



Instituto de Biomedicina de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

TESIS DOCTORAL

Mecanismos neurogénicos en respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo. Presencia de neuronas inmaduras en el sistema nervioso periférico adulto

Verónica Sobrino Cabello
Licenciada en Biología
Sevilla, 2017

El Dr. Ricardo Pardal Redondo, profesor numerario del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA QUE:

La presente tesis doctoral titulada “Mecanismos neurogénicos en respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo. Presencia de neuronas inmaduras en el sistema nervioso periférico adulto”, presentada por la Licenciada en Biología Verónica Sobrino Cabello, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (CSIC/US/HUVR), gracias a financiación de la Unión Europea (Programa ERC Starting Grant).

Sevilla, a 22 de mayo de 2017.



Fdo. Dr. Ricardo Pardal Redondo
Director de Tesis
Profesor del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica
Universidad de Sevilla

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	5
1. EL CUERPO CAROTÍDEO.....	5
1.1. Anatomía del cuerpo carotídeo.....	7
1.2. Origen embrionario del CC: la cresta neural.....	9
1.2.1. El antígeno de superficie HNK-1.....	12
1.2.2. Formación embrionaria del CC.....	12
1.3. Fisiología del cuerpo carotídeo.....	15
2. NICHOS NEUROGÉNICOS.....	19
2.1. Nichos neurogénicos del SNC.....	20
2.1.1. El nicho neurogénico de la SVZ.....	21
2.1.2. El nicho neurogénico de la SGZ.....	26
2.2. Nichos neurogénicos del SNP: células madre de la cresta neural.....	29
2.2.1. El nicho neurogénico del CC.....	30
3. RELEVANCIA CLÍNICA DEL ESTUDIO DEL CUERPO CAROTÍDEO.....	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1. Estudios <i>In vivo</i>.....	39
1.1. Animales y muestras humanas.....	39
1.2. Tratamiento en cámaras de hipoxia.....	40
1.3. Administración de compuestos.....	40
1.3.1. 5-Bromodesoxiuridina.....	40
1.3.2. Cloruro de cadmio.....	41
1.3.3. Bosentán.....	41
1.3.4. Haloperidol.....	42
1.3.5. Apomorfina.....	42
1.4. Técnicas histológicas.....	43
1.4.1. Perfusión intracardiaca.....	43
1.4.2. Inclusión y corte de tejidos.....	43
1.5. Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo.....	44
1.6. Inmunohistoquímica para microscopía electrónica de transmisión.....	46
1.7. Adquisición y tratamiento de imágenes.....	46
2. Estudios <i>Ex vivo</i>.....	47
2.1. Dispersión de cuerpos carotídeos.....	47
2.2. Aislamiento de poblaciones celulares vivas mediante citometría de flujo.....	48
2.3. Citometría de flujo para el análisis de poblaciones celulares del cuerpo carotídeo.....	49
2.3.1. Controles.....	49
2.3.2. Tinción para citometría de flujo extracelular e intracelular.....	50
2.3.3. Tinción para citometría de flujo extracelular, intracelular e intranuclear.....	51
2.4. Inmunocitoquímica de células dispersas.....	52
2.5. Análisis de la expresión génica.....	53
2.5.1. Detección de ARNm mediante PCR estándar.....	53
2.5.2. Estudio de la expresión diferencial de genes mediante <i>Microarray</i>	54
2.6. Técnicas electrofisiológicas.....	55
3. Estudios <i>in vitro</i>.....	56
3.1. Cultivo de células dispersas del cuerpo carotídeo en placas antiadherentes y formación de neuroesferas.....	56
3.2. Cultivo de células dispersas del cuerpo carotídeo en condiciones adherentes.....	58
3.3. Inmunocitoquímica de células en adherente.....	59

3.4. Imágenes de célula viva mediante microscopía <i>Time-Lapse</i>	59
4. Estudios <i>in silico</i>	60
4.1. Procesamiento de datos y análisis del <i>microarray</i> de expresión mediante TAC (<i>Transcriptome Analysis Console</i>)	60
4.2. Análisis de los <i>microarrays</i> de expresión génica mediante IPA.....	62
4.3. Análisis estadístico de los datos	63
5. Anexos y tablas	64
5.1. Anexo de soluciones	64
5.2. <i>Primers</i>	65
RESULTADOS.....	67
1. Estudio de la proliferación de células glómicas en respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo adulto.....	67
1.1. Estudio de la subpoblación de células glómicas con capacidad proliferativa mediante el antígeno HNK-1.....	73
1.2. Caracterización de las células TH/HNK durante una hipoxia prolongada.....	76
2. Caracterización morfo-funcional de la población TH/HNK del CC en comparación con las neuronas maduras	79
2.1. Estudios morfológicos de ambos tipos de células neuronales del CC por microscopía electrónica.....	79
2.2. Aislamiento prospectivo de células neuronales del CC para su caracterización funcional	82
2.3. Confirmación <i>in vitro</i> de la capacidad proliferativa de los neuroblastos TH/HNK del CC	86
2.4. Caracterización funcional de las células neuroblásticas TH/HNK en comparación con las células TH maduras.....	88
3. Mecanismo molecular de activación proliferativa en los neuroblastos TH/HNK del CC	92
3.1. Efecto de los neurotransmisores purinérgicos sobre la respuesta funcional electrofisiológica de los neuroblastos	95
3.2. Maduración <i>in vitro</i> de los neuroblastos del CC mediada por señalización purinérgica	95
4. Caracterización del resto de población positiva para HNK-1 en el CC.....	99
4.1. Estudio de la capacidad proliferativa y la identidad de las subpoblaciones de células HNK-1 positivas en el CC.....	103
5. Estudio de la población HNK en el cuerpo carotídeo de otras especies	106
6. Estudios preliminares de la vuelta a la normoxia en el CC de rata	109
7. Estudio de expresión diferencial de genes entre células TH/HNK y células TH 111	111
7.1. Identificación de rutas de señalización mediante el programa <i>Transcriptome Analysis Console</i> (TAC).....	115
7.1.1. Ruta de señalización “Regulación por calcio en la célula cardíaca”	119
7.1.2. Ruta de señalización de Wnt y pluripotencia	122
7.2. Análisis de los datos mediante el <i>software Ingenuity Pathway Analysis</i>	123
7.2.1. <i>Canonical Pathways</i> (Rutas Canónicas).....	125
7.2.2. <i>Upstream Regulators</i>	127
7.2.3. <i>Molecular and Cellular Functions</i>	130
7.2.4. <i>Networks</i>	131
7.2.5. <i>Regulator effects</i>	131
DISCUSIÓN	136
1. Presencia de neuroblastos quiescentes en el CC adulto	136
2. Los neuroblastos del CC se identifican y aíslan gracias al antígeno de membrana HNK-1.....	139

3. La principal diferencia funcional entre los neuroblastos y las células glómicas del CC es la capacidad para detectar el estímulo hipóxico.....	142
4. Factores que regulan la neurogénesis a partir de neuroblastos	143
5. Implicaciones clínicas del estudio de los neuroblastos del CC.....	147
CONCLUSIONES.....	150
BIBLIOGRAFÍA	153

Figuras y tablas

Figura 1. Localización y estructura del cuerpo carotídeo (CC).	6
Figura 2. Desarrollo de la cresta neural y diferenciación.	10
Figura 3. Formación de CC a partir de células de la cresta neural.	13
Figura 4. Respuesta fisiológica a hipoxia aguda.	16
Figura 5. Nichos neurogénicos descritos en el cerebro adulto de roedor.	20
Figura 6. Organización celular del nicho de la SVZ.	22
Figura 7. El nicho neurogénico de la SGZ.	27
Figura 8. El nicho neurogénico del CC.	31
Figura 9. Estudios de proliferación de las células glómicas en respuesta al estímulo hipóxico.	68
Figura 10. Estudios de proliferación de células TH+ a tiempos cortos.	71
Figura 11. Identificación de la población TH+/HNK+ y estudio de su capacidad proliferativa.	74
Figura 12. Análisis citométrico de la dinámica de la población de neuroblastos TH/HNK en hipoxia prolongada.	78
Figura 13. Estudios morfométricos de las poblaciones TH y TH/HNK del CC por microscopía electrónica.	80
Figura 14. Metodología de aislamiento de las células glómicas del CC mediante FACS.	85
Figura 15. Estudios <i>in vitro</i> de la capacidad proliferativa de los neuroblastos del CC.	87
Figura 16. Estudio comparativo de las propiedades electrofisiológicas de neuroblastos y células glómicas maduras.	89
Figura 17. Caracterización electrofisiológica funcional de los neuroblastos del CC en comparación a las células glómicas.	91
Figura 18. Mecanismo molecular de inducción de la proliferación en los neuroblastos del CC.	94
Figura 19. Estudio de la respuesta funcional a la señalización purinérgica en células maduras e inmaduras del CC.	96
Figura 20. Maduración funcional de los neuroblastos en respuesta a compuestos purinérgicos y colinérgicos.	98
Figura 21. Estudio de la proliferación <i>in vivo</i> de los neuroblastos del CC en respuesta a distintos factores.	100
Figura 22. Expresión de HNK-1 en otras células del CC.	102
Figura 23. Estudio de la capacidad proliferativa y potencialidad de diferenciación de las subpoblaciones de células HNK-1+ en el CC.	105
Figura 24. Identificación de neuroblastos en el CC de ratón y en el de humano.	107
Figura 25. Experimento de renormoxia <i>in vitro</i> y recuperación del fenotipo HNK-1+ en células glómicas.	110

Figura 26. Distintos tipos de representación de los resultados obtenidos en el estudio de <i>microarray</i>.	116
Figura 27. Rutas significativas identificadas mediante el programa TAC.	118
Figura 28. Ruta de “Regulación por calcio de la célula cardíaca”.	120
Figura 29. Ruta “Señalización por Wnt y pluripotencia”.	123
Figura 30. Identificación de rutas canónicas más significativas mediante el programa IPA (<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>).	126
Figura 31. Ejemplos de las principales rutas canónicas identificadas en los neuroblastos del CC.	128
Figura 32. Ejemplos de rutas diseñadas mediante la función “Regulator effects” en la población de neuroblastos.	133
Figura 33. Modelo clásico de los dos tipos de células glómicas propuesto en el CC.	138
Tabla 1. Lista de los 20 genes más diferencialmente expresados en la población de neuroblastos del CC.	113
Tabla 2. Lista de los 20 genes más diferencialmente expresados en la población de células glómicas del CC.	114
Tabla 3. Receptores de membrana más expresados en los neuroblastos del CC. ..	115
Tabla 4. Principales genes que intervienen en la ruta “Regulación por calcio de la célula cardíaca”.	121
Tabla 5. Principales genes que intervienen en la ruta “Señalización por Wnt y pluripotencia”.	124
Tabla 6. Resumen de los principales reguladores, funciones celulares y moleculares, y <i>networks</i>, para los neuroblastos y células glómicas, según el programa IPA.	130

Clave de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADO	Adenosina
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Acido ribonucleico
Ascl1	<i>Achaete-scute homolog 1</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BLBP	<i>Brain Lipid-Binding Protein</i>
BMP2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxiuridina
BSA	Suero de albúmina bovina
Ca²⁺	Calcio
CBSC	Carotid body stem cell
CC	Cuerpo carotídeo
CCHS	Congenital central hypoventilation syndrome
CO₂	Dióxido de carbono
Cph	<i>Cyclophilin</i> (Ciclofilina)
CREB	<i>AMPC responsive element binding protein</i>
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCX	Doblecortina
DDC	Dopamina decarboxilasa
DG	<i>Dentate girus</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ET-1	Endotelina-1
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavín adenín dinucleótido

FC	<i>Fold change</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GABA	Acido γ -aminobutírico
GCS	Ganglio cervical superior
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GLAST	<i>Glutamate Aspartate Transporter</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
HCl	Acido clorhídrico
HIFs	<i>Hypoxia inducible factors</i>
HNK-1	<i>Human natural killer-1</i>
HRE	<i>Hypoxia responsive elements</i>
IPA	<i>Ingenuity pathways analysis</i>
K⁺	Potasio
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MCI	<i>Mitochondrial complex I</i>
NA	Noradrenalina
Na⁺	Sodio
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCAM	<i>Neural cell adhesión molecule</i>
NCSC	<i>Neural crest stem cell</i>
NPY	Neuropéptido Y
NSC	<i>Neural Stem cell</i>
NTS	Núcleo del tracto solitario
O₂	Oxígeno
OB	<i>Olfactory bulb</i>
OSA	<i>Obstructive sleep apnea</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Phycoerithrin</i>
PFA	Paraformaldehido
PGP9.5	<i>Protein gene product 9.5</i>

PHD	Prolil-hidroxilasas
PHH3	Fosfohistona H3
PSA-NCAM	<i>Polysialylated Neural cell adhesión molecule</i>
RGL	<i>Radial-glia like</i>
RMS	<i>Rostral migratory stream</i>
SDF1	<i>Stroma cell-derived factor-1</i>
SGZ	<i>Subgranular zone</i>
SIDS	<i>Sudden infant Death Syndrome</i>
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SSC	<i>Side scatter</i>
SSEA-1	<i>Stage-Specific Embrionic Anigen-1</i>
SVZ	<i>Subventricular zone</i>
TAC	<i>Transcriptome analysis console</i>
TAP	<i>Transient amplifying progenitor</i>
TH	Tirosina hidrosilasa
Tuj1	Beta III-tubulina
UTP	Uridina trifosfato
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>
VRG	<i>Ventral respiratory group</i>

RESUMEN

RESUMEN

El cuerpo carotídeo (CC) es un pequeño órgano localizado bilateralmente en la bifurcación de la arteria carótida, y cuya principal función es la de quimiorreceptor de parámetros tan importantes como la presión parcial de oxígeno en sangre.

Este órgano, que deriva de la cresta neural embrionaria y por tanto forma parte del sistema nervioso periférico, se ha definido recientemente como un nicho germinal en el adulto. En condiciones de hipoxemia persistente, la célula madre del nicho se activa y se diferencia, tanto hacia neuronas del CC (células glómicas) como hacia vasos sanguíneos, en un proceso que requiere unos 7 días para completarse.

El antígeno HNK-1, utilizado clásicamente en el estudio de la cresta neural embrionaria, identifica una subpoblación de células neuronales en el CC adulto con fenotipo inmaduro. Estos neuroblastos se encuentran quiescentes y pre-diferenciados, conservando cierta capacidad proliferativa. En respuesta a hipoxia mantenida, estas células inician un proceso rápido de proliferación (con 1 o 2 divisiones), y de diferenciación hacia célula glómica madura y plenamente funcional. Este proceso comienza durante el primer día de estímulo hipóxico, y en sólo 3-4 días se genera una población amplificada de células glómicas, acelerando enormemente la neurogénesis adaptativa que tiene lugar en este órgano en respuesta a hipoxia crónica.

