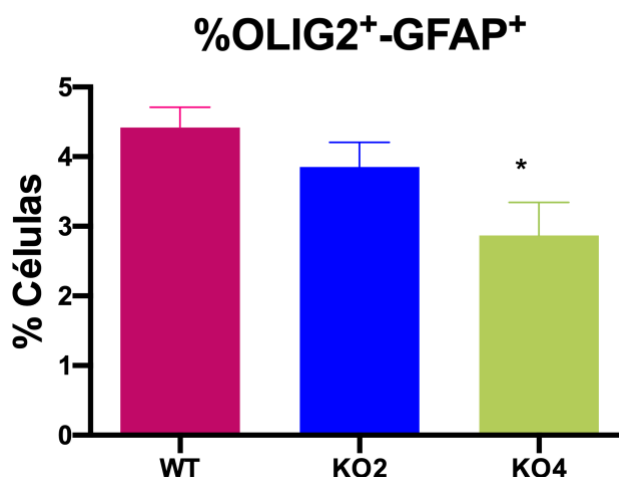


Figura 8. Representación gráfica del porcentaje de células marcadas doblemente por OLIG2 y GFAP en los tres fenotipos. Test estadístico ONE-way ANOVA (N=2); * $p < 0,05$ versus la condición WT.

Los resultados obtenidos indican que los receptores tipo Toll tienen una influencia sobre el proceso de diferenciación en NPCs derivadas de la médula espinal. No obstante, estos resultados no indican que estos receptores estén implicados de manera directa si no que podrían estar alterando otras rutas que si se han demostrado que regulan la diferenciación de NPCs (Young *et al.*, 2013; Bengoa-Vergniory & Kypta, 2015).

5.2. La fosforilación de STAT3 y astrogliogénesis

En el siguiente experimento se estudió la existencia de una relación entre los TLRs y la activación de la ruta JAK-STAT a través del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y la diferenciación de NPCs a astrocitos.

Bonni *et al.* (1997) fueron los primeros en estudiar el papel de la ruta JAK-STAT y la astrogliogénesis, confirmando que la activación de STAT3 y STAT1 a través de JAK1 y JAK2 inducía diferenciación de las NPCs en astrocitos.

Se realizó un ensayo de inmunocitoquímica con NPCs diferenciadas tras una semana de los fenotipos WT, KO2 y KO4. Para ello fueron incubadas con los anticuerpos pSTAT3, STAT3 y GFAP, permitiendo ver así el nivel de fosforilación de STAT3 y la proporción de astrocitos marcados por STAT3 tras una semana de diferenciación. Los resultados se encuentran representados gráficamente en la figura 9.

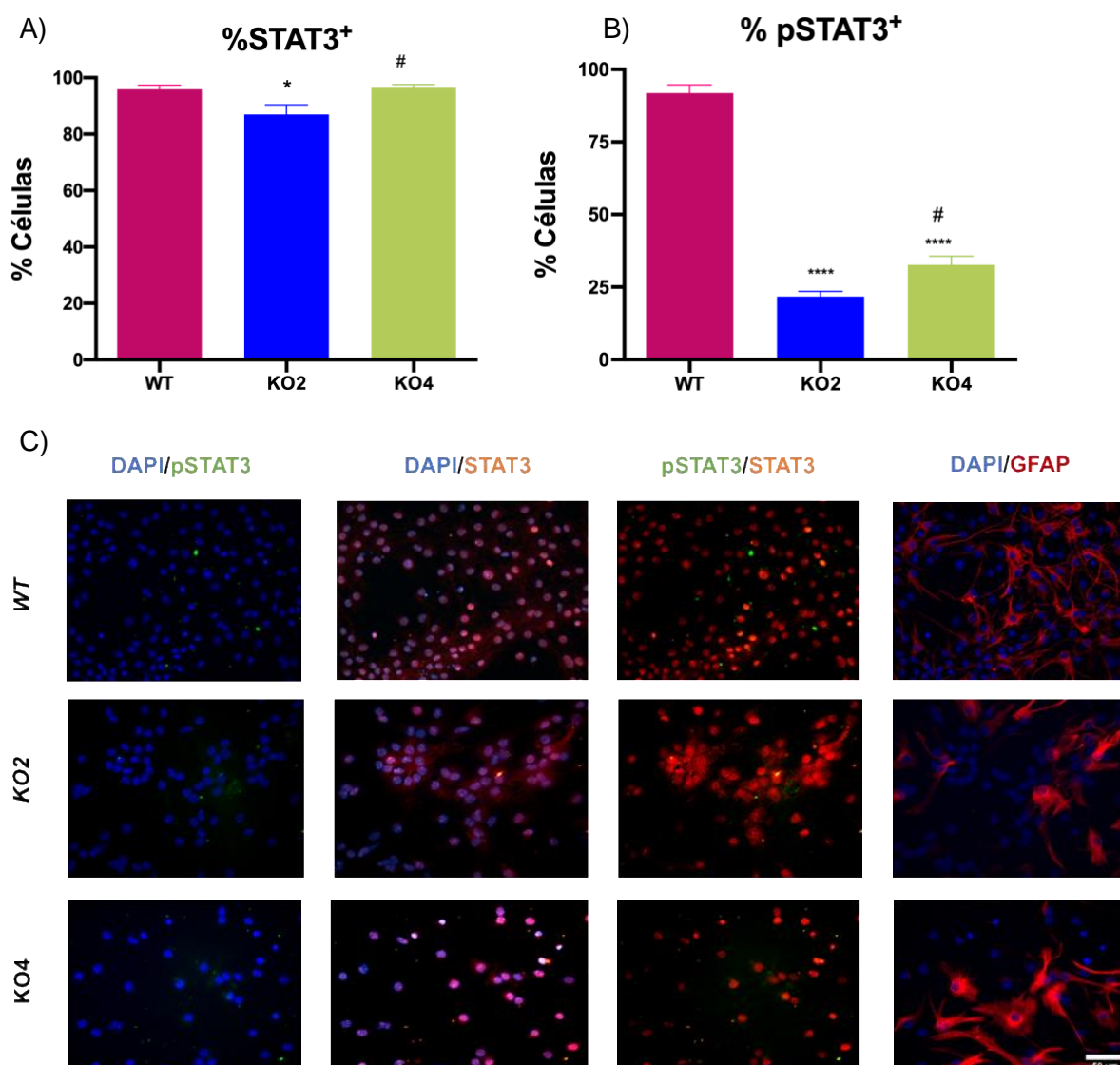


Figura 9. Representación gráfica de la proporción de NPCs marcadas por A) STAT3 y B) pSTAT3 tras una semana de diferenciación para los fenotipos Wild-type, TLR2 knockout y TLR4 knockout. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=1); * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus la condición WT; # $p < 0,05$ versus la condición KO2. C) Imágenes de la inmunofluorescencia a 40X.