Hemos puesto a punto el aislamiento prospectivo de neuroblastos y células glómicas maduras a partir de CC disperso, lo que nos ha permitido llevar a cabo una caracterización comparativa en profundidad. Los resultados de este estudio nos permiten concluir que aunque existen numerosas similitudes entre ambos tipos celulares, las principales diferencias entre ambos son la capacidad de división que conserva el neuroblasto, y la capacidad para detectar la presión parcial de oxígeno en sangre, una característica exclusiva de las células glómicas maduras. Igualmente hemos estudiado, con ensayos

funcionales y con estudios de expresión diferencial de genes por *microarray*, las rutas de señalización implicadas en la biología de los neuroblastos y en su comunicación con las células maduras.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL CUERPO CAROTÍDEO

El cuerpo carotídeo (CC) o *glomus caroticum* es un pequeño órgano ovoide situado bilateralmente en la bifurcación de las arterias carótidas (Fig. 1A). Este órgano forma parte del Sistema Nervioso Periférico (SNP), constituyendo el principal quimiorreceptor arterial de mamíferos, y está implicado en la detección de parámetros tan importantes como la presión parcial de oxígeno (PO_2) en sangre, la PCO_2 , la concentración de protones, o los niveles de glucosa en sangre (Fitzgerald and Lahiri, 1986; López-Barneo et al., 2001).

Aunque la existencia del CC se conoce desde el siglo XVIII, no fue hasta 1925 cuando el anatomista Fernando De Castro, joven discípulo de Ramón y Cajal, aplicó las técnicas histológicas más novedosas de la época al estudio de este órgano. Estudió en detalle la estructura y la inervación, para más tarde publicar los primeros trabajos sobre la anatomía del CC. En estos trabajos pioneros de De Castro se definía por primera vez al CC como órgano sensorial, y se realizaban las primeras hipótesis sobre su función como quimiorreceptor periférico. Estas hipótesis fueron poco después confirmadas por el fisiólogo belga Corneille Heymans, por lo cual recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1938 (de Castro, 2009; Nurse et al., 2012).

El CC se encuentra en todos los vertebrados superiores (Hempleman and Warburton, 2012) y ha sido estudiado en detalle tanto en mamíferos como en aves (Chen and Yates, 1984; Hansen, 1985; Hempleman and Warburton, 2012; Kameda, 2005; Kameda et al., 1994). Además, otros vertebrados como peces y anfibios contienen estructuras similares que cumplen la misma función (Hempleman and Warburton, 2012; Kusakabe, 2002).

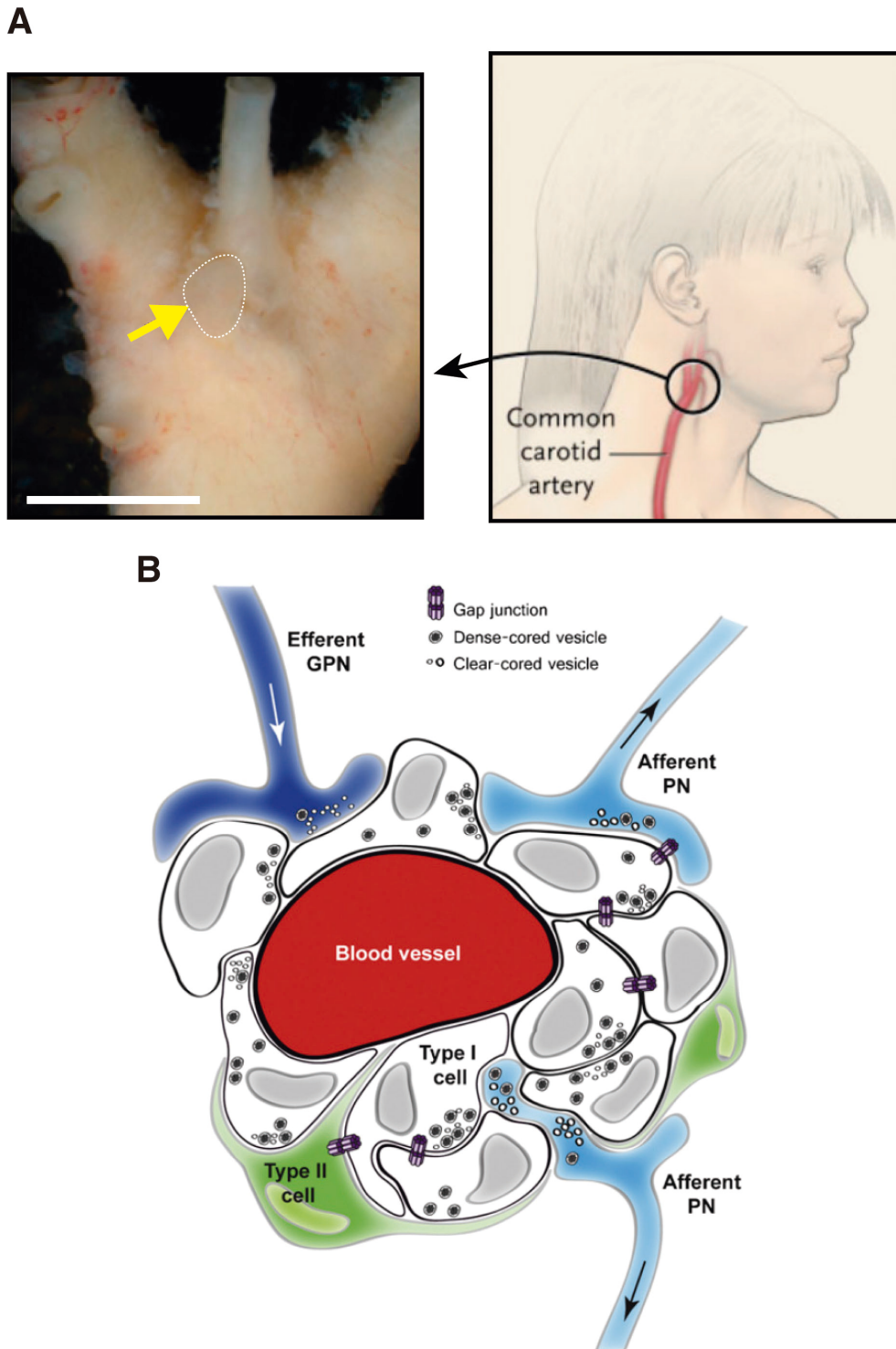


Figura 1. Localización y estructura del cuerpo carotídeo (CC).

A) Derecha: Ilustración de la localización del CC humano en la bifurcación de la arteria carótida. Tomado de Weir et al., 2005. Izquierda: Imagen de una bifurcación carotídea humana tras retirar el ganglio cervical superior y el tejido conectivo que rodea al CC. El órgano quimiorreceptor puede apreciarse en el centro de la bifurcación (indicado con flecha amarilla y rodeado por una línea discontinua). Escala: 1 cm. Modificado de López-Barneo et al., 2016c. **B)** Representación esquemática que muestra la estructura y organización de un glomérulo o agrupación de células glómicas en el CC. Tomado de Nurse and Piskuric, 2013.

1.1. Anatomía del cuerpo carotídeo

El CC es un órgano de pequeño tamaño y esférico que está altísimamente irrigado, ya que hasta él llega una ramificación de la arteria carótida externa, que forma en el interior una profusa red de capilares que aportan irrigación a todas las células del parénquima (Fidone and Gonzalez, 1986; McDonald, 1981). Este parénquima del CC está organizado en agrupaciones de células llamadas glomérulos, formados a su vez principalmente por células glómicas o tipo I, que como se explicará más adelante, son las principales responsables de la función quimiorreceptora del órgano (De Caro et al., 2012; López-Barneo et al., 2009). Las células glómicas tienen fenotipo neuroendocrino, y expresan marcadores de neurona catecolaminérgica, como la tirosina hidroxilasa (TH), la dopamina descarboxilasa (DDC), la beta III-tubulina (Tuj1), el *protein gene product 9.5* (PGP9.5), o los neuromoduladores neuropéptido Y (NPY) y serotonina (5-HT) entre otros (Kameda, 2002, 2006; Kameda et al., 2012; López-Barneo et al., 2009; Ortega-Sáenz et al., 2013). Como otras células neuroendocrinas, las células glómicas contienen numerosas vesículas secretoras en su citoplasma, que liberan al medio extracelular tras la llegada de los estímulos. Estas vesículas están llenas de neurotransmisores y neuromoduladores como dopamina (DA), acetilcolina (ACh), adenosín trifosfato (ATP), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), adenosina (ADO), encefalinas, NPY, galanina, endotelina (ET-1), adrenomedulina, leptina, etc. (Biscoe, 1971; De Caro et al., 2012; López-Barneo et al., 2016a). Algunos de estos neurotransmisores son de tipo excitatorio, otros son inhibitorios, y muchos de ellos son neuromoduladores que modifican la función de los demás. Las células glómicas también expresan multitud de receptores de membrana tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Nurse, 2014). Otra sustancia producida en grandes cantidades por las células glómicas del CC es el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF; *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), que se ha descrito como un importante factor neuroprotector para las neuronas dopaminérgicas (Pascual et al., 2008). Esta última característica de las células glómicas se ha aprovechado para llevar a cabo investigaciones acerca del posible uso del CC en terapia celular frente a la enfermedad de Parkinson, enfermedad en la que se produce una

degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* cerebral. La terapia consiste en realizar transplantes de CC en el cerebro y aprovechar el GDNF secretado por las células glómicas para recuperar las neuronas dañadas, aliviando así los síntomas de la enfermedad en modelos animales parkinsonianos (Muñoz-Manchado et al., 2013; Toledo-Aral et al., 2003; Villadiego et al., 2005).

Un segundo tipo celular presente en los glomérulos del CC son las células sustentaculares o tipo II. Estas células tienen forma fusiforme y se encuentran en la periferia de los glomérulos, en una proporción de 1:4 respecto a las células glómicas. Las células tipo II proyectan prolongaciones que envuelven a las demás células del glomérulo, motivo por el cual clásicamente se ha creído que su función era meramente de mantenimiento trófico y sostenimiento físico de las células glómicas (De Caro et al., 2012; McDonald, 1981; Nurse, 2014). Las células sustentaculares tienen además fenotipo glial, expresando marcadores típicos de células gliales como la proteína ácida fibrilar derivada de la glía (GFAP; *Glial Fibrillary Acidic Protein*), la Vimentina, o las proteínas S100 (Kameda, 2006; Kameda et al., 2008; Nurse and Fearon, 2002). Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que estas células son algo más que simples células de sustento, ya que se ha descubierto que constituyen una población de células madre multipotentes en el CC, con capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia distintos tipos celulares, tanto células glómicas (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014), como células vasculares (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016).

Otro componente importante del parénquima neural del CC, con un papel fundamental en la función fisiológica del órgano, es la inervación (Fig. 1B). El CC recibe inervación de dos tipos, el 95% es sensorial aferente, proveniente del nervio del seno carotídeo. Se trata de fibras sensoriales derivadas de neuronas sensitivas cuyos somas se encuentran en el ganglio petroso, y que proyectan sus axones bipolares hacia el CC por un lado, y a través del nervio glossofaríngeo o par craneal IX hacia el cerebro por otro. Es esta inervación la que envía la información quimiorreceptora detectada por las

células glómicas hacia el sistema nervioso central (SNC), participando en la función reguladora de la respiración (De Caro et al., 2012; Fidone and Gonzalez, 1986; Nurse, 2014). El resto de inervación presente en el CC es eferente, del sistema nervioso autónomo (SNA), mayoritariamente simpática pero también parasimpática, proveniente de los nervios ganglioglomerulares del ganglio cervical superior (GCS). Esta inervación eferente juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo (Fidone and Gonzalez, 1986; McDonald and Mitchell, 1975; Nurse, 2014).

1.2. Origen embrionario del CC: la cresta neural

La cresta neural es una estructura embrionaria que sólo existe en vertebrados, es pluripotente y transitoria, y se forma durante los estadios más tempranos del desarrollo del sistema nervioso (Le Douarin et al., 2004). Durante las primeras fases del desarrollo neural, el ectodermo (capa externa del embrión) se compartimentaliza para acabar formando el tubo neural. Como consecuencia de esta compartimentalización, el ectodermo se divide en tres regiones: ectodermo neural o placa neural, que dará lugar al tubo neural y por tanto al sistema nervioso central, el ectodermo no neural, que formará la epidermis, y las células que se encuentran en el borde entre el ectodermo neural y el no neural que en su mayoría darán lugar a la cresta neural (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). En la fase llamada de *inducción*, el tejido neural se pliega sobre sí mismo para formar el tubo neural, en un proceso denominado *neurulación* (Fig. 2A). Es entonces cuando las células del borde de la placa neural se doblan para formar el pliegue y se delaminan, quedando así situadas generalmente en la zona dorsal del tubo neural, lugar desde el cual iniciarán la migración típica de la cresta neural (Gammill and Bronner-Fraser, 2003). Para llevar a cabo la migración, estas células sufren una transición epitelio-mesenquimal que las individualiza y las prepara para migrar (Le Douarin et al., 2004). Cambios tanto en el entorno de estas células como en sus receptores de membrana hacen que puedan migrar hacia los distintos destinos y dar lugar a las distintas estructuras específicas de la cresta neural (Le Douarin et al., 2004; Saito et al., 2012).

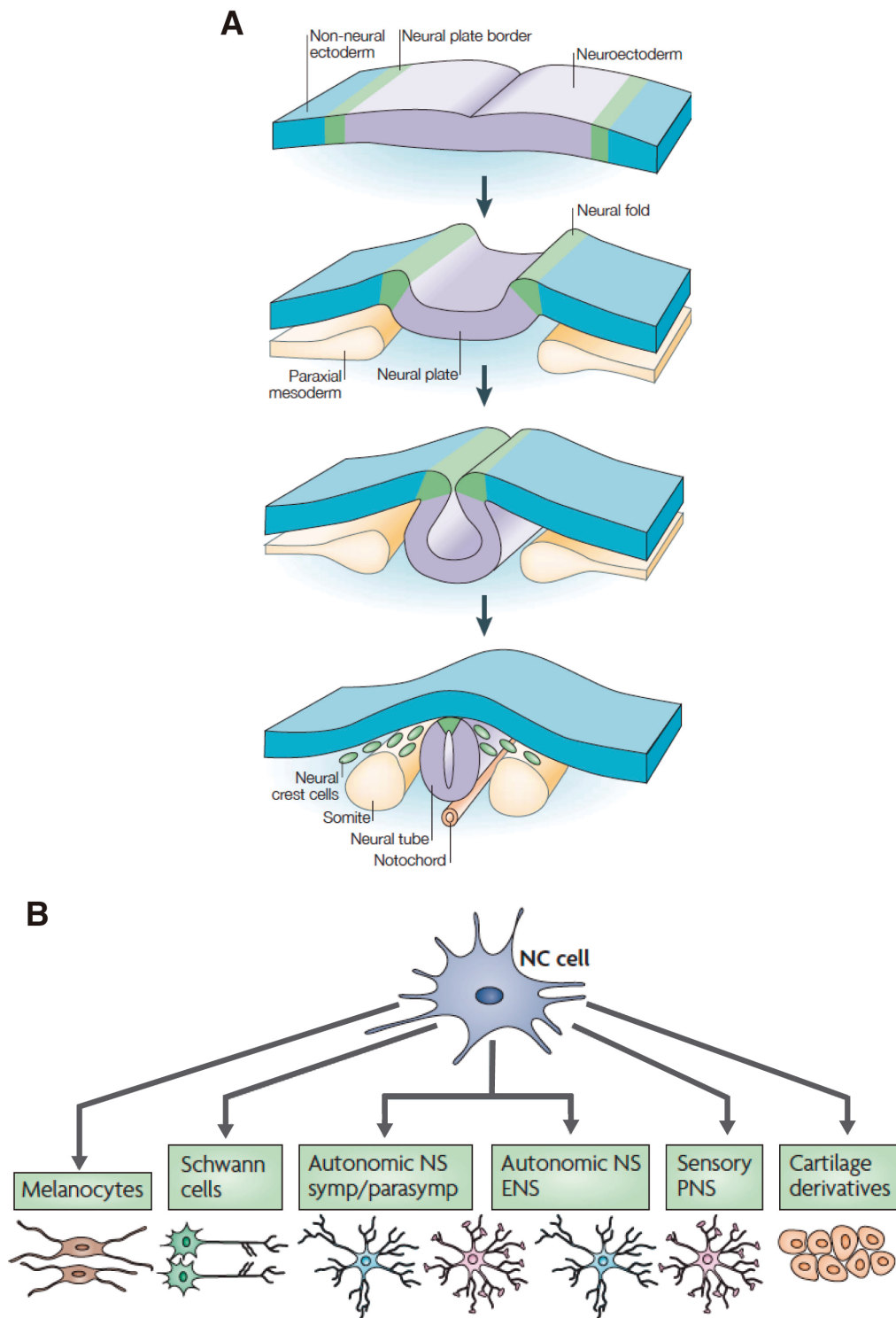


Figura 2. Desarrollo de la cresta neural y diferenciación.

A) La formación de la placa neural se induce por señalización del neuroectodermo (morado) y del ectodermo no neural (azul). Durante la neurulación los bordes de la placa neural (en verde) se elevan y se pliegan para cerrar el tubo neural. Las células de la cresta neural se delaminan del pliegue neural y de la zona dorsal del tubo neural. Modificado de Gammill and Bronner-Fraser, 2003. **B)** Las células de la cresta neural dan lugar a una gran variedad de tipos celulares en el organismo adulto, incluyendo melanocitos, células de Schwann gliales, neuronas del sistema nervioso periférico, e incluso algunos derivados mesectodérmicos. Modificado de Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008.

Son muchas y muy variadas las estructuras a las que da lugar la cresta neural (Fig. 2B), y varios los procesos de señalización implicados, por ejemplo la señalización por *Wnt-β-catenin* que da lugar al SNP sensorial, la señalización *Notch-Delta* que da lugar a las células de Schwann, o la señalización por BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) que promueve la formación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), tanto de su rama simpática como de la parasimpática (Sauka-Spengler and Bronner-Fraser, 2008).

Durante la formación del SNA, los progenitores de la cresta neural que darán lugar a los ganglios simpáticos migran ventralmente hacia la aorta dorsal, el primer vaso que se forma en el embrión. Estas células de la cresta neural se especifican en las inmediaciones de la aorta hacia lo que se conoce como el linaje Simpatoadrenal, y se segregan en dos tipos celulares, el linaje simpático, que formará principalmente los ganglios simpáticos, y el linaje adrenal, que dará lugar a la médula adrenal (Saito et al., 2012) y también a los paraganglios, las glándulas paratiroideas, y el cuerpo carotídeo (Langley and Grant, 1999). Los progenitores de la cresta neural que dan lugar al linaje simpatoadrenal se especifican bajo el control de la aorta dorsal, que produce una señalización con tres tipos de citoquinas: BMPs, SDF1 (*Stroma cell-Derived Factor 1*) y Neuregulin 1 (Saito et al., 2012). Estos progenitores simpatoadrenales iniciales expresan el antígeno de superficie HNK-1 (*Human Natural Killer-1*), el cual se expresa de forma genérica en la cresta neural durante la migración, y también se puede encontrar en otros tipos celulares del organismo adulto (Bronner-Fraser, 1987). En el siguiente apartado se describirá con más detalle la naturaleza del marcador HNK-1, dada su importancia para este trabajo de tesis doctoral. Por último, en respuesta a las señalizaciones de la aorta dorsal, los precursores de la cresta neural expresan otros factores de transcripción más específicos del linaje simpatoadrenal tales como Mash1, Phox2a, o Phox2b, y comienzan a diferenciarse hacia progenitores simpatoadrenales que expresan ya catecolaminas y marcadores neurales como la TH, el SCG10, o el receptor de GDNF c-Ret (Huber, 2006; Kameda, 2005, 2014).

1.2.1. El antígeno de superficie HNK-1

El antígeno HNK-1 es un glicopéptido que se encuentra en la membrana de las células migratorias de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, así como en otros tipos celulares adultos como las células de Schwann y algunas poblaciones de leucocitos (Bronner-Fraser, 1987). Este marcador suele estar siempre asociado a glicoproteínas que intervienen en funciones de adhesión, como NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*), tenascina, o laminina (Langley and Grant, 1999). Se cree que el propio epítipo HNK-1 media en las interacciones célula-célula o célula-sustrato, teniendo un papel importante en la adhesión celular (Nagase et al., 2003). De forma consistente, una de las funciones principales que se le atribuye a este antígeno es la de participar en la migración de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, y se ha demostrado que su presencia es fundamental para el correcto desarrollo de la migración en la cresta neural de las aves (Bronner-Fraser, 1987).

La expresión del antígeno HNK-1 se ha visto que puede variar de una especie a otra. Se encuentra por ejemplo presente en la mayoría de células de la cresta neural del embrión de la rata (Nagase et al., 2003), donde se ha visto que también tiene un papel importante para la migración. En otras especies, como perro, cerdo, o humano, HNK-1 también marca las células de la cresta neural en su totalidad (Huang et al., 2016; Kerosuo et al., 2015; Tucker et al., 1988). Sin embargo, este epítipo no se expresa en células de la cresta neural de ratón, ni en anfibios (Nagase et al., 2003; Tucker et al., 1988). Es por esto que recientemente se ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar los estudios de la cresta neural en células humanas, a pesar de los problemas éticos, y se ha recomendado utilizar con precaución el modelo de ratón, ya que puede llevar a conclusiones no siempre extrapolables a la especie humana (Huang et al., 2016).

1.2.2. Formación embrionaria del CC

El desarrollo embrionario del cuerpo carotídeo se describió por primera vez en modelos de ave (Le Douarin et al., 1972; Kameda et al., 1994). En estos trabajos se demostró que el primordio inicial del CC se forma a partir de células

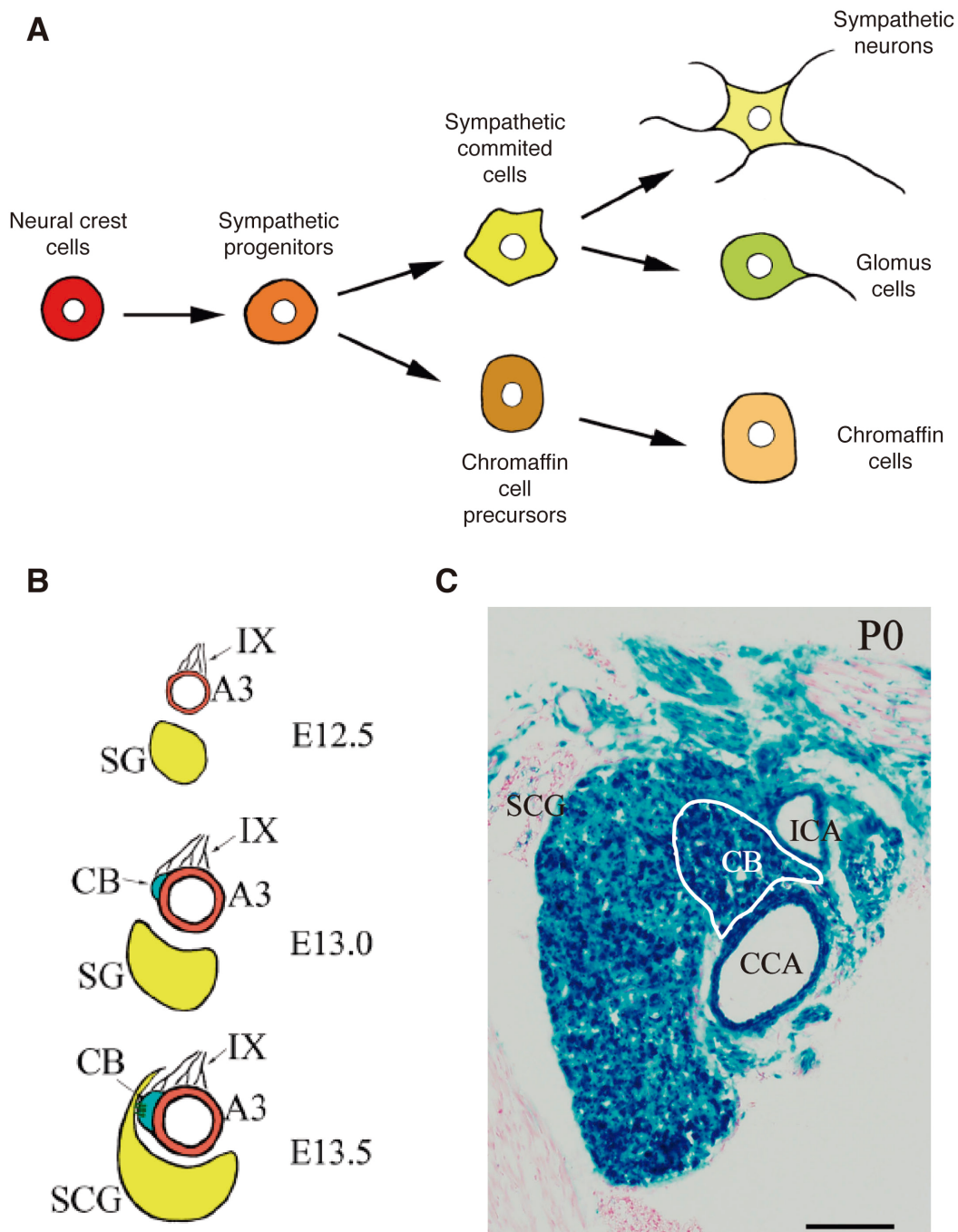


Figura 3. Formación de CC a partir de células de la cresta neural.

A) Representación esquemática de derivados de la cresta neural que dan lugar a las células glómicas del CC. Modificado de Kameda, 2014. **B)** Ilustración de los tres pasos fundamentales en la formación del CC: 1.- Inervación de la zona del tercer arco arterial (A3) por el nervio glossofaríngeo (IX) a día 12.5 del desarrollo embrionario; 2.- Formación del primordio del CC (CB) en la zona inervada a día 13.0; y 3.- Llegada de los precursores neurales desde el ganglio cervical superior (SCG) e invasión del primordio a día 13.5. Tomado de Kameda, 2014. **C)** Tinción de X-Gal para la detección de β -galactosidasa en derivados de la cresta neural (en azul), correspondiente a la bifurcación carotídea a nivel del CC (CB) de un ratón transgénico *Wnt1-Cre/R26R*, en el día de su nacimiento (P0). CCA, arteria carótida común (del inglés *Common Carotid Artery*); ICA, arteria carótida interna (del inglés *Internal Carotid Artery*) Escala: 180 μ m. Modificado de Kameda, 2014.

mesenquimales de la pared del tercer arco aórtico, y este primordio es posteriormente invadido por células de la cresta neural con marcadores neurales (TuJ1, PGP9.5. y HNK-1), procedentes del ganglio distal vagal, que más tarde se convertirán en células glómicas. Posteriormente se describió en detalle la formación del CC gracias al uso de animales transgénicos en modelo de ratón. Previo a la formación del primordio del CC se ha descrito que fibras sensoriales del nervio glosofaríngeo, en el día E12.5 del desarrollo embrionario, se distribuyen en torno al tercer arco arterial, en la zona donde posteriormente se formará el primordio del cuerpo carotídeo. En mutantes en los que falla esta inervación, el primordio no se forma correctamente (Kameda, 2014; Kameda et al., 2008). A día E13.0 se aprecia el primer rudimento del CC de ratón, por agregación de las células de la pared medial del tercer arco arterial (que posteriormente formará la arteria carótida interna), que derivan también de la cresta neural (Kameda, 2014; Kameda et al., 2002). Este primordio se cree que está formado por células sustentaculares, ya que expresan marcadores gliales como S100, y posteriormente GFAP y vimentina (Kameda, 2005). El primordio se ve primero rodeado por fibras nerviosas procedentes del GCS. Posteriormente, a día E13.5, células procedentes del mismo GCS, y por tanto de la cresta neural, migran hasta el primordio del cuerpo carotídeo, lo rodean, y lo invaden (Kameda, 2014; Kameda et al., 2002). Estas células expresan marcadores de tipo neuronal como TuJ1, PGP9.5, TH y NPY (y en otros modelos animales también expresan HNK-1), al igual que las neuronas simpáticas del GCS, y por tanto se considera que son los precursores neuronales que darán lugar a las células glómicas (Kameda, 2014; Kameda et al., 2002). Por tanto, se puede considerar que hay tres elementos que son fundamentales en el proceso de formación del CC (Fig. 3B): primero, las fibras sensoriales del nervio glosofaríngeo, que preparan la zona de la pared del tercer arco arterial para que se comience a formar el primordio del CC; segundo, el tercer arco arterial, que proporciona las células mesenquimales que fundan el primordio, y que podrían dar lugar a las células sustentaculares; y tercero, el ganglio cervical superior, que proporciona los precursores de las células glómicas, además de las fibras nerviosas simpáticas que inervan el primordio (Kameda, 2014).

1.3. Fisiología del cuerpo carotídeo

La principal función del CC en el organismo es la de actuar como quimiorreceptor arterial periférico, detectando los niveles en sangre de moléculas como el O₂, el CO₂, la glucosa, etc. En el caso de la PO₂, el CC es especialmente importante ya que es el responsable de comunicar situaciones de hipoxia al SNC, el cual generará una respuesta primaria hiperventilatoria para recuperar los niveles de O₂ (De Caro et al., 2012; López-Barneo et al., 2016). Cuando la presión parcial arterial de oxígeno baja de unos 60mmHg se estimulan las células glómicas, que son el componente quimiorreceptor principal del CC. Estas células neuronales comunican el estímulo a los terminales sensitivos aferentes, que a su vez mandan la señal a través del nervio del seno carotídeo y del nervio glossofaríngeo o par craneal IX hasta el Núcleo del Tracto Solitario (NTS), en el tronco del encéfalo. Desde este núcleo neuronal se transmite la señal quimiorreceptora al grupo respiratorio ventral (VRG; *Ventral Respiratory Group*) y al complejo pre-Bötzinger, que son las regiones del cerebro donde se genera el ritmo respiratorio. Las neuronas del VRG envían proyecciones premotoras y motoras a los músculos respiratorios como el diafragma y los músculos intercostales, y de esta forma se modifica el ritmo respiratorio en base a la información detectada por el CC (Chang et al., 2015) (ver esquema en Figura 4B). El elemento quimiorreceptor principal del CC, como ya se ha mencionado, son las células glómicas, que funcionan como receptores arteriales polimodales, capaces de activarse por varios tipos de estímulos, entre ellos el principal la hipoxia, en la cual centraremos nuestro trabajo.