Como se puede ver en la figura 9, en cuanto al porcentaje de NPCs marcadas por STAT3 observamos que las células del KO2 muestran una proporción significativamente menor que el WT y el KO4 tiene un mayor porcentaje de células marcadas (casi del 100%) que el KO2. Sin embargo, existen diferencias significativas en la proporción de STAT3 fosforilado (Figura 9, B) de KO2 y KO4 con respecto al WT. Mientras que en este el porcentaje alcanza casi el 100%, en los KOs se encuentra entre el 20 y 40%.

Por otro lado, se analizó el ratio de fosforilación de STAT3 representado en la figura 10. Se observó que en el WT existía una fosforilación de STAT3 del 100%, sin embargo en los dos KOs esta fosforilación se encontraba entre el 25 y 30%.

La fosforilación de STAT implica su dimerización y traslocación al núcleo lo que permite la activación de genes implicados en la proliferación y diferenciación de las NPCs (Battle & Frank, 2005).

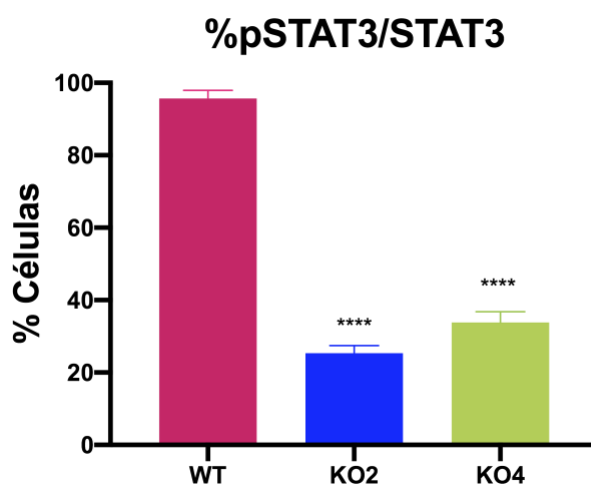


Figura 10. Representación gráfica del porcentaje de NPCs marcadas por STAT3 y pSTAT3 en los fenotipos Wild-type, TLR2 knockout y TLR4 knockout. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=1); ****p<0,001 versus la condición WT.

Por último, en la figura 11, se muestra el porcentaje de astrocitos que presentan marcaje de STAT3. Entre los fenotipos no se encuentran diferencias significativas, a pesar de que sí que se observa que en el WT casi el 100% de células se encuentran doblemente marcadas, es decir, que todos los astrocitos expresan el marcador STAT3.

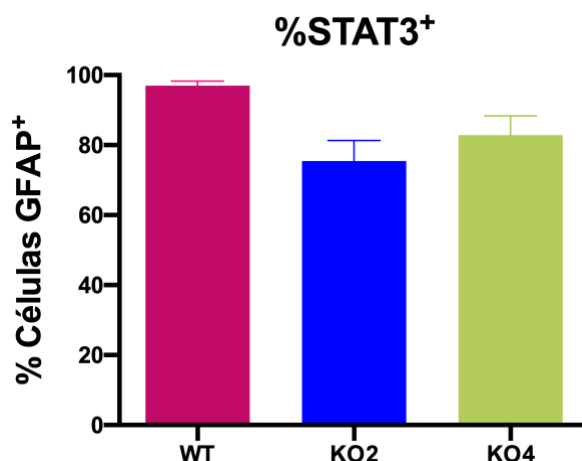


Figura 11. Gráfica del porcentaje de NPCs marcadas por STAT3 y GFAP en los fenotipos wild-type, TLR2 knockout y TLR4 knockout. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=1).

Con los resultados obtenidos, se observa que tras la diferenciación de estas células se ve alterado tanto el nivel de STAT3 como su fosforilación, encontrándose disminuidos en los KOs. Esto indica la posibilidad de que el bloqueo de TLR2 y TLR4 estén afectando a la ruta JAK/STAT en este proceso provocando su inactivación.

5.3. La influencia de los TLRs en las vías de señalización JAK-STAT y WNT

Para ver la influencia de estos receptores en las vías de señalización JAK-STAT y WNT, las NPCs de los fenotipos WT, KO2 y KO4 fueron activadas con el Interferón gamma (IFN- γ), una citoquina proinflamatoria capaz de activar ambas rutas, a diferentes tiempos (0, 15, 30 y 60 minutos).

En un estudio realizado por Mäkelä *et al.*, (2010), se demostró la existencia de expresión de receptores para el IFN- γ en NPCs de cerebro, y que cuando se produce esta unión, las proteínas STAT, que como se ha comentado son las principales proteínas de la ruta JAK/STAT, se activan.

5.3.1. Proteínas involucradas en la ruta JAK-STAT por Western blot

Con el objetivo de estudiar la activación de la ruta JAK-STAT, se analizaron dos de las proteínas principales de esta: STAT1 y STAT3 y sus respectivas fosforilaciones. Como se ha explicado anteriormente, la fosforilación de estas proteínas y su consiguiente activación, promueven la diferenciación de NPCs a astrocitos (Bonni *et al.*, 1997).