Las células glómicas son células excitables, ya que contienen varios tipos de canales dependientes de voltaje en su membrana, incluidos los de K⁺. Al ser células parcialmente despolarizadas en situación basal, algunos de estos canales de K⁺ permanecen abiertos en condiciones de normoxia, y es la llegada del estímulo hipóxico lo que los inhibe y hace que se cierren (Ganfornina and López-Barneo, 1991; López-Barneo et al., 2008; López-Barneo J. et al., 1988). Al disminuir bruscamente la salida de K⁺, las células se despolarizan aún más, por lo que se abren canales de calcio dependientes de

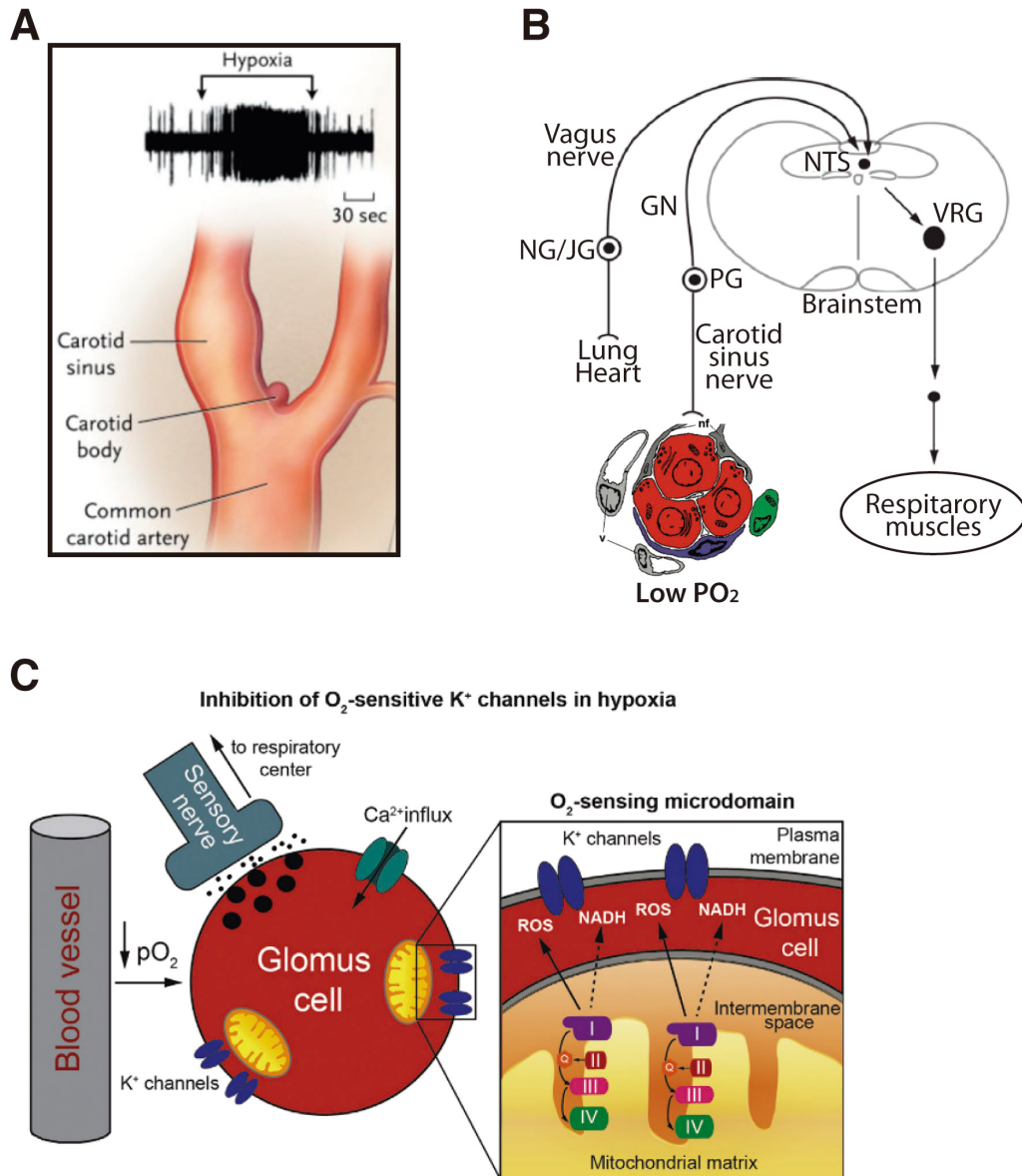


Figura 4. Respuesta fisiológica a hipoxia aguda.

A) El CC localizado en la bifurcación de la arteria carótida incrementa la frecuencia de disparo de potenciales de acción en el nervio del seno carotídeo en respuesta a hipoxia. Tomado de Weir et al., 2005. **B)** La señal proveniente del CC viaja por el nervio del seno carotídeo, atraviesa el ganglio petroso (PG, del inglés *Petrosal Ganglion*), y por el nervio glossofaríngeo (GN, del inglés *Glossopharyngeal Nerve*) llega al Núcleo del Tracto Solitario (NTS) en el sistema nervioso central. De ahí se comunica al Grupo respiratorio ventral (VRG, del inglés *Ventral Respiratory Group*), donde se encuentran las motoneuronas que activan a la musculatura del diafragma y los músculos intercostales, para activar la respuesta hiperventilatoria. Tomado de Chang et al., 2015. **C)** Modelo del mecanismo quimiotransductor de la hipoxia en el CC. Cuando bajan los niveles de oxígeno en la célula glómica, la cadena de transporte de electrones de la mitocondria genera especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y nucleótidos de pirimidina reducidos (NADH). Estas moléculas se acumulan inhibiendo la apertura de los canales de K^+ que se encuentran cercanos a las mitocondrias. La célula se despolariza, entra calcio, y se activa la excitación de los neurotransmisores. Tomado de Fernández-Agüera et al., 2015.

voltaje y se produce una entrada de Ca^{2+} extracelular que lleva a un incremento drástico del Ca^{2+} citosólico (López-Barneo et al., 2008; Ureña et al., 1994). Este aumento de Ca^{2+} es el estímulo que desencadena el proceso de exocitosis de neurotransmisores por parte de la célula glómica hipóxica (López-Barneo et al., 2008; Montoro et al., 1996; Ureña et al., 1994). Este mecanismo quimiotransductor es utilizado por la célula glómica para comunicar la situación de hipoxia a los nervios sensoriales del seno carotídeo, desencadenándose así la respuesta anteriormente descrita.

Hasta hace muy poco se desconocía cómo la célula glómica era capaz de detectar la disminución de los niveles de oxígeno en sangre para provocar el cierre de los canales de K^+ . Recientemente, se ha propuesto que es la mitocondria, y concretamente el complejo mitocondrial I (MCI; *Mitochondrial Complex I*) de la cadena de transporte de electrones, la responsable de la sensibilidad a hipoxia (Fernández-Agüera et al., 2015) (Fig. 4C). Al detectarse la hipoxia en las mitocondrias de las células glómicas, se ralentiza la cadena de transporte de electrones y se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que afectan a la apertura de los canales de K^+ que se encuentran cercanos a las propias mitocondrias, formándose así “microdominios sensibles a O_2 ”. Gracias a este descubrimiento reciente, se ha podido concluir la descripción del mecanismo de quimiotransducción en la célula glómica, completándose así nuestro conocimiento sobre el papel del CC como principal quimiorreceptor de los niveles de O_2 en sangre.

Además de las respuestas a hipoxia aguda descritas en los párrafos anteriores, el CC también participa en la aclimatación fisiológica de los organismos a la hipoxia crónica, como la que se produce en individuos que suben a gran altitud (Arias-Stella and Valcarcel, 1976). Esta respuesta de aclimatación del CC, que lleva horas o días, y que se produce como consecuencia de la hipoxia mantenida, tiene lugar en paralelo a otros cambios en el organismo, como un aumento generalizado de la vascularización, un aumento de la eritropoyesis (López-Barneo et al., 2016a; Semenza, 2012), o un aumento de la sensibilidad a hipoxia de los propios quimiorreceptores (Hodson

et al., 2016). Muchos de estos cambios dependen de un grupo de factores de transcripción denominados HIFs (*Hypoxia Inducible Factors*), que actúan como principales reguladores de los genes que facilitan la respuesta a hipoxia a nivel celular (Semenza, 2012). El sistema HIF consiste en un heterodímero formado por dos subunidades, HIF- α y HIF- β . La subunidad HIF- α se regula según los niveles de oxígeno en la célula, de manera que cuando hay niveles normales de oxígeno (en torno a 100 mmHg) la subunidad es hidroxilada por las enzimas proliil-hidroxilasas (PHD), las cuales emplean al O₂ como sustrato. Una vez que HIF está hidroxilado, las proteínas VHL (von Hippel-Lindau), lo marcan para su degradación en el proteasoma. De esta manera se impide que la subunidad HIF- α se una a la subunidad HIF- β . En situación de hipoxia (<80 mmHg), las proliil-hidroxilasas no encuentran sustrato para hidroxilar a la subunidad HIF- α , por lo que ésta se estabiliza y se trasloca al núcleo para unirse a la subunidad HIF- β . Una vez formado, el heterodímero de HIF activará la transcripción de sus genes diana, es decir, genes que contengan secuencias HRE (*Hypoxia Responsive Elements*) en sus promotores (Bishop et al., 2013; Hodson et al., 2016; Semenza, 2012). En mamíferos la familia HIF- α tiene tres isoformas, de las cuales dos (HIF1- α y HIF2- α) han sido las más estudiadas. Las enzimas proliil-hidroxilasas también son tres (PHD1, PHD2 y PHD3), y se ha demostrado que todas ellas son capaces de regular las dos isoformas de HIF, aunque PHD2 es la más abundante y principal reguladora de HIF. También se conoce que HIF1- α es el principal regulador de los genes de respuesta a hipoxia (Hodson et al., 2016).

La adaptación del organismo a hipoxia crónica requiere de adaptación por parte del propio CC, el cual se ha demostrado que tras varios días en hipoxia crece de tamaño, gracias a una hipertrofia del parénquima neurosecretor y un aumento de su vascularización (Bisgard, 2000; Hodson et al., 2016). Estas modificaciones anatómicas y neuroquímicas del CC, esenciales para la adaptación a la hipoxia crónica, se deben en gran medida a su funcionamiento como nicho neurogénico adulto, y han constituido el objeto principal del presente trabajo de tesis doctoral. A continuación se introducen los nichos neurogénicos de células madre neurales, incluido el del CC adulto, para

facilitar la comprensión de nuestro estudio del nicho neurogénico de este órgano quimiorreceptor.

2. NICHOS NEUROGÉNICOS

El concepto de nicho de células madre fue propuesto por primera vez por Raymond Schofield (Schofield, 1978), para definir el microambiente especializado en el que residen las células madre hematopoyéticas, que incluye interacciones con otras células y con otras moléculas de alrededor. Estas señales del ambiente pueden controlar la capacidad de autorrenovación, proliferación y diferenciación de las células madre, a través de factores solubles o no solubles, moléculas ligadas a la membrana y/o a la matriz extracelular, etc. Estos factores reguladores pueden incluso derivar de las propias células madre, de los progenitores que producen, o de células vecinas de diverso tipo: endoteliales, musculares, fibroblásticas, etc. (Fuchs et al., 2004; Lim and Alvarez-buylla, 2016; Watt and Hogan, 2000).

Las células madre se clasifican generalmente según su potencial de diferenciación. Las de mayor potencialidad son las células madre totipotentes, capaces de dar lugar a un organismo completo y que se encuentran en el cigoto. Por otro lado están las células madre pluripotentes, que están más restringidas ya que pueden dar lugar a cualquier célula del organismo pero no a los tejidos extraembrionarios como la placenta. Es el caso de las células madre embrionarias, presentes en la masa celular interna del blastocisto. Por último están las células madre multipotentes, que engloban al resto de células madre, incluidas las adultas y específicas de tejido, y que se asume que tienen capacidad para dar lugar a cualquier tipo celular del tejido en el que residen (Gage, 2000). Este último caso es el de las células madre neurales, consideradas progenitores multipotentes, capaces de diferenciarse hacia típicos derivados neurales como las neuronas o las células de la glía (Temple, 2001). Los nichos neurogénicos son las zonas donde residen las células madre neurales (NSCs; del inglés *Neural Stem Cells*). La definición de célula madre neural incluye la capacidad de autorrenovación, y la capacidad de diferenciación hacia tipos celulares neurales como las neuronas o la glía

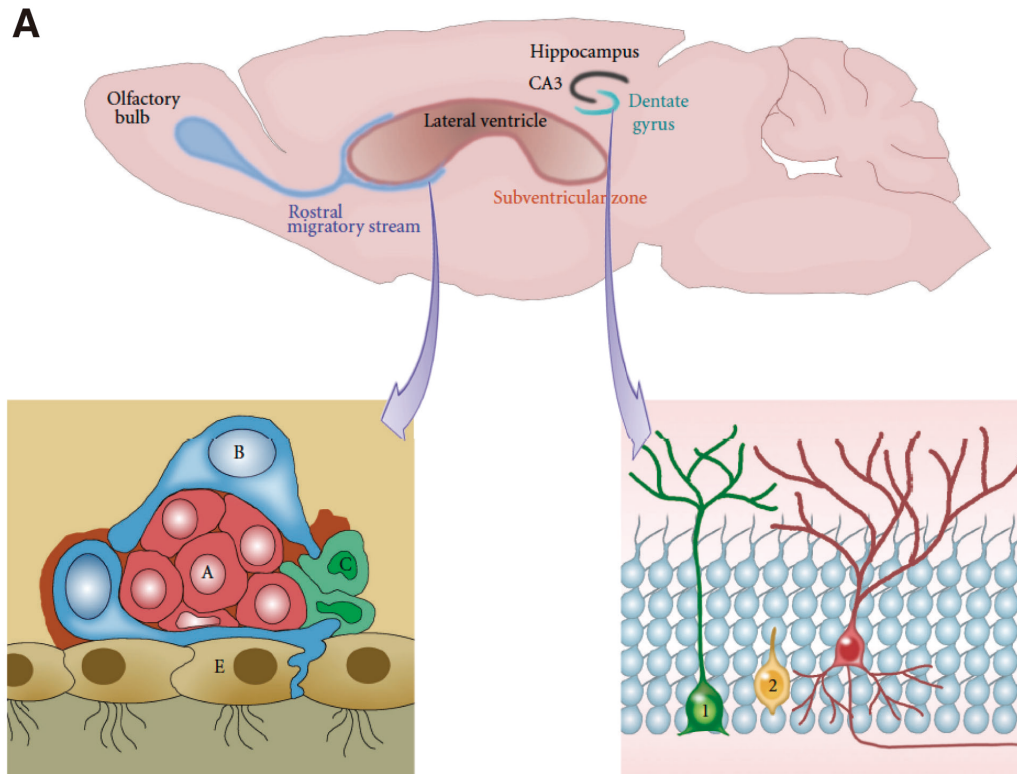


Figura 5. Nichos neurogénicos descritos en el cerebro adulto de roedor.

A) Ilustración de un corte sagital de cerebro de ratón, en la que se indican las dos zonas identificadas como nichos neurogénicos: la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del Hipocampo. Abajo a la izquierda se muestra un esquema de la organización y tipos celulares del nicho de la SVZ, donde se representan las células madre del nicho en azul, los progenitores intermedios en verde y los neuroblastos en rojo. Abajo a la derecha se representa la organización del nicho de la SGZ, con la célula madre en verde, el progenitor intermedio en amarillo, y la neurona madura en rojo. Tomado de Dias et al., 2012.

(Gage, 2000). En el SNC existen dos nichos neurogénicos bien identificados y caracterizados (Fig. 5), la zona subventricular (SVZ, *SubVentricular Zone*) junto a los ventrículos laterales, y la zona subgranular (SGZ; *SubGranular Zone*) del hipocampo (Dias et al., 2012; Gage, 2000; Silva-Vargas et al., 2013). También se han descrito nichos neurogénicos en el SNP (Temple, 2001), como es el caso del nicho neurogénico del CC.

2.1. Nichos neurogénicos del SNC

En el cerebro adulto de los vertebrados hay NSCs que generan neuronas a lo largo de toda la vida del individuo. Curiosamente, estas NSCs adultas muestran marcadores típicos de células de tipo glial, por lo que clásicamente se les ha confundido con células gliales (Chaker et al., 2016).

2.1.1. El nicho neurogénico de la SVZ

El cerebro de los mamíferos contiene cavidades, llamadas ventrículos, llenas de líquido cefalorraquídeo (LCR). En las paredes de los ventrículos laterales es donde se encuentran los nichos germinales de la SVZ (Mirzadeh et al., 2008; Ponti et al., 2013) (esquema en Figura 6). En el cerebro de los roedores, varios miles de NSCs se distribuyen a lo largo de las paredes laterales de los ventrículos. Estas células tienen capacidad para generar astrocitos, oligodendrocitos y neuronas, siendo estas últimas de tipo interneuronas y además específicas del bulbo olfatorio. Estas NSCs de la SVZ reciben el nombre de células tipo B, y poseen características morfológicas similares a los astrocitos del cerebro, los cuales son células gliales conocidas por tener funciones de soporte sobre las neuronas (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et al., 1999). Las células B se pueden subdividir en dos grupos basándose en su morfología y en su distinta localización: las células B1 y B2 (Doetsch et al., 1997). Las **células B1** tienen un citoplasma más claro y su morfología es radial. Se encuentran en la zona apical del nicho, en contacto con el ventrículo, y suelen estar gran parte del tiempo en estado quiescente. Se les considera las NSCs del nicho (Chaker et al., 2016). Las **células B2** tienen un citoplasma más oscuro, una forma más dendrítica, y no contactan con el ventrículo sino que se encuentran frecuentemente próximas al parénquima del estriado, y cerca de los vasos sanguíneos (Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011). Estas células se dividen activamente y se les considera verdaderos astrocitos presentes en el nicho (Chaker et al., 2016).

Las células B1 proyectan un cilio primario corto y no móvil hacia dentro del ventrículo, gracias a unos finos procesos celulares que quedan rodeados por las células ependimales que tapizan la superficie del ventrículo. Estas estructuras, llamadas “ruedas de molino” (Mirzadeh et al., 2008), se ven alteradas, por ejemplo mediante la pérdida del cilio central, cuando las NSCs entran en división. Además, estas células madre subventriculares también forman conexiones tanto con el epéndima como con otras células B1, a través de *gap junctions* (Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011). En el extremo opuesto, las células B1 contactan con la lámina basal y con la vasculatura a través de unos

A

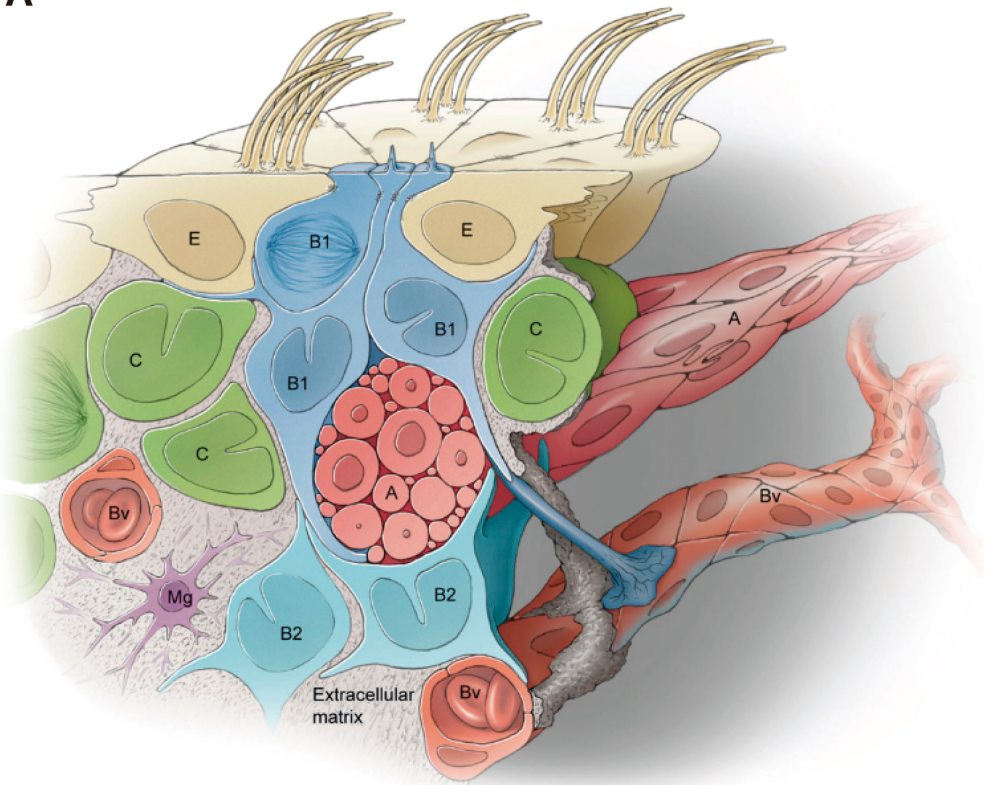


Figura 6. Organización celular del nicho de la SVZ.

A) En esta ilustración se pueden apreciar los principales tipos celulares que componen el nicho de la SVZ, y su organización estructural. Las células madre quiescentes (B1, en azul), se disponen en contacto con el ventrículo por un extremo, y por el otro con los vasos sanguíneos (Bv). Las células endoteliales (E, en beige), que contienen cilios que proyectan hacia el líquido cefalorraquídeo, se organizan rodeando las proyecciones de las células B1, en estructuras en forma de “ruedas de molino”. Las células B2 (celeste), con características astrocitarias, se dividen activamente en el nicho y no contactan con el ventrículo. Las células tipo C (verde) son los progenitores intermedios del nicho, altamente proliferativos. Y las células tipo A (en rojo) son los neuroblastos migratorios, que forman las cadenas de migración rostral hacia el bulbo olfatorio. Otros componentes del nicho serían la matriz extracelular (en gris) y la microglía (Mg, en morado). Tomado de Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011.

pies terminales que se depositan sobre los vasos sanguíneos (Lim and Alvarez-buylla, 2016).

Uno de los problemas clásicos a la hora de estudiar y caracterizar a las células madre neurales es la falta de marcadores específicos que faciliten su identificación. Las NSCs de la SVZ expresan marcadores gliales tales como GFAP, GLAST (del inglés *Glutamate Aspartate Transporter*) y BLBP (del inglés *Brain Lipid-Binding Protein*). De hecho, por el momento no se ha encontrado ningún marcador que sea exclusivo de las células B1. El marcador GFAP por

ejemplo, se expresa en las células B1 pero también en astrocitos “no neurogénicos” del cerebro. El marcador CD133 sirve para separar una población enriquecida en NSCs de la SVZ pero también lo expresan algunas células endoteliales (Beckervordersandforth et al., 2010; Lim and Alvarez-buylla, 2016; Mirzadeh et al., 2008). El antígeno de superficie SSEA-1 (del inglés *Stage-Specific Embryonic Antigen-1*) o CD15 también parece que marca a las NSCs de la SVZ, pero también se ha visto que marca algunas células GFAP negativas y algunos neuroblastos. El receptor para EGF (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) se encuentra igualmente en las células B1 activadas pero también en los progenitores intermedios (Lim and Alvarez-buylla, 2016; Pastrana et al., 2009). Por otro lado la proteína filamentosa nestina, que siempre se había considerado un marcador de células madre, se ha visto que se expresa sólo en las células B1 activadas y no en las quiescentes, por lo que al usar este marcador se podría subestimar la población total de células B1. Por todo ello, la identificación de las NSCs requiere normalmente del uso combinado de varios marcadores, prestando especial atención a los niveles de expresión de cada marcador. A pesar de las dificultades técnicas, recientemente se han conseguido aislar prospectivamente las poblaciones de NSCs tanto quiescentes como activadas de la SVZ (Codega et al., 2014).

Las células B1 activadas pueden llevar a cabo divisiones asimétricas para auto-renovarse, y producir de esta forma células tipo C, es decir, progenitores intermedios (TAPs; del inglés *Transient Amplifying Progenitors*) (Ortega et al., 2013a, 2013b). Por último, las células B1 de la SVZ pueden dar lugar también a otros tipos celulares de linaje glial, como son los oligodendrocitos y los astrocitos no neurogénicos, aunque en mucho menor número que neuronas (Lim and Alvarez-buylla, 2016).

Las **células tipo C** o TAPs se encuentran habitualmente pegadas a sus progenitoras, sobre todo cuando están en proliferación, aunque también se suelen encontrar agrupaciones de TAPs en contacto con los vasos sanguíneos (Doetsch et al., 1999; Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011). Estas células son altamente proliferativas, y de división rápida. Generalmente se dividen unas

tres veces de forma simétrica antes de convertirse en neuroblastos o células tipo A (Ortega et al., 2013b; Ponti et al., 2013). Las células tipo C expresan el factor de transcripción *Ascl1* (también conocido como *Mash1*), y el factor *Dlx2*. Otros marcadores que también se expresan pero que no son exclusivos de estas células son *EGFR* y *GLAST*, que marcan las células tipo C pero también las tipo B1 activadas (Doetsch et al., 2002; Lim and Alvarez-buylla, 2016; Pastrana et al., 2009).

Las **células tipo A** son los neuroblastos de la SVZ. Son células migratorias, y tras su aparición a partir de las células tipo C, se unen en forma de 'cadenas', y se van moviendo a lo largo de estructuras llamadas gliotubos en dirección rostral hacia el bulbo olfatorio (OB; del inglés *Olfactory Bulb*). Esas cadenas están formadas por los propios neuroblastos migratorios, y están rodeadas por prolongaciones de las células tipo B2 (Lim and Alvarez-buylla, 2016). Las cadenas que van surgiendo de las distintas zonas de la SVZ están orientadas a lo largo del eje rostrocaudal, y se van uniendo entre sí formando una red que converge en el 'camino migratorio rostral' (RMS; del inglés *Rostral Migratory Stream*) (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996). El RMS lleva las células tipo A hasta el OB, y durante la migración los neuroblastos aún pueden sufrir una o incluso dos divisiones (Ponti et al., 2013). Una vez en el bulbo olfatorio, los neuroblastos migran radialmente hacia el exterior de la RMS, para terminar su diferenciación hacia interneuronas del OB. Estos neuroblastos parecen tener una gran capacidad migratoria. El movimiento celular que realizan para migrar es de tipo 'saltatorio', extendiendo primero un proceso con un cono de crecimiento y traslocando después el cuerpo celular hacia la punta del cono, lo que hace que puedan alcanzar una velocidad relativamente alta (Lim and Alvarez-buylla, 2016).

Las células tipo A, o neuroblastos de la SVZ, se identifican generalmente por la expresión del marcador PSA-NCAM, una molécula presente en lugares del cerebro con plasticidad neuronal, y también por la expresión de *Tuj1*, un marcador de neuroblastos (Doetsch and Alvarez-Buylla, 1996). Igualmente, se utiliza muy frecuentemente *doublecortina* (*DCX*) para marcar los neuroblastos, que curiosamente es una proteína muy importante en la migración neuronal del

embrión (Lim and Alvarez-buylla, 2016). Todos estos marcadores son bastante específicos para las células tipo A. Sin embargo, para el aislamiento prospectivo de neuroblastos funcionales ha sido necesaria una combinación de marcadores, lo que ha permitido distinguir además entre dos subtipos distintos: neuroblastos inmaduros recién formados (GLAST-/EGFR+/CD24+), y neuroblastos migratorios (GLAST-/EGFR-/CD24+) (Daynac et al., 2016).

Finalmente, la superficie de la SVZ está cubierta por una capa de células llamadas células endimales o **células tipo E**. Anteriormente, este epéndima se creía que estaba formado por simples células epiteliales que formaban una barrera entre el LCR y la SVZ (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Más tarde, se conoció la distribución en forma de ruedas de molino que forman estas células en torno a las prolongaciones de las células tipo B1, y también que la integridad de ese epéndima es fundamental para la neurogénesis en el nicho (Lim and Alvarez-buylla, 2016; Mirzadeh et al., 2008). Actualmente se conoce la importancia de este tipo celular, cada vez más estudiado, y se sabe que son células multiciliadas, que existen hasta tres tipos distintos según el número y complejidad de sus cilios, y también según la zona del nicho en la que residen. También se ha descrito que su orientación es fundamental para el movimiento del LCR, y que sus cilios intervienen en procesos importantes de señalización y regulación del nicho neurogénico. Se ha descrito incluso que la orientación de los cilios condiciona un flujo correcto del LCR, lo que establece un gradiente en las moléculas presentes en el LCR que guía a las cadenas de neuroblastos migratorios (Mirzadeh et al., 2017).

Otros componentes importantes del nicho de la SVZ son: 1) el propio LCR, con numerosas sustancias químicas disueltas y en suspensión, que actúan regulando el nicho y sobre todo a las células tipo B1; 2) la vasculatura, que contiene células endoteliales, pericitos, fibroblastos y macrófagos; 3) la lámina basal extravascular, que contacta con todos los tipos celulares del nicho y es rica en colágeno y laminina (Alvarez-Buylla and Lim, 2004); 4) la microglía, que son las células primarias del sistema inmune del cerebro; y 5) la matriz extracelular (Ihrie and Álvarez-Buylla, 2011; Lim and Alvarez-buylla, 2016).

2.1.2. El nicho neurogénico de la SGZ

La zona subgranular (SGZ; *SubGranular Zone*) se encuentra en el giro dentado (DG; *Dentate Gyrus*) del hipocampo, y está ampliamente aceptado que contiene un nicho neurogénico del cerebro adulto (Urbán and Guillemot, 2014) (Fig. 7). Se ha demostrado que existe neurogénesis en esta zona en la mayoría de los mamíferos, incluido el cerebro humano (Eriksson et al., 1998; Spalding et al., 2013). De hecho, se estima que en el DG humano se generan unas 700 neuronas nuevas cada día, que acaban integrándose en el circuito del hipocampo. Existe una explicación fisiológica para esta neurogénesis, y es que de ella depende la plasticidad del hipocampo adulto, una estructura que interviene en procesos tan relevantes como la formación de la memoria, el aprendizaje, y la regulación del comportamiento (Beckervordersandforth et al., 2015; Yu et al., 2014).

La neurogénesis del hipocampo da lugar a un único tipo neuronal, las células granulares, que son las principales neuronas excitatorias del DG. No se ha observado producción de ningún otro tipo de neurona bajo condiciones fisiológicas. Las nuevas neuronas granulares extienden sus axones a través del tracto de fibras musgosas, que se prolonga hasta el área CA3 donde hacen complejas sinapsis que proveerán de estímulos excitatorios a las células piramidales de la zona. La actividad de las neuronas granulares de nueva formación es muy escasa, y además está modulada por numerosas interneuronas del DG y del *hilus*, lo que supone una regulación muy fina (Kempermann et al., 2017).