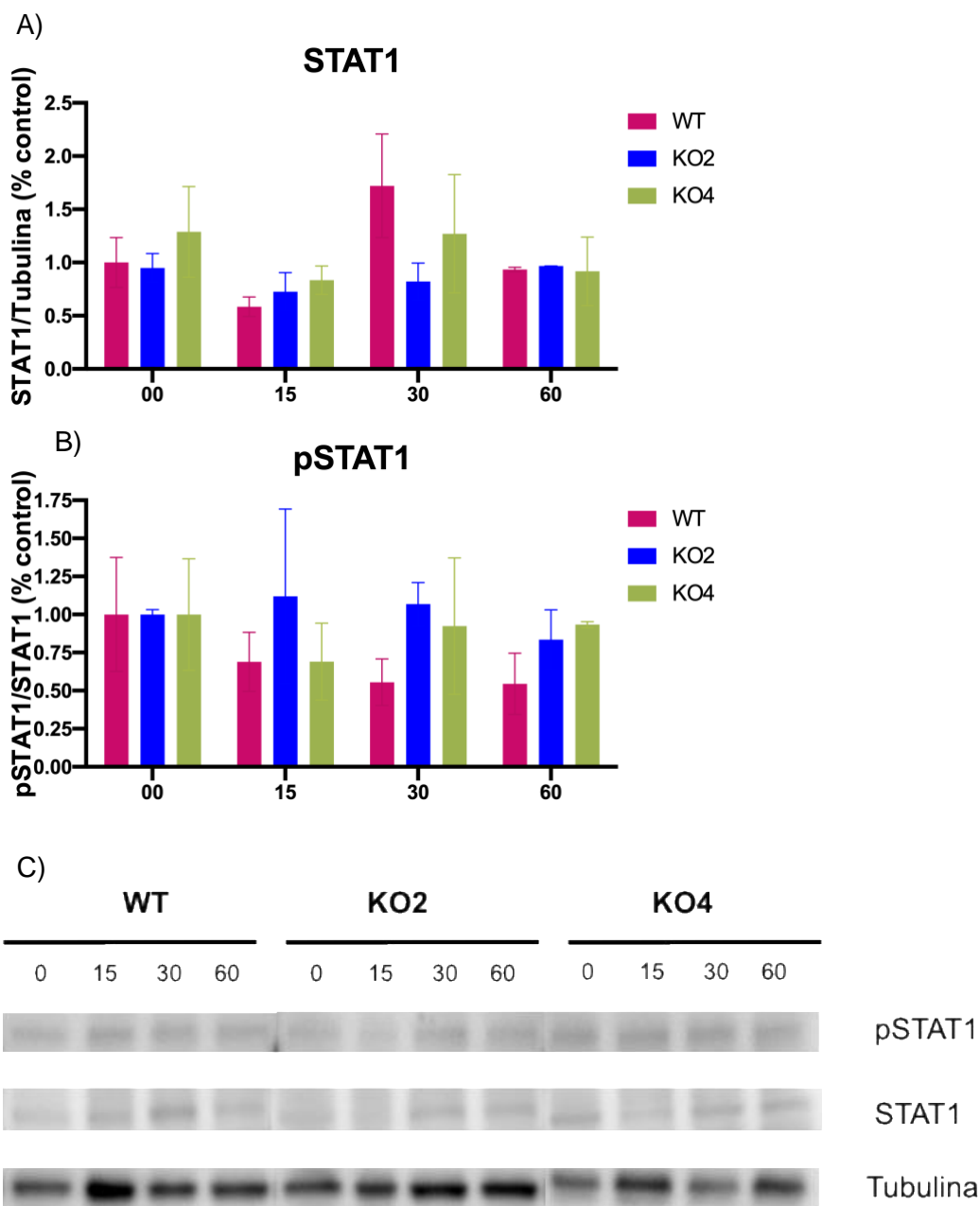


Figura 12. Representaciones gráficas del ensayo de Western blot del área de intensidad de las bandas de A) STAT1 normalizadas con el WT a tiempo 0 y B) pSTAT1 normalizadas con el tiempo 0 de su respectivo fenotipo. Se representa en cada uno de los fenotipos wild-type, KO2 y KO4 a los tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos de activación con el Interferón gamma. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=2). C) Representación de las bandas de las proteínas analizadas en este experimento.

En la figura 12 (A) se observa como existe una tendencia al aumento de STAT1 en WT a los 30 minutos que no se observa en los fenotipos de los KOs. Sin embargo, existe un ligero aumento no significativo de STAT1 en KO4 comparado con los otros 2 fenotipos.

En cuanto a la fosforilación de STAT1 (figura 12, B), los resultados muestran un descenso de la fosforilación de la proteína en el WT, mientras que tanto en el KO2 como en el KO4 se mantiene bastante estable en el tiempo, por lo que no parece que haya una activación de la ruta.

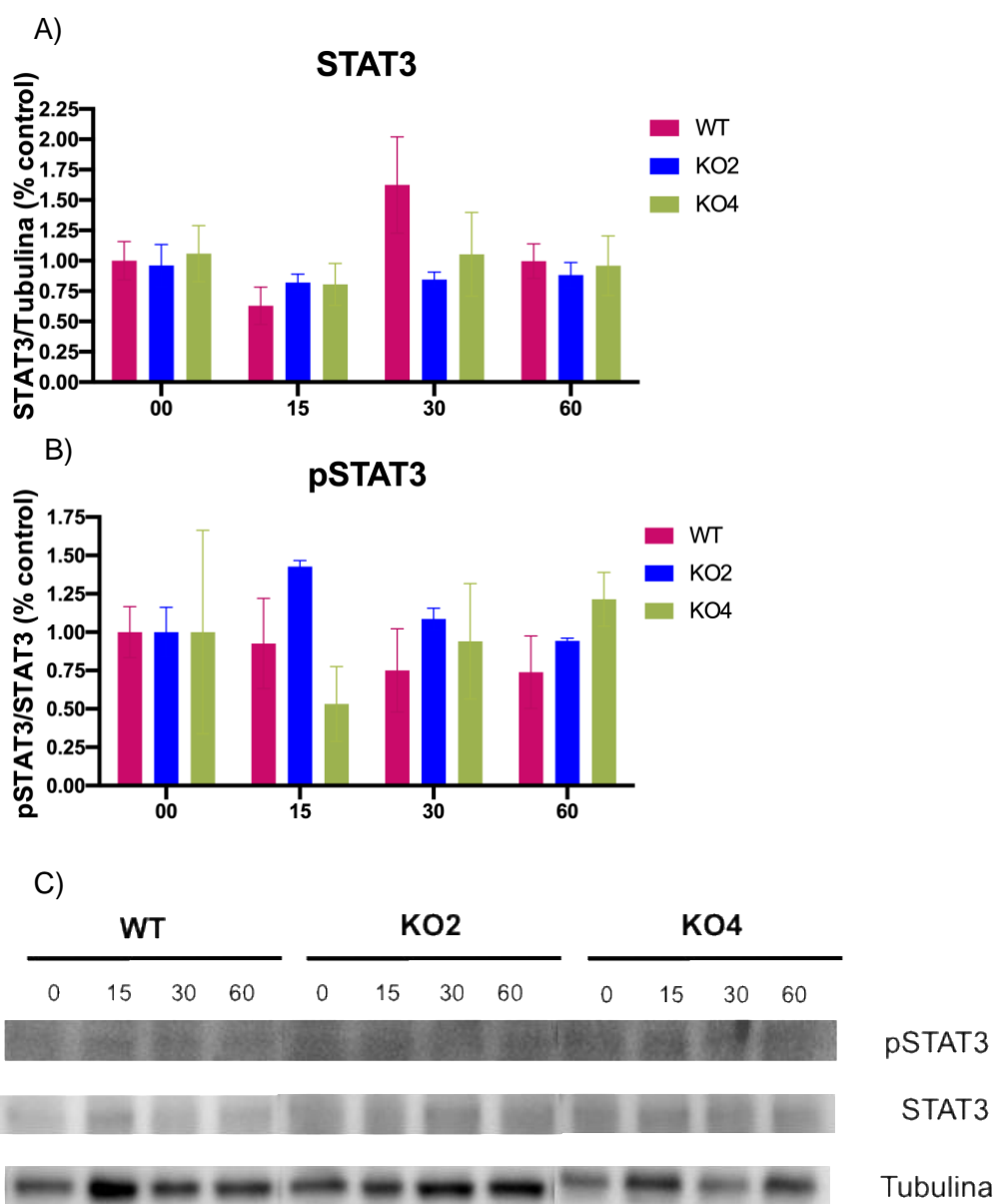


Figura 13. Representaciones gráficas tras el ensayo de Western blot del área de intensidad de las bandas de A) STAT3 normalizadas con el WT a tiempo 0 y B) pSTAT3 normalizadas con el tiempo 0 de su respectivo fenotipo. Se representa en cada uno de los fenotipos wild-type, KO2 y

KO4 a los tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos de activación con el Interferón gamma. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=2). C) Representación de las bandas de las proteínas analizadas en este experimento.

De igual manera que en los resultados de STAT1, en STAT3 (figura 13) vemos en el WT un aumento significativo a los 30 minutos, mientras que en KO2 y KO4 se mantiene estable en el tiempo.

Por otro lado, en la fosforilación de STAT3 (figura 13, B) se observa un descenso de la fosforilación en el WT. De igual forma que en el STAT1 fosforilado, el STAT3 fosforilado en KO2 y KO4 permanece estable.

Tras el análisis de estos resultados se puede concluir que el Interferón gamma únicamente activa el WT y no el KO2 ni el KO4. Además se observa que el nivel de STAT1 y STAT3 se mantiene estable. Por todo ello, se puede deducir que en ausencia de TLR2 y TLR4 no se activa la ruta JAK/STAT.

5.3.2. Proteínas involucradas en la ruta WNT por Western blot

Con el objetivo de estudiar la activación de la ruta WNT, se vieron tres de las proteínas involucradas: ERK, JNK y GSK3 β .

Las proteínas ERK y *Jun N-terminal Kinase* (JNK) forman parte de la familia de las MAP quinasas y se encuentran asociadas a la ruta no canónica de WNT, es decir, no dependiente de la β -catenina, la cual juega un papel importante en la proliferación, supervivencia y regulación del destino celular (Nusse & Clevers, 2017). La vía de señalización MAPK, está además comprobado que participa en la modulación de la diferenciación astrocítica de NPCs (Rajan & McKay, 1998).

Por otro lado, la Glicógeno Sintasa Quinasa 3 (GSK3), compuesta por dos isoformas: GSK3 α y GSK3 β (Linding *et al.*, 2007), la cual se emplea en este estudio. GSK3 es una proteína asociada a la ruta canónica de WNT, la cual se encuentra asociada a la diferenciación y migración celular. Cuando esta proteína se fosforila produce que la β -catenina aumente, entre en el núcleo donde se unirá al Factor de Transcripción Nuclear del Factor Linfoide Potenciador del Factor de Células T (LEF/TCF) y produzca así la transcripción de genes promoviendo la diferenciación (Gao

et al., 2020; Nusse & Clevers, 2017). Una sobreexpresión de esta proteína se traduce en una mayor proliferación de las NPCs (Jurado-Arjona et al., 2016).