Para formar estas neuronas granulares de estructura y función tan elaborada, la neurogénesis en este nicho requiere de unos pasos muy estereotipados. Las células precursoras de este nicho tienen también características astrocitarias y reciben el nombre de **células tipo 1** o *radial-glia like* (RGL). Estas NSCs del hipocampo extienden procesos radiales, que son GFAP+ o nestina+, a través de la capa de células granulares (NSC en Figura 7) (Beckervordersandforth et al., 2015; Kempermann et al., 2004). Las células tipo 1 poseen características de célula madre neural, pero rara vez se dividen, y

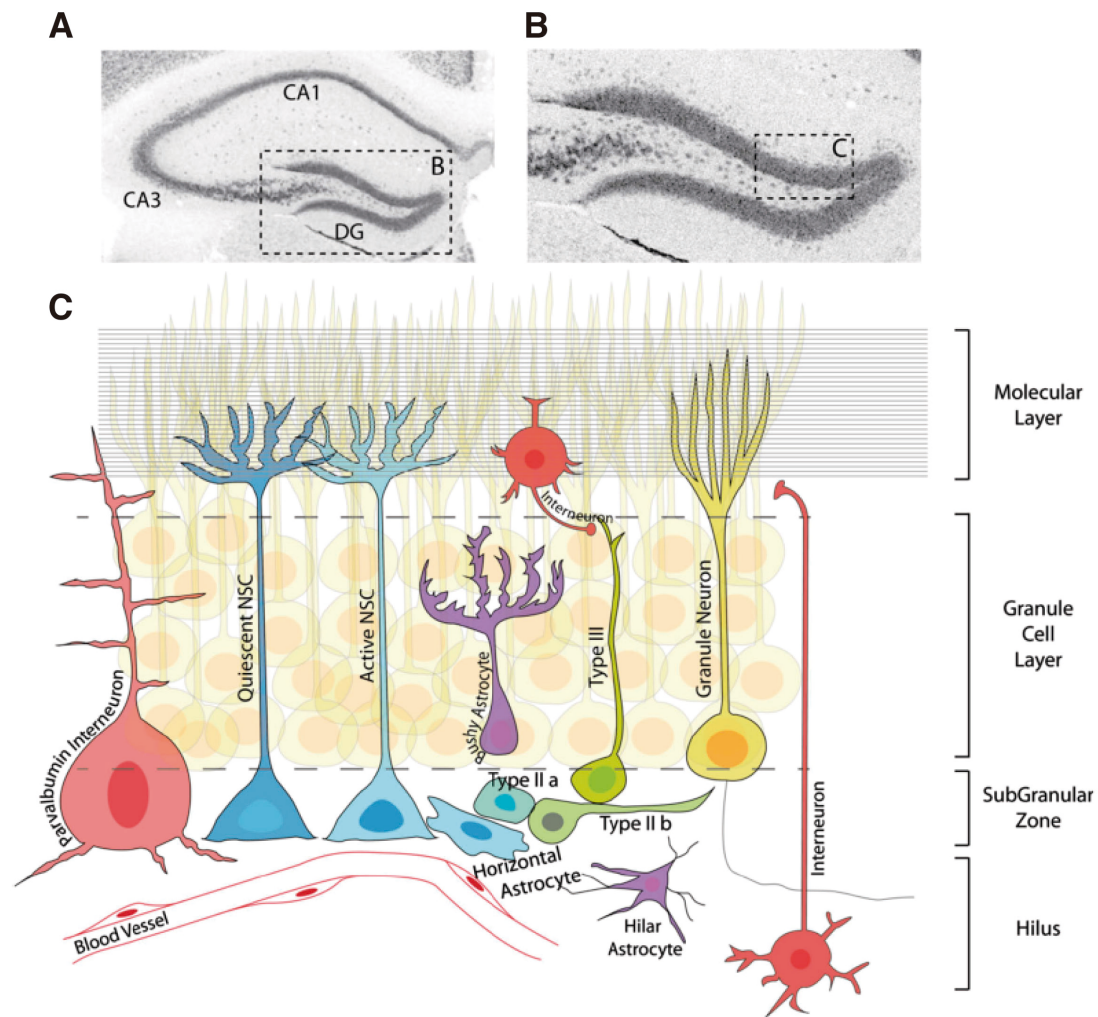


Figura 7. El nicho neurogénico de la SGZ.

A) Inmunohistoquímica del marcador neuronal NeuN, que facilita la visualización de la estructura del hipocampo adulto. **B)** Magnificación del giro dentado del hipocampo. **C)** Ilustración que muestra los distintos tipos celulares del nicho de la SGZ. Las células tipo 1 son las células madre, tanto quiescentes (azul) como activas (celeste). Las células tipo 2 son los progenitores intermedios (en color verde-azul). Y las células tipo 3 (verde) son los neuroblastos del nicho. Las neuronas granulares maduras (amarillo) extienden sus proyecciones por la capa molecular y realizan conexiones sinápticas complejas en el área CA3. Tomado de Urbán and Guillemot, 2014.

permanecen principalmente en estado quiescente (Encinas et al., 2011). Se han identificado otras células tipo 1, más activas que las tipo 1 radiales en cuanto a división, y que morfológicamente se distinguen por tener procesos cortos y horizontales.

La proliferación de las células tipo 1 da lugar a **células tipo 2**, que son los progenitores intermedios del nicho (TAPs). Estas células primero expresan características gliales (tipo 2a), como el marcador GFAP, y más tarde

comienzan a expresar marcadores neuronales como doblecortina (DCX) (tipo 2b) (Fig. 7) (Kempermann et al., 2004). Las células tipo 2 son mucho más proliferativas y conservan los procesos cortos horizontales típicos de las tipo 1 activas.

Las células tipo 2 dan lugar a las **células tipo 3**, que son los neuroblastos del nicho. Con cierta capacidad migratoria e incluso proliferativa al principio, son las células que salen de la fase proliferativa para entrar en la madurativa. Durante la maduración sufren cambios morfológicos y comienzan a extender axones y dendritas y a establecer conexiones funcionales (Fig. 7). Este tipo celular expresa los marcadores DCX y PSA-NCAM, típicos de neuroblastos, así como NeuN y la proteína de unión a calcio Calretinina (Kempermann et al., 2017).

Una vez concluida la neurogénesis en el hipocampo, tras la maduración postmitótica, se ha descrito que la mayoría de las nuevas neuronas son eliminadas mediante un proceso de apoptosis, justo antes de que formen conexiones complejas con sus dianas en el área CA3 (Kempermann et al., 2017). La maduración de las nuevas neuronas supervivientes se realizará en dos etapas. En la primera de ellas tendrán un rápido crecimiento axonal y dendrítico durante las 2-3 semanas tras su nacimiento, lo que coincide con la expresión de los marcadores DCX y calretinina, y con un ambiente rico en señalización GABAérgica activadora. Más tarde, en la segunda etapa, esta señalización ambiental se transformará en GABAérgica inhibitoria, coincidiendo con la llegada de *inputs* glutamatérgicos a la célula, que resultan fundamentales para su supervivencia. Durante esta segunda etapa, en la célula disminuyen la expresión de DCX y Calretinina, y comienza la expresión de Calbindina, proteína de unión a calcio de las neuronas maduras. En esta segunda fase de maduración, las neuronas ya muestran conexiones sinápticas complejas con las fibras musgosas, con el área CA3 y hacia el *hilus*, y también expresan evidencias electrofisiológicas de madurez, desarrollando sus propias características de neurona glutamatérgica excitatoria (Beckervordersandforth et al., 2015; Kempermann et al., 2017).

Todo el proceso de formación y maduración de nuevas neuronas en el hipocampo adulto conlleva un total de unas 7-8 semanas. Se sabe además que esta neurogénesis está regulada principalmente por actividad, siendo el ejercicio físico, la dieta, y factores a nivel cerebral como un ambiente rico en BDNF, grandes responsables de la formación y supervivencia de estas nuevas neuronas granulares (Dias et al., 2012; Yu et al., 2014). A nivel del nicho, se ha demostrado que el glutamato liberado por los astrocitos, así como factores vasculares liberados por la vasculatura del nicho (VEGF), intervienen en la regulación de la neurogénesis a nivel de la célula tipo 1. Tanto los astrocitos como la vasculatura están en contacto directo con las células tipo 1, lo que facilita este tipo de regulación (Kempermann et al., 2017; Sultan et al., 2015).

2.2. Nichos neurogénicos del SNP: células madre de la cresta neural

La cresta neural, como se ha descrito anteriormente, es una estructura embrionaria que se forma durante el cierre del tubo neural. Las células madre de la cresta neural (NCSCs, del inglés *Neural Crest-derived Stem Cells*) migran, inmediatamente después de formarse, hacia distintos tejidos diana en el embrión, para dar lugar a distintas estructuras (Le Douarin et al., 2004). Hace algunos años se demostró que algunas de estas NCSCs persisten durante algún tiempo en el embrión, sobre todo tras la migración. Las primeras NCSCs postmigratorias que se describieron fueron las del nervio ciático (Morrison et al., 1999), aunque su auténtico potencial *in vivo* no pudo ser definido. Desde entonces se han encontrado células madre en casi todos los órganos diana de la cresta neural (Dupin and Sommer, 2012). La mayoría de ellas se mantienen sólo en el tejido fetal pero algunas persisten incluso en el tejido adulto, como las NCSCs del sistema nervioso entérico (Kruger et al., 2002), las del ganglio de la raíz dorsal (Li et al., 2007), las cardíacas (Tomita et al., 2005), las dentales (Gronthos et al., 2000), y las del cuerpo carotídeo (Pardal et al., 2007). Todas ellas poseen distintas capacidades tanto proliferativas como de auto-renovación, y sobre todo son muy distintas en cuanto a su potencialidad, siendo las del cuerpo carotídeo de las más multipotentes *in vivo* (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016; Pardal et al., 2007).

2.2.1. El nicho neurogénico del CC

El cuerpo carotídeo es un órgano perteneciente al SNP, situado bilateralmente en las arterias carótidas, y derivado de la cresta neural embrionaria, que permanece activo como nicho neurogénico en el adulto. Se trata de un órgano que, como se ha indicado anteriormente, participa en la adaptación fisiológica del organismo a la hipoxia crónica mediante un aumento del parénquima neurosecretor (Fig. 8A). Este fenómeno de neurogénesis adulta carecía clásicamente de explicación desde un punto de vista celular. En la última década, nuestro grupo ha estudiado en profundidad muchos aspectos del CC como nicho germinal, consiguiendo caracterizar varios tipos celulares del nicho, incluidas células madre derivadas de la cresta neural, así como sus funciones e implicaciones fisiológicas (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016; Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014). Las primeras investigaciones a este respecto se publicaron en el año 2007 (Pardal et al., 2007), cuando se definió por primera vez el CC como nicho de células madre en el SNP adulto. En ese trabajo se caracterizaron las células madre del CC (CBSCs; del inglés *Carotid Body Stem Cells*), identificadas como las células sustentaculares o tipo II. Son células madre que, de forma similar a las NSCs del cerebro, expresan el marcador GFAP, y tienen capacidad para proliferar, para autorrenovarse y diferenciarse de forma multipotente. En ese primer trabajo se demostró diferenciación hacia dos tipos celulares, células glómicas, de fenotipo neuronal dopaminérgico (TH+) (Fig. 8B), y células de músculo liso (SMA+; del inglés *Smooth Muscle Actin*). Se demostró también en ese primer trabajo que las células madre permanecían en condiciones de quiescencia expresando el marcador GFAP, y que en respuesta a estímulos como la hipoxia se desencadenaba la activación del nicho, la salida de quiescencia de las células madre, lo que implica la pérdida del marcador GFAP y la expresión de la proteína asociada a filamentos Nestina. Durante la respuesta hipóxica, las células tipo II se convierten en progenitores intermedios proliferativos, positivos también para el marcador Nestina. Todo ello da como resultado un proceso de neurogénesis, que genera en pocos días numerosas células glómicas plenamente integradas y funcionales (Pardal et al., 2007).

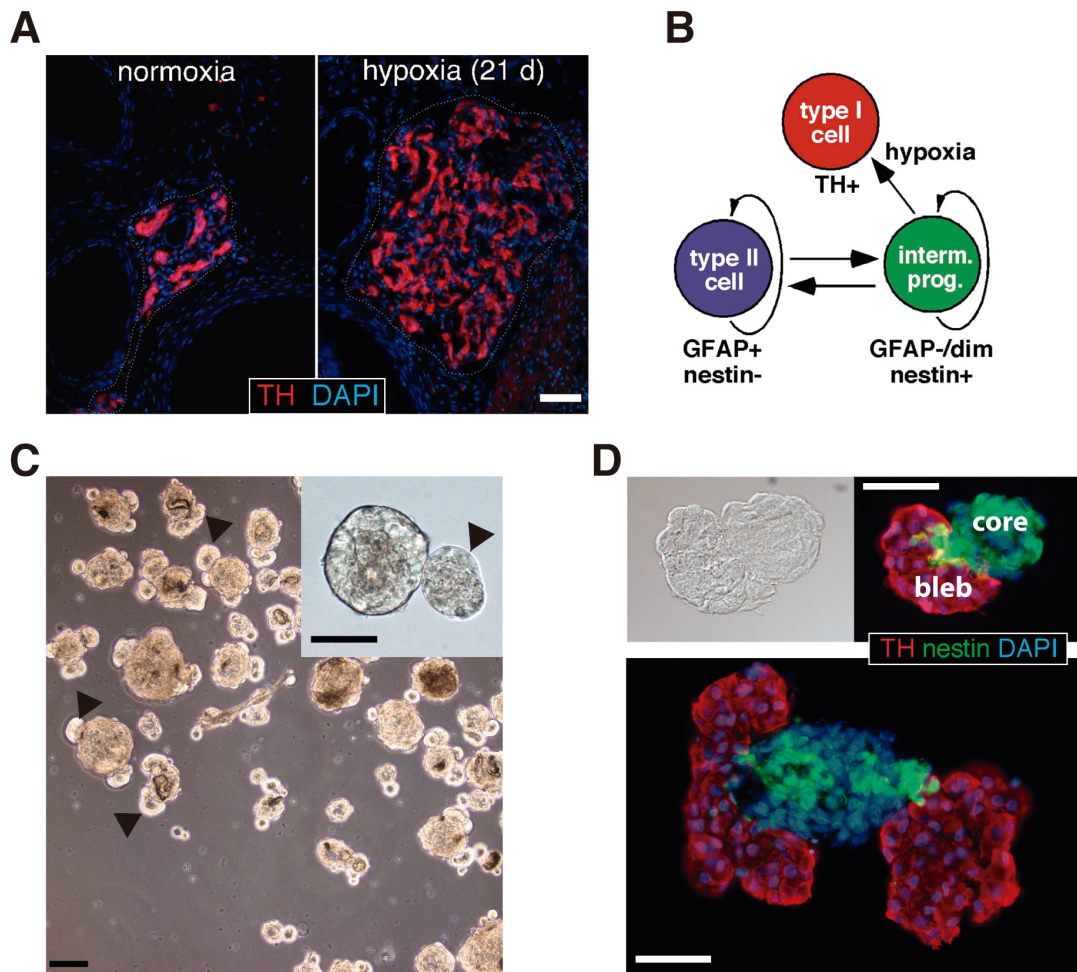


Figura 8. El nicho neurogénico del CC.