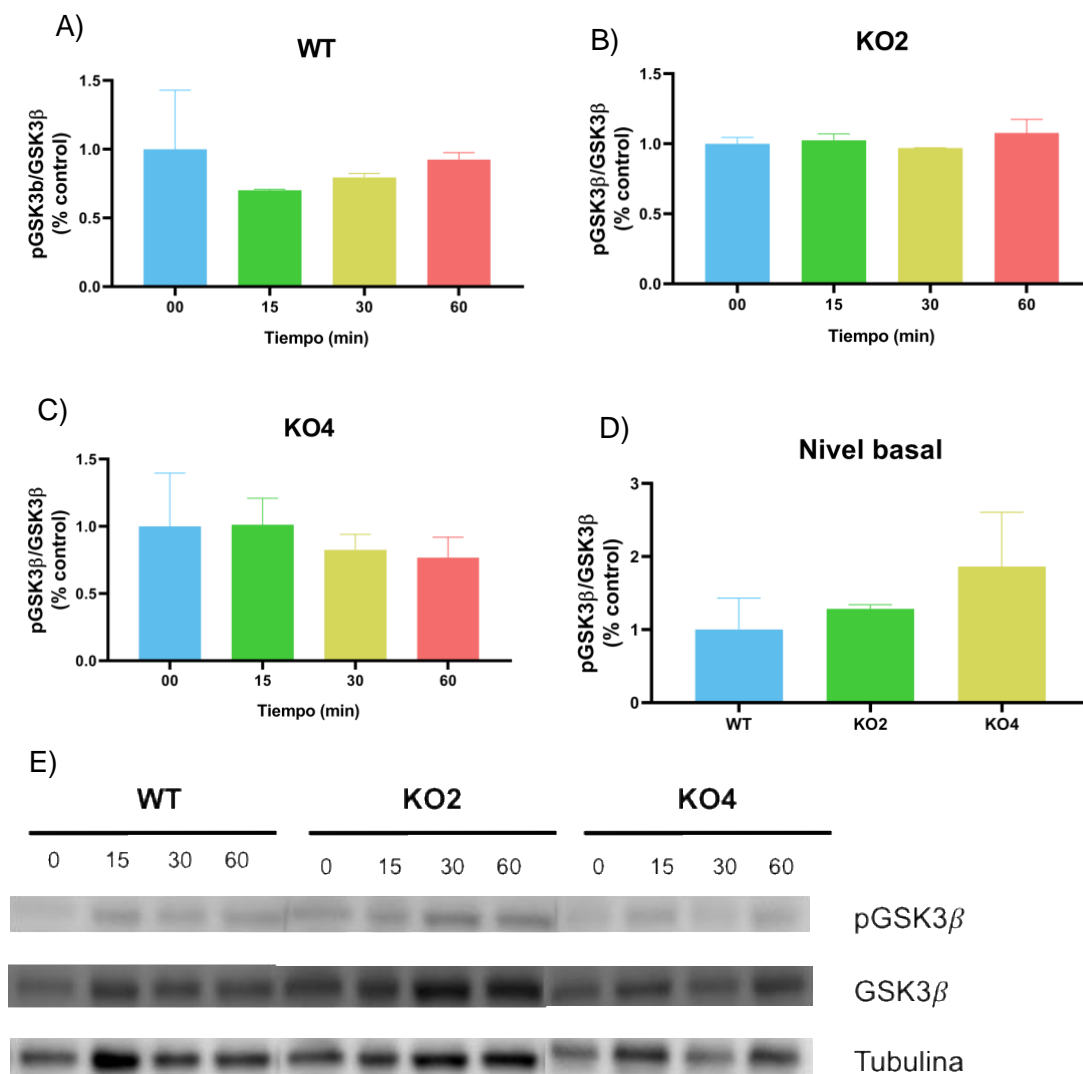


Figura 14. Representaciones gráficas del área de intensidad del ratio de las proteínas pGSK3 y GSK3 tras el Western blot en los fenotipos A) wild-type, B) KO2 y C) KO4 normalizadas cada una con su tiempo 0. D) Gráfica del nivel basal (tiempo 0) de la proteína en cada fenotipo, normalizado con el valor de WT a tiempo 0. . Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=2). E) Representación de las bandas de las proteínas analizadas en este experimento.

Los resultados de GSK3β (Figura 14) muestran en primer lugar, que en el WT la proteína se mantiene estable en el tiempo. Por otro lado, el KO2 se muestra estable en el tiempo, por lo que parece que no existe activación. En el KO4 se observa un descenso, ya que la proteína disminuye en el tiempo.

Si se observa el nivel basal de cada fenotipo (Figura 14, D), se ve como en ese tiempo 0, el KO4 tiene mayor cantidad de proteína que el WT y el KO2.

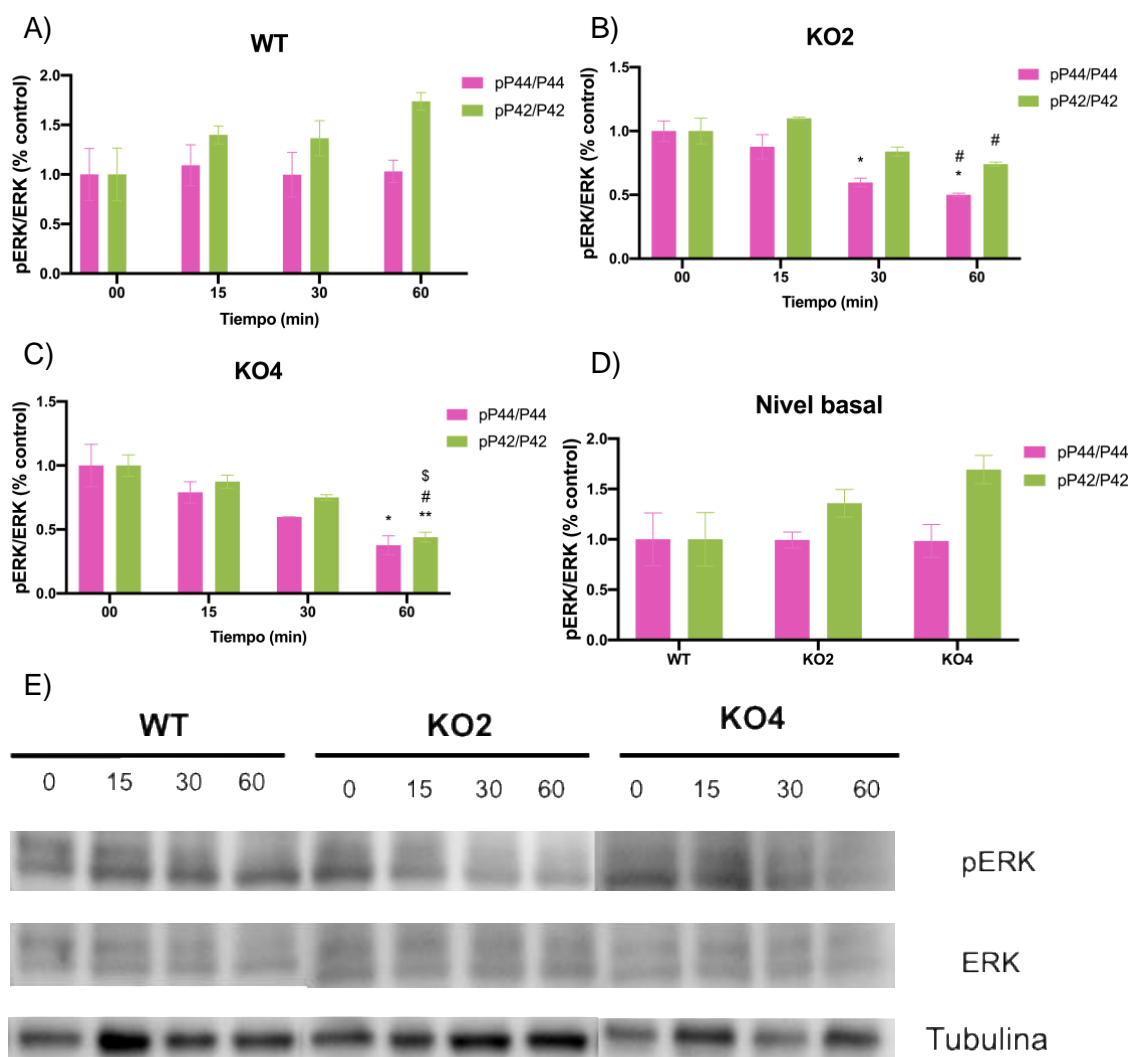


Figura 15. Representaciones gráficas del área de intensidad del ratio de las proteínas pERK y ERK tras el Western blot, formadas por las bandas P44 y P42 en los fenotipos A) wild-type, B) KO2 y C) KO4 normalizadas cada una con su tiempo 0. D) gráfica del nivel basal (tiempo 0) de la proteína en cada fenotipo, normalizado con el valor de WT a tiempo 0. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=2); * $p < 0,05$ versus tiempo 0; # $p < 0,05$ versus tiempo 15; \$ $p < 0,05$ tiempo 30. E) Representación de las bandas de las proteínas analizadas en este experimento.

En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos en relación a la proteína ERK y su fosforilación (pERK). En el WT se observa como aumenta la fosforilación en el minuto 60, en cambio en el KO2 y KO4 se ve como esta disminuye conforme pasa el tiempo.

A tiempo 0 existe más proteína en KO2 y KO4 que en WT, siendo el KO4 el de mayor cantidad.

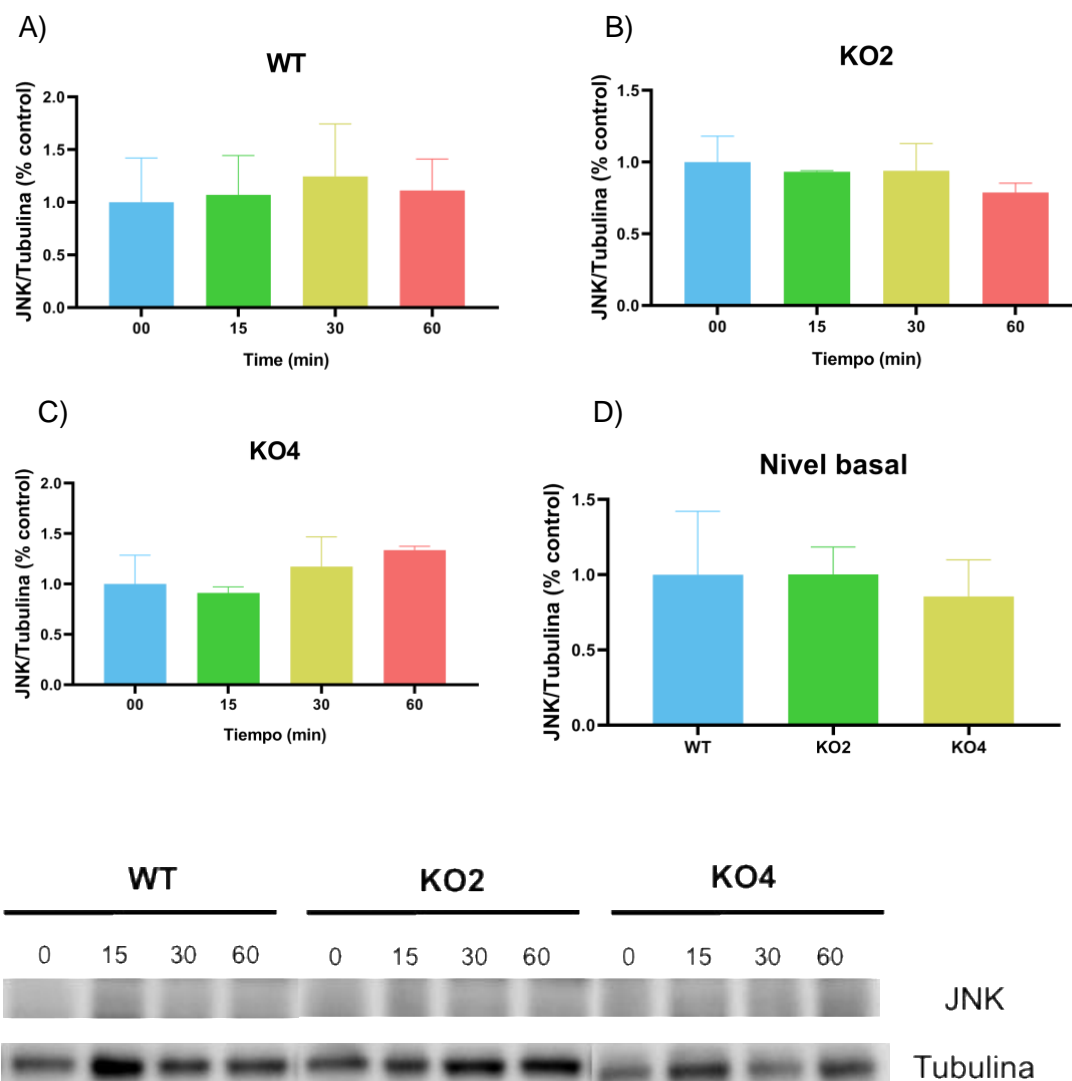


Figura 16. Representaciones gráficas tras el ensayo de Western blot de los resultados del área de intensidad de la banda de la proteína JNK en los fenotipos A) wild-type, B) KO2 y C) KO4 normalizadas cada una con su tiempo 0. D) gráfica del nivel basal (tiempo 0) de la proteína en cada fenotipo, normalizado con el valor de WT a tiempo 0. Análisis estadístico con ONE-way ANOVA (N=2). E) Representación de las bandas de las proteínas analizadas en este experimento.

En la figura 16 se encuentran los resultados de la proteína JNK, la cual se ha visto que regula la diferenciación neuronal de NPCs (Jang *et al.*, 2015). Entre los tres fenotipos no se observa ninguna diferencia y el nivel basal es el mismo. Esto quiere decir que esta proteína en particular no se ve afectada por la activación. Pero sería necesario observar su fosforilación.

Los resultados muestran un aumento y activación de ERK en WT, y una disminución en KO2 y KO4 con el IFN- γ , y ningún cambio significativo en el nivel de JNK ni de GSK3 β . Estos resultados indican que las células NPC derivadas de médula espinal tienen activada la ruta WNT no canónica vía ERK y que los TLR2 y TLR4 estarían involucrados en su correcta activación. No obstante, no se puede descartar la vía canónica sin conocer el nivel de β -catenina en las células tras la activación. Como vía principal de la diferenciación celular, se puede concluir que los TLRs están involucrados en la correcta activación de esta vía.