A) Imágenes de inmunohistoquímica de tirosina hidrosilasa (TH) en CC de ratón, en condiciones de normoxia (a la izquierda) e hipoxia de 21 días (a la derecha). En estas fotos se puede apreciar el aumento de tamaño del CC, así como el aumento del parénquima de células glómicas positivas para el marcador TH. Escala: 50 μ m. **B)** Esquema ilustrativo de los principales tipos celulares identificados en el CC: las células madre (tipo II, en azul), positivas para el marcador GFAP; el progenitor intermedio (verde), positivo para nestina; y la célula glómica o tipo I (rojo), positiva para TH. **C)** Foto de microscopía óptica de campo claro a neuroesferas de CC tras 10 días de cultivo en normoxia. Las puntas de flecha negra señalan las protuberancias que se forman en estas esferas, denominadas *blebs*. Escala: 100 μ m. **D)** Imágenes de microscopía a campo claro (arriba a la izquierda), y de fluorescencia (arriba a la derecha, y abajo), con marcadores para nestina y TH. En estas imágenes se puede apreciar la morfología de las neuroesferas con el *core* (nestina+) y los *blebs* (TH+). Escala: 50 μ m. Todos los paneles están tomados de Pardal et al. 2007.

La contribución de este descubrimiento de las CBSCs al funcionamiento fisiológico del CC fue muy valiosa, ya que aportó una explicación al crecimiento del órgano en respuesta a hipoxia crónica. El estudio se completó con trazados de linaje celular, utilizando un ratón GFAP-Cre/LacZ, donde se marcaron con LacZ las células tipo II y todos sus derivados. De esta forma se comprobó que las nuevas células glómicas verdaderamente derivaban de las células

sustentaculares GFAP+, y que se habían formado en respuesta al estímulo hipóxico (Pardal et al., 2007).

La capacidad proliferativa y clonogénica de las células GFAP+ se investigó mediante ensayos de neuroesferas (Fig. 8C), una técnica ampliamente extendida y reconocida en el campo de la investigación con células madre neurales (Pastrana et al., 2011). Mediante este tipo de ensayo se caracterizó la peculiar morfología de las neuroesferas obtenidas a partir de CBSCs. En estas estructuras esféricas, la diferenciación parece compartimentalizarse, encontrándose las células progenitoras en la esfera central o “core” de la neuroesfera, mientras que las células glómicas maduras se encuentran en unas protuberancias que sobresalen del núcleo central denominadas “blebs” (Pardal et al., 2007) (Fig. 8D). En estos ensayos *in vitro* también se confirmó la multipotencia de las CBSCs. Mediante el cultivo de estas esferas en condiciones de adherencia, se demostró la capacidad de diferenciación hacia células de músculo liso (SMA+), un derivado celular típico de la cresta neural (Kruger et al., 2002). Por último, también se verificó que las células glómicas generadas *in vitro* en las neuroesferas eran plenamente funcionales, mediante el estudio de sus propiedades electrofisiológicas (Pardal et al., 2007).

Posteriormente, nuestro grupo afinó en el conocimiento del mecanismo molecular de activación proliferativa de las CBSCs en respuesta a hipoxia (Platero-Luengo et al., 2014). Primero se descubrió que la hipoxia por sí sola no era la inductora de la proliferación de las CBSCs, ya que el estímulo hipóxico no induce la proliferación de las células madre *in vitro*. El efecto de la hipoxia *in vivo* era indirecto a través de las células glómicas, que actúan como mediadores que desencadenan la proliferación de las CBSCs (Platero-Luengo et al., 2014). La molécula mediadora en esta comunicación intercelular resultó ser la Endotelina-1, clásicamente descrita como potente inductor de la mitosis y de la angiogénesis en el CC (Chen et al., 2007; Paciga et al., 1999). Esta molécula es liberada por las células glómicas en respuesta a hipoxia, y es responsable de la activación proliferativa de las CBSCs, las cuales expresan altos niveles de distintos receptores específicos (Platero-Luengo et al., 2014).

Además, sabemos que la ET-1 tiene un efecto dual, ya que también fomenta la proliferación y especificación de progenitores del linaje mesectodérmico, derivados igualmente de las CBSCs (Navarro-Guerrero et al., 2016). La identificación de la ET-1 como molécula de comunicación en el CC ha permitido a nuestro grupo introducir el concepto de “sinapsis quimioproliferativa”, que es la relación morfofuncional que se establece entre la neurona madura (presináptica) y la célula madre (postsináptica), y que facilita la salida de la quiescencia de esta última en respuesta al estímulo hipóxico (Platero-Luengo et al., 2014).

Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado que las CBSCs son capaces de participar en la angiogénesis que también se pone en marcha en el órgano en respuesta a hipoxia (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016). Estas células madre específicas del CC son capaces de diferenciarse hacia células endoteliales, que participan a su vez en la formación de nuevos vasos sanguíneos durante la adaptación del tejido a la hipoxia crónica (Annese et al., 2017). El descubrimiento ayuda a comprender el aumento de vascularización del CC hipóxico (McGregor et al., 1984; Wang and Bisgard, 2002), y además define a las CBSCs como un excelente ejemplo de multipotencia fisiológica en una población adulta de células madre derivadas de la cresta neural.

Por último, el aumento de tamaño del CC en respuesta a hipoxia crónica constituye un fenómeno de adaptación fisiológica ampliamente descrito y caracterizado, desde el punto de vista funcional, incluso en los seres humanos (Arias-Stella and Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984). Los estudios previos de nuestro grupo, descritos en los apartados anteriores, ofrecen una explicación plausible al crecimiento del órgano desde un punto de vista celular. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de otros mecanismos celulares, paralelos a la actividad de las CBSCs, que faciliten o aceleren el proceso de crecimiento. En este contexto, existen trabajos previos en CC que proponen la posibilidad de que las propias células glómicas sean capaces de dividirse para aumentar su número de manera rápida en respuesta a la hipoxia crónica (Chen et al., 2007; Paciga et al., 1999; Wang et al., 2008). Esta

hipótesis, propuesta en esos trabajos, está basada en la observación de células TH+ que expresan a la vez marcadores de ciclo celular, como PCNA (del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). En el presente trabajo de tesis doctoral nos propusimos intentar explicar esta observación, dado que las células glómicas maduras están altamente especializadas y, a semejanza de otras células neuronales, difícilmente podrían dividirse. De esta forma además, exploraremos la posible existencia de otros mecanismos celulares, complementarios a la actividad de las células madre multipotentes, que puedan explicar el crecimiento rápido del parénquima neurosecretor del CC hipóxico.

3. RELEVANCIA CLÍNICA DEL ESTUDIO DEL CUERPO CAROTÍDEO

El estudio de la función fisiológica del CC, y de su respuesta a los distintos estímulos, así como de los tipos celulares que intervienen en esas respuestas fisiológicas, genera un conocimiento que sirve de base para la comprensión de diversos tipos de patologías relacionadas con este órgano. Actualmente el CC se encuentra en el punto de mira de la investigación de varias enfermedades, en las que se ha detectado que hay una afectación del órgano o de alguno de sus tipos celulares. Algunas de estas enfermedades son poco frecuentes, pero debido a su gravedad adquieren gran importancia, como es el caso del Síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS; del inglés *Sudden Infant Death Syndrome*), o el Síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS; del inglés *Congenital Central Hypoventilation Syndrome*). En el CC de los pacientes de SIDS se ha encontrado que el parénquima neurosecretor está reducido, y en las células glómicas que quedan, el número de vesículas de grano denso es menor del habitual (López-Barneo et al., 2016b; Porzionato et al., 2013) Este fenotipo podría llevar a una hiposensibilidad o falta de respuesta fisiológica del CC frente a hipoxia, lo que podría provocar la aparición de las graves apneas que caracterizan a este síndrome. En el caso del CCHS, enfermedad crónica que incurre en un desajuste de la respuesta ventilatoria, se ha observado también una disminución del número de células glómicas del CC de los pacientes, así como del número de vesículas por célula, además de un

aumento del número de células sustentaculares (Cutz et al., 1997; López-Barneo et al., 2016b). En este caso se presume de nuevo que el mal funcionamiento del CC podría estar implicado en la sintomatología de esta enfermedad.

Por otro lado existen estudios en curso acerca de enfermedades mucho más prevalentes, en las que se está demostrando una implicación importante del CC. Este órgano se está convirtiendo incluso en el objetivo de la terapia frente a esas dolencias, como es el caso de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), y del Síndrome de apnea del sueño (OSA; del inglés *Obstructive Sleep Apnea*). Estas enfermedades implican estímulos hipóxicos continuados en los que se produce una sobreactivación del CC, anomalía que da lugar a una sintomatología con importantes repercusiones a nivel cardiovascular (López-Barneo et al., 2016b; Ponikowski et al., 2001; Del Rio et al., 2016). Tal es la implicación del CC en estas enfermedades, que se ha llegado a practicar la ablación del órgano como terapia para paliar la sintomatología (Del Rio et al., 2013).

Otras enfermedades prevalentes en las que se ha observado una sobreactivación del CC son la insuficiencia cardíaca, la hipertensión, la obesidad y el síndrome metabólico, condiciones todas en las que se ha experimentado con modelos animales con el CC denervado (MacFarlane et al., 2012; McBryde et al., 2013; Del Rio et al., 2013), con objeto de buscar un tratamiento para atenuar los síntomas (López-Barneo et al., 2016b).

Por último, el estudio del nicho del CC también podría tener relevancia para la investigación de tumores pediátricos con origen en la cresta neural, como es el caso de los neuroblastomas (Jiang et al., 2011). El conocimiento acerca del comportamiento de la célula madre del CC, así como de su diferenciación hacia el linaje neuronal, podría revelar paralelismos importantes con respecto al funcionamiento de las células madre tumorales y sus derivados en los neuroblastomas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral ha consistido en la identificación y caracterización de células dopaminérgicas del cuerpo carotídeo con capacidad proliferativa. Nos hemos centrado en estudiar el comportamiento funcional de esta población y los mecanismos de activación de este proceso proliferativo, para así avanzar en la comprensión del funcionamiento del nicho del cuerpo carotídeo y del crecimiento del órgano en respuesta a hipoxia crónica. Para lograr este objetivo general se decidió abordar los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de la población TH positiva con capacidad proliferativa, y caracterización de su modo de proliferación.
2. Aislamiento de la población de células TH+ proliferativas mediante la técnica de citometría de flujo, utilizando un anticuerpo de membrana (CD57 ó HNK-1).
3. Aislamiento de células glómicas maduras funcionales del cuerpo carotídeo, mediante la técnica de citometría de flujo, para su comparación con las células proliferativas.
4. Estudio morfo-funcional comparativo de ambos tipos celulares TH+, e identificación de la población TH+/HNK-1+ como neuroblastos en el cuerpo carotídeo.
5. Estudio de los mecanismos de señalización celular que activan la proliferación y la maduración de los neuroblastos del CC.
6. Análisis de la expresión diferencial de genes en ambos tipos celulares mediante *microarray*, para identificar rutas de señalización que sean específicas de cada una de las dos subpoblaciones, así como rutas de interconexión entre ambos tipos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudios *In vivo*

1.1. Animales y muestras humanas

Los experimentos realizados en este trabajo se han llevado a cabo en su mayoría con ratas Wistar, suministradas por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Excepcionalmente se han utilizado también ratones C-57 no modificados genéticamente, suministrados por el mismo servicio.

Los animales tenían edades comprendidas entre 7 y 11 semanas (ratas), y entre 2 y 3 meses (ratones). Se utilizaron indistintamente machos y hembras en todos los experimentos, no encontrando diferencia alguna entre ambos sexos. Los animales estuvieron estabulados en todo momento en jaulas ventiladas, con temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, acceso ilimitado a comida y agua, y en habitaciones con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, de acuerdo a las directrices europeas (Directiva 2010/63/EU).

Para la experimentación y posterior sacrificio, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina en proporción 80/20. La dosis de ketamina hidrocloreto (Ketolar, Grupo Pfizer) fue de 80 mg/kg, y la de hidrocloreto de xilacina (Rompum, Bayer) fue de 10 mg/kg. Estos fármacos fueron suministrados por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del IBiS.

Todos los experimentos realizados con animales en esta tesis doctoral han sido aprobados por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla.

La muestra humana utilizada en esta tesis doctoral provenía de la donación del segmento vascular de la arteria carótida, incluido en el protocolo

de donación de órganos del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR). La manipulación de la muestra se realizó cumpliendo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki de 2008 de la Asociación Médica Mundial.

1.2. Tratamiento en cámaras de hipoxia

Los animales se sometieron a tratamientos de hipoxia del 10% de oxígeno de manera continuada, por distintos periodos de tiempo. Estos experimentos se llevaron a cabo en una cámara isobárica hermética (Coy Laboratory Products, Inc.), en la que se estabularon los animales dentro de sus jaulas, con acceso ilimitado a comida y agua, a fin de minimizar todo estrés que no sea el producido por la hipoxia. Las cámaras permiten la monitorización continuada de los niveles de CO₂ y humedad, lo que permite mantenerlos sin cambios drásticos de estos parámetros con respecto al exterior en todo momento.

Para los distintos experimentos se realizaron tratamientos de hipoxia a tiempos muy variados (desde 24 horas hasta 21 días), siendo mayoritarios los tratamientos de 3 días por la naturaleza de este trabajo.

1.3. Administración de compuestos

1.3.1. 5-Bromodesoxiuridina

La 5-Bromo-2'-desoxiuridina o BrdU (Sigma) es un nucleótido sintético análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S de la división celular, por lo que las dos células hijas resultantes de la división quedan marcadas, así como toda su posible progenie. Las células marcadas con BrdU se detectan mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo específico anti-BrdU. Por este motivo, el BrdU es ampliamente utilizado como marcador de división celular.

Para los experimentos con BrdU la vía de administración utilizada fue siempre doble: una inyección intraperitoneal de BrdU disuelto en solución salina estéril, a dosis de 50 mg por kilogramo de peso del animal, al comienzo de la ventana temporal que se desea marcar según el experimento, y siempre

seguido de la administración continuada de BrdU por vía oral, disuelto en el agua de bebida del animal a concentración de 1 gr por litro de agua, hasta el final de la ventana temporal de marcaje. La solución para inyección intraperitoneal se preparó de manera inmediata cada vez, disolviendo el BrdU en agitación a una temperatura de unos 30°C, mientras que la solución para bebida se preparó cada 3 días, manteniéndose la botella de stock a 4°C hasta su uso.

1.3.2. Cloruro de cadmio

El cloruro de cadmio (CdCl_2) es un inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje, por lo que inhibe la exocitosis en las células excitables.

Para el tratamiento de animales con cloruro de cadmio (Sigma), la vía de administración fue oral, disuelto en el agua de bebida, y a una dosis de 25 mg/L (Romero et al., 2011). El tratamiento se realizó durante 6 días: los biberones con cloruro de cadmio disuelto en el agua de bebida se colocaron en las jaulas 3 días antes de entrar los animales en la cámara de hipoxia, como pre-tratamiento, y se mantuvieron otros 3 días una vez dentro los animales de la cámara de hipoxia. En el caso del grupo control, los biberones contenían sólo agua. Al igual que en el caso anterior, se preparó una botella de solución stock para los 3 días de experimento, que se conservó a 4°C hasta su uso para rellenar el biberón de los animales.

1.3.3. Bosentán

El bosentán (4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxyethoxy)-5-(2-methoxyphenoxy)-2-(pyrimidin-2-yl)pyrimidin-4-yl]benzenesulfonamide), es un antagonista competitivo de la endotelina-1, y tiene afinidad por los dos tipos de receptores de endotelina, los tipo A (ET-A) y los tipo B (ET-B). Este compuesto no está disponible a nivel comercial, sino que fue amablemente cedido a nuestro laboratorio por la Dra. Martine Clozel, de Actelion Pharmaceuticals.

La administración de bosentán se realizó según el procedimiento utilizado en artículos de Salvatore Fidone (Chen et al., 2007), por constituir los menos agresivos para el animal, sin pérdida de efectividad. Este tratamiento consiste en la administración oral de 200 mg/kg/día de bosentán a cada animal, estando la droga disuelta en porciones de gelatina de fresa de uso doméstico. La porción de gelatina se administró a cada animal a primera hora de la mañana tras toda la noche en ayuno. El tratamiento de 3 días en cámara de hipoxia, con administración diaria de bosentán, requirió de un pre-tratamiento de 3 días previos a la entrada en la cámara, para entrenar a los animales en la ingesta de un alimento nuevo para ellos, así como para asegurar que al comienzo del estímulo hipóxico los receptores de endotelina ya se encontraban bloqueados. A las ratas control se les aplicó el tratamiento en idénticas condiciones pero con gelatina sin bosentán. Las dosis de gelatina con bosentán y gelatina control se prepararon cada dos días y se conservaron en la nevera a 4°C hasta su uso.

1.3.4. Haloperidol

El haloperidol (4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxy-1-piperidinyl]-1-(4-fluorophenyl)-1-butanone) (Sigma), es un antagonista de los receptores de dopamina D₂, D₃ y D₄. Se administró a los animales por vía intraperitoneal, a una concentración de 0,5 mg/kg, disuelto a 1 mg/ml en una solución de salino con DMSO (Dimetil Sulfóxido) al 5% (Schlenker, 2007). Se realizó una inyección diaria durante 3 días como pre-tratamiento, antes de someter a los animales a condiciones de hipoxia, y una vez en hipoxia se continuó el tratamiento durante 3 días más. A los animales control se les realizó el mismo tratamiento pero inyectando sólo el vehículo (solución de salino con DMSO al 5%). Para este experimento se preparó una solución de vehículo para ambos grupos, y diariamente se disolvió el haloperidol para el grupo de tratamiento.

1.3.5. Apomorfina

La apomorfina (R-(-)-Apomorphine hydrochloride hemihydrate) (Sigma), es un agonista no selectivo de la dopamina, con efectos neuroprotectores y anti-Parkinsonianos demostrados *in vivo* (Jenner and Katzenschlager, 2016;

Sesar et al., 2017). La administración de apomorfina se realizó por inyección intraperitoneal, a una dosis de 0,5 mg/kg (Toledo-Aral et al., 2003) cada 12 horas, durante 3 días. La droga se disolvió en solución salina a concentración de 0,5 mg/ml y con 0,2 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma). La solución para las ratas control no contenía apomorfina, aunque sí los demás componentes, y se administró de la misma forma. Al igual que en el caso del Haloperidol, se preparó la solución vehículo al comienzo del experimento, pero se disolvió la apomorfina cada día inmediatamente antes de su uso, para evitar su deterioro.

1.4. Técnicas histológicas

1.4.1. Perfusión intracardiaca

Para poder realizar los distintos estudios inmunohistoquímicos, los animales fueron sometidos a una perfusión intracardiaca, para obtener los tejidos limpios de sangre y fijados. La técnica se realiza en el animal anestesiado, y consiste en la apertura de la caja torácica y la introducción de un catéter en el ventrículo izquierdo del corazón, mediante el cual se introduce tampón fosfato salino (PBS, Gibco) de forma continuada con la ayuda de una bomba peristáltica (Thermo Scientific). De esta forma toda la sangre del animal sale por una incisión que se realiza en la aurícula derecha. Una vez que el animal se ha exanguinado, se cambia el PBS por una solución fijadora de paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% en PBS. Cuando los tejidos están endurecidos por la fijación, se extraen los de interés y se someten a un periodo de postfijación de 2 a 4 horas (dependiendo del tejido) en solución fijadora a 4°C. Después, los tejidos se lavan 3 veces con PBS y se introducen en una solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PBS para criopreservarlos. Los tejidos se mantienen en sacarosa hasta que decantan, o un máximo de 3 días.

1.4.2. Inclusión y corte de tejidos

Los tejidos, recién extraídos de la solución de sacarosa, se incluyeron en moldes de plástico (Cryomold Tissue Tek, Sakura) rellenos con resina criopreservante (OCT Tissue Tek, Sakura), y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

Para cortar los tejidos se utilizó un criostato (Leica), en el que se realizaron cortes seriados de 10 μm de grosor, a una temperatura entre -18°C y -20°C . Los cortes de cada muestra se fueron posicionando en serie sobre unos 7-10 portaobjetos con tratamiento adherente (Superfrost Plus, Thermo Scientific), y se dejaron secar un mínimo de 4 horas y un máximo de 12 horas, para asegurar la adherencia de los cortes. Finalmente, los portas con los cortes se congelaron a -20°C .

1.5. Inmunofluorescencia en secciones de cuerpo carotídeo

Las técnicas de inmunohistoquímica realizadas en cortes de cuerpo carotídeo han sido exclusivamente de inmunofluorescencia, por lo que todo el procesado de las muestras se realizó en bandejas opacas (Simport) para protegerlas de la luz. Los distintos anticuerpos primarios que se han empleado son: *mouse IgM anti-HNK-1 (CD57)* (1:500; BD Bioscience), *rat IgG2a anti-BrdU* (1:200; Abcam), *rabbit anti-TH* (1:1000; Novus Biological), *mouse IgG1 anti-TH* (1:500; Sigma), *rabbit anti-Ki67* (1:200; Thermo Scientific), *mouse IgG1 anti-Ki67* (1:200; BD Bioscience), *rabbit anti-P-Histone H3 (Ser28)* (1:400; Cell Signalling Technology), *rabbit anti-GFAP* (1:500; Dako), *mouse IgG1 anti-Nestin* (1:500; Millipore), *rabbit anti-DDC (DOPA Decarboxylase)* (1:500; Millipore), *sheep anti-TH* (1:800; Millipore) y *rabbit anti-P2X2 Receptor (intracellular)* (1:200; Alomone Labs). El procedimiento básico, tras obtener los portaobjetos con los tejidos ya cortados del congelador de -20°C , se explica a continuación. Primero permeabilización con solución de PBTX al 3% (PBS con solución al 10% de Tritón X-100) 3 veces durante 10 minutos, y posterior tratamiento del tejido con solución de bloqueo (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos), al menos durante 1 hora a temperatura ambiente, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo. A continuación, incubación de las secciones con los anticuerpos primarios diluidos en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C dentro de las bandejas opacas. Al día siguiente se realizan 3 lavados de las secciones con PBTX durante 10 minutos cada uno, y se incuban después con los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo, de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: *AlexaFluor 488-*

donkey-anti-rabbit-IgG (1:400; Molecular Probes), *AlexaFluor 488-goat-anti-mouse-IgM* (1:200; Molecular Probes), *AlexaFluor 568-goat-anti-rat-IgG* (1:500; Molecular Probes), *AlexaFluor 568-goat-anti-mouse-IgG* (1:500; Molecular Probes), *AlexaFluor 568-goat-anti-rabbit-IgG* (1:500; Molecular Probes), *AlexaFluor 635-goat-anti-mouse-IgG* (1:500; Molecular Probes), *Cy5-goat-anti-mouse-IgG* (1:200; Molecular Probes), *AlexaFluor 488-donkey-anti-mouse-IgG* (1:500; Molecular Probes), y *AlexaFluor 568-Donkey-Anti-Sheep-IgG* (1:500; Molecular Probes). Por último, se lava el tejido con PBS durante 10 minutos, se añade a cada portaobjeto unas gotas de medio de montaje con DAPI (Fluoroshield™ con DAPI, Sigma) para marcar los núcleos, se cubren las secciones con un cubreobjetos, y se almacenan a 4°C hasta su posterior análisis en el microscopio.

La fijación con formaldehído forma enlaces cruzados estables entre las proteínas, pero algunos antígenos se pueden ver enmascarados al utilizar esta fijación, por lo que es necesario someter al tejido a un proceso de desenmascaramiento antigénico previo a la realización de la técnica inmunohistoquímica. El antígeno de membrana HNK-1 ó CD-57, muy utilizado en este trabajo, requiere este pre-tratamiento para mostrar su nivel de expresión en el tejido, por lo que siempre que se ha usado este marcador se ha hecho el desenmascaramiento antigénico en las secciones. Este pre-tratamiento consistió en lavar los portaobjetos 4 veces con PBS tras sacarlos del congelador de -20°C, y cubrir los cortes con solución de citrato sódico a 10 mM (pH 6) hirviendo durante 15 minutos. Posteriormente, se vuelve a lavar 2 veces con PBS y se comienza la técnica inmunohistoquímica estándar previamente descrita.

En el caso de las muestras destinadas a la detección de BrdU, se realizó un pre-tratamiento de las secciones de tejido con HCl 2 N (Sigma) a temperatura ambiente durante 45 minutos, para desnaturalizar la cromatina y facilitar la posterior unión del anticuerpo anti-BrdU. Después se lava el tejido durante 15 minutos con una solución de tampón borato 0,1 M pH 8,5 (3,8 gr de borato sódico en 100 ml de agua MilliQ) para neutralizar el pH ácido generado

por el HCl. Tras este pre-tratamiento se comienza el protocolo básico de inmunohistoquímica previamente descrito en este apartado.

1.6. Inmunohistoquímica para microscopía electrónica de transmisión

Los experimentos de microscopía electrónica se realizaron en colaboración con la Dra. Valentina Annese, experta en microscopía electrónica de nuestro laboratorio, que realizó los estudios de expresión del marcador HNK-1 en cuerpo carotídeo de rata normóxica, utilizando el método de pre-inclusión para la inmunodetección con partículas de oro coloidal (Aurion) (para conocer los detalles de este protocolo ver Annese et al., 2017).

1.7. Adquisición y tratamiento de imágenes

La adquisición de imágenes de epifluorescencia se realizó mediante un microscopio Olympus BX-61 con cámara digital asociada, con objetivos de 20X y 40X, a resolución máxima (1024 x 1024), y en formato jpg (*Joint Photographic Experts Group*). Estas imágenes fueron posteriormente procesadas con el software Adobe Photoshop CS5 para realizar el montaje de los canales que se habían adquirido por separado, y por último se cuantificaron utilizando el *plugin Cell Counter* del programa ImageJ (NIH), o con la herramienta de recuento de Adobe Photoshop CS5.

Para la adquisición de imágenes con microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS, y un microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO. El tratamiento de las imágenes adquiridas con el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS se realizó con el software LCS Lite (*Leica Confocal Software*), y las cuantificaciones de células con el *plugin Cell Counter* del programa ImageJ (NIH). El tratamiento de las imágenes adquiridas con el microscopio confocal Zeiss LSM 7 DUO, y la cuantificación de las mismas, se realizó con el *software Zen 2011 lite* proporcionado por la marca Carl Zeiss.

Las imágenes de microscopía electrónica fueron adquiridas por la Dra. Valentina Annese con un microscopio electrónico Zeiss Libra 120 del Centro de

Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). El tratamiento y la cuantificación de las imágenes de microscopía electrónica se realizó con el programa Image J.

2. Estudios *Ex vivo*

2.1. Dispersión de cuerpos carotídeos

Para extraer células aisladas del cuerpo carotídeo se realizó un método clásicamente descrito en nuestro laboratorio, consistente en la dispersión enzimática y mecánica de los cuerpos carotídeos (Pardal et al., 2007). Para ello, primero se extrajeron las bifurcaciones carotídeas del animal anestesiado (véase apartado 1.1. de Métodos), y se pusieron en solución Tyrode (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos) a 4°C para preservarlas. Con ayuda de una lupa binocular (Olympus SZX10), se extrajeron los cuerpos carotídeos de las bifurcaciones, y se pusieron en un frasco de vidrio con 3 ml de solución enzimática (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos), para favorecer la disgregación del tejido. Para incrementar el efecto de las enzimas se puso el frasco en agitación mecánica (600 r.p.m. en un Thermomixer Comfort (Eppendorf)), a una temperatura de 37°C, durante 25 minutos. Posteriormente, se realizó un pipeteo suave para terminar de separar los agregados celulares y se neutralizó el efecto enzimático añadiendo un volumen de unos 7 ml de solución de FACS (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos) a 4°C. Por último, se transfirió todo el volumen del frasco a un tubo de 15 ml de fondo cónico, y se centrifugó a 4°C y 1600 r.p.m. durante 5 minutos, tras lo cual se retiró el sobrenadante para obtener un pellet de células vivas dispersas. Esta extracción de células vivas e individuales del parénquima del cuerpo carotídeo fue la base para realizar todos los estudios *ex vivo* e *in vitro*.

2.2. Aislamiento de poblaciones celulares vivas mediante citometría de flujo

Para realizar el aislamiento de poblaciones celulares discretas del cuerpo carotídeo se utilizó la técnica de separación por citometría de flujo o FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*). Esta separación de poblaciones se llevó a cabo utilizando un citómetro de flujo, siendo para los primeros aislamientos un MoFlo (Dako Cytomation) de dos láseres, y más tarde un BD FacsJazz (Becton Dickinson) de tres láseres.

El aislamiento de poblaciones celulares vivas suele hacerse en función de su expresión de antígenos de membrana, que previamente han sido marcados con anticuerpos primarios combinados con fluoróforos (moléculas fluorescentes detectables por el citómetro). Este fue el caso de las células HNK-1 positivas del cuerpo carotídeo. El protocolo utilizado para marcar estas células consistió en que una vez disgregadas las células de cuerpo carotídeo, se resuspendió el pellet de células vivas en 200 μ l de solución de FACS, y se añadió el anticuerpo primario *mouse IgM anti-HNK-1 (CD57)* (BD Bioscience) a concentración de 1:500. Se incubó en hielo durante 30 minutos, y después se lavó con solución de FACS y se centrifugó a 4°C y 1600 r.p.m. durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y quedándonos con el pellet de células. Este pellet se resuspendió de nuevo en 200 μ l de solución de FACS con el anticuerpo secundario *PE-goat-anti-mouse-IgM* (Jackson Immuno-Research), a concentración de 1:200. Tras una incubación de 30 minutos en hielo y en oscuridad, se lavó el anticuerpo y se centrifugó como se ha descrito anteriormente para el anticuerpo primario. Por último, las células se resuspendieron en 500 μ l de solución de FACS, se les añadió un marcador de viabilidad (7-AAD, BD Pharmingen), se filtraron con un filtro de 50 μ m (Celltrics, Partec) de tamaño de poro para quitar los agregados celulares, y se pasaron a un tubo de 5 ml especial para separación celular por citometría de flujo (Polypropylene Round-Bottom Tube, BD Falcon). Una vez separadas en el citómetro, las células se recogieron directamente en tubos eppendorf de 1,5 ml que contenían 500 μ l de solución FACS, excepto si se usaron para cultivo, que se recogieron en el mismo volumen pero de medio de cultivo, o si se usaron

para extraer ARN, en cuyo caso se recogieron en 350 μ l de buffer de lisis (buffer RLT, Qiagen), y se lisaron en un vórtex durante 30 segundos a máxima potencia, para congelarlas posteriormente a -80°C .

El protocolo de aislamiento prospectivo de células TH+ vivas se describirá con detalle en el apartado “Resultados”, por constituir uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

2.3. Citometría de flujo para el análisis de poblaciones celulares del cuerpo carotídeo

Para este trabajo de tesis doctoral se realizaron distintos tipos de marcajes celulares según la caracterización de poblaciones por citometría de flujo que se quería llevar a cabo. Se han utilizado de forma combinada marcadores intracelulares