6. CONCLUSIONES

Tras la obtención de los resultados descritos previamente se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Las NPCs se diferencian en mayor proporción en astrocitos, y en menor proporción a neuronas, en condiciones de diferenciación, en ausencia de factores de crecimiento.
- En condiciones de proliferación, en presencia de factores de crecimiento, las NPCs son marcadas mayoritariamente por el precursor de oligodendrocitos.
- En ausencia de TLR2 y TLR4, las NPCs tienden a diferenciarse en mayor proporción a neuronas que el WT.
- Tras la diferenciación de NPCs el nivel de STAT3 y pSTAT3 se ve alterado, mostrándose disminuído en el KO2 y KO4 con respecto al WT, lo cual indica la posibilidad de que los TLRs afectan a la ruta JAK/STAT en este proceso.
- En ausencia de TLR2 y TLR4, la ruta WNT se encuentra inactivada, lo cual se traduce en que ambos receptores podrían estar implicados en la diferenciación de NPCs derivadas de médula espinal a través de la rutas WNT vía ERK.

7. LÍNEAS FUTURAS

Con la finalidad de llevar a cabo un estudio en profundidad acerca del papel de los tipos 2 y 4 de TLRs en las vías de señalización en cuestión, se podrían plantear diferentes experimentos.

Tras el ensayo de activación con el IFN- γ y Western blot, con el objetivo de confirmar los resultados, sería apropiado realizar una PCR cuantitativa. De esta manera se cuantificaría la cantidad de cada proteína estudiada y los resultados podrían ser contrastados y confirmados. Además, sería apropiado estudiar el nivel de β -catenina en las células para así observar cómo estas se encuentran en la vía canónica de WNT tras su activación.

Otro experimento que ayudaría a observar cómo se comportan estos TLRs en las vías de JAK/STAT y WNT, sería bloquear estas rutas de señalización con inhibidores de proteínas que participan en ellas y pasado un día, activarlas con Interleucina 6 (IL-6). Para la ruta JAK/STAT, el inhibidor que se podría utilizar es la tirfostina AG490, la cual se ha visto que inhibe de manera específica a JAK2 y de esta forma bloquea la activación de STAT3 (Miyamoto *et al.*, 2001). Por otro lado, para el bloqueo de la ruta WNT sería apropiado utilizar un inhibidor de GSK3 β , pues si este no lleva a cabo su función, la vía de WNT no funciona correctamente y entonces no puede realizar su papel regulador del balance entre la proliferación y diferenciación de NPCs (Lie *et al.*, 2005). Una vez llevado a cabo esto, se realizaría un Western blot y PCR cuantitativa para proteínas como STAT1 o β -catenina, las cuales se encuentran involucradas en las rutas de señalización en estudio.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., & Tramontin, A. D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/35067582>
- Anderson, K. V., Bokla, L., & Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3), 791–798. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90275-2)
- Anthony, N., Foldi, I., & Hidalgo, A. (2018). Toll and toll-like receptor signalling in development. *Development (Cambridge)*, 145(9), 1–6. <https://doi.org/10.1242/dev.156018>
- Battle, T., & Frank, D. (2005). The Role of STATs in Apoptosis. *Current Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.2174/1566524023362456>
- 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>
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., & Greenberg, M. E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.278.5337.477>
- Chen, C. Y., Shih, Y. C., Hung, Y. F., & Hsueh, Y. P. (2019). Beyond defense: Regulation of neuronal morphogenesis and brain functions via Toll-like receptors. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0584-z>
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., & Golenbock, D. T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine*, 198(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1084/jem.20031023>
- Gao, J., Liao, Y., & Qiu, M. (2020). *Wnt / β -Catenin Signaling in Neural Stem Cell Homeostasis and Neurological Diseases*. <https://doi.org/10.1177/1073858420914509>
- Grasselli, C., Ferrari, D., Zalfa, C., Soncini, M., Mazzoccoli, G., Facchini, F. A., Marongiu, L., Granucci, F., Copetti, M., Vescovi, A. L., Peri, F., & De Filippis, L. (2018). Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation article. *Cell Death and Disease*, 9(3).

- <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0139-8>
- Han-Chung, L., Kai-Leng, T., Pike-See, C., & King-Hwa, L. (2016). Potential Role of JAK-STAT Signaling Pathway in the Neurogenic-to-Gliogenic Shift in Down Syndrome Brain. In *Neural Plasticity*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90380-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90380-X)
- Heiman, A., Pallottie, A., Heary, R. F., & Elkabes, S. (2014). Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: A focus on the spinal cord. *Brain, Behavior, and Immunity*, *42*, 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.203>
- Hori, M., & Nishida, K. (2008). Toll-Like Receptor Signaling. *Circulation Research*, *102*(2), 137–139. <https://doi.org/10.1161/circresaha.107.170225>
- Horner, P. J., Power, A. E., Kempermann, G., Kuhn, H. G., Palmer, T. D., Winkler, J., Thal, L. J., & Gage, F. H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-06-02218.2000>
- Jang, S., Park, J. S., & Jeong, H. S. (2015). Neural Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Involves Activation of the Wnt5a/JNK Signalling. *Stem Cells International*, *2015*(Dvl). <https://doi.org/10.1155/2015/178618>
- Jurado-Arjona, J., Llorens-Martín, M., Ávila, J., & Hernández, F. (2016). GSK3 β overexpression in dentate gyrus neural precursor cells expands the progenitor pool and enhances memory skills. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674531>
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research and Therapy*, *7*(1), 12–19. <https://doi.org/10.1186/ar1469>
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., & Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, *285*(1–2), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00398-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00398-0)
- Lacagnina, M. J., Watkins, L. R., & Grace, P. M. (2018). Toll-like receptors and their role in persistent pain. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 184). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.006>
- Laurence, A., Pesu, M., Silvennoinen, O., & O'Shea, J. (2012). JAK Kinases in Health and Disease: An Update. *The Open Rheumatology Journal*. <https://doi.org/10.2174/1874312901206010232>
- Lee, H. C., Tan, K. L., Cheah, P. S., & Ling, K. H. (2016). Potential Role of JAK-STAT Signaling Pathway in the Neurogenic-to-Gliogenic Shift in Down Syndrome Brain. *Neural Plasticity*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/7434191>
- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, *58*(3), 253–263.

- <https://doi.org/10.1002/glia.20928>
- Leulier, F., & Lemaitre, B. (2008). Toll-like receptors - Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 165–178.
<https://doi.org/10.1038/nrg2303>
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R., & Gage, F. H. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/nature04108>
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. A. T. M., Jørgensen, C., Miron, I. M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., Metalnikov, P., Nguyen, V., Pasculescu, A., Jin, J., Park, J. G., Samson, L. D., Woodgett, J. R., Russell, R. B. B., Bork, P., ... Pawson, T. (2007). Systematic Discovery of In Vivo Phosphorylation Networks. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.052>
- Liu, X. J., Liu, T., Chen, G., Wang, B., Yu, X. L., Yin, C., & Ji, R. R. (2016). TLR signaling adaptor protein MyD88 in primary sensory neurons contributes to persistent inflammatory and neuropathic pain and neuroinflammation. *Scientific Reports*, 6(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep28188>
- Luo, L., Lucas, R. M., Liu, L., & Stow, J. L. (2019). Signalling, sorting and scaffolding adaptors for Toll-like receptors. *Journal of Cell Science*, 133(5).
<https://doi.org/10.1242/jcs.239194>
- MacDonald, B. T., & He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 receptors for wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007880>
- Mäkelä, J., Koivuniemi, R., Korhonen, L., & Lindholm, D. (2010). Interferon- γ produced by microglia and the neuropeptide PACAP have opposite effects on the viability of neural progenitor cells. *PLoS ONE*, 5(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011091>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/41131>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., & Janeway, C. A. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*, 2(2), 253–258.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80136-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80136-7)
- Miyamoto, N., Sugita, K., Goi, K., Inukai, T., Iijima, K., Tezuka, T., Kojika, S., Nakamura, M., Kagami, K., & Nakazawa, S. (2001). The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with

- 11q23 translocation or Philadelphia chromosome. *Leukemia*.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402260>
- Moreno-Manzano, V. (2020). Ependymal cells in the spinal cord as neuronal progenitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 50, 82–87.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.11.008>
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., & Taga, T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5413.479>
- Nicolas, C. S., Amici, M., Bortolotto, Z. A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G. L., & Peineau, S. (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Jak-Stat*, 2(1), e22925.
<https://doi.org/10.4161/jkst.22925>
- Noelanders, R., & Vleminckx, K. (2017). How Wnt Signaling Builds the Brain: Bridging Development and Disease. In *Neuroscientist*.
<https://doi.org/10.1177/1073858416667270>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985-999. doi:10.1016/j.cell.2017.05.016ase, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. In *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/nri2079>
- Okano, H., Okada, S., Nakamura, M., & Toyama, Y. (2005). Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord. *Kidney International*, 68(5), 1927–1931.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00621.x>
- Okun, E., Griffioen, K. J., & Gen-Son, T. (2010). TLR2 Activation Inhibits Embryonic Neural Progenitor Cell Proliferation. *J Neurochem*, 23(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Rajan, P., & McKay, R. D. G. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-10-03620.1998>
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., & Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9577–9582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502272102>
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., & Schwartz, M. (2007).

- Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature Cell Biology*, 9(9), 1081–1088. <https://doi.org/10.1038/ncb1629>
- Sabelström, H., Stenudd, M., & Frisé, J. (2014). Neural stem cells in the adult spinal cord. *Experimental Neurology*, 260, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.01.026>
- Sánchez-petidier, M., Arturo, J., Matilla, C., Guerri, C., & Moreno, V. (2017). *Toll-Like Receptors participate in the neural differentiation of ependymal stem/progenitors cells derived from spinal cord*. 4(2), 2017.
- Shechter, R., Ronen, A., Rolls, A., London, A., Bakalash, S., Young, M. J., & Schwartz, M. (2008). Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *Journal of Cell Biology*, 183(3), 393–400. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804010>
- Shitasako, S., Ito, Y., Ito, R., Ueda, Y., Shimizu, Y., & Ohshima, T. (2017). Wnt and Shh signals regulate neural stem cell proliferation and differentiation in the optic tectum of adult zebrafish. *Developmental Neurobiology*. <https://doi.org/10.1002/dneu.22509>
- Strain, S. M., Fesik, S. W., & Armitage, I. M. (1983). Characterization of lipopolysaccharide from a heptoseless mutant of *Escherichia coli* by carbon 13 nuclear magnetic resonance. *Journal of Biological Chemistry*.
- Streit, W. J., Semple-Rowland, S. L., Hurley, S. D., Miller, R. C., Popovich, P. G., & Stokes, B. T. (1998). Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6835>
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., & Akira, S. (2002). Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.10>
- Tapia, V. S., Herrera-Rojas, M., & Larrain, J. (2017). JAK-STAT pathway activation in response to spinal cord injury in regenerative and non-regenerative stages of *Xenopus laevis*. *Regeneration*, 4(1), 21–35. <https://doi.org/10.1002/reg2.74>
- WANG, T., YUAN, W., LIU, Y., ZHANG, Y., WANG, Z., ZHOU, X., NING, G., ZHANG, L., YAO, L., FENG, S., & KONG, X. (2015). The role of the JAK-STAT pathway in neural stem cells, neural progenitor cells and reactive astrocytes after spinal cord injury. *Biomedical Reports*, 3(2), 141–146. <https://doi.org/10.3892/br.2014.401>
- Yao, G. L. (1997). Selective upregulation of cytokine receptor subchain and their intracellular signalling molecules after peripheral nerve injury. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01455.x>
- Young, F., Sloan, A., & Song, B. (2013). Dental pulp stem cells and their potential roles

in central nervous system regeneration and repair. *Journal of Neuroscience Research*, 91(11), 1383–1393. <https://doi.org/10.1002/jnr.23250>

Yun Hee, K., Jee-In, C., Hyun Goo, W., Yi-Sook, J., Soo Hwan, L., Chang-Hyun, M., Haeyoung, S.-K., & Eun Joo, B. (2010). Differential Regulation of Proliferation and Differentiation in Neural Precursor Cells by the Jak Pathway. *Stem Cells*, 1816–1828. <https://doi.org/10.1634/stemcells.744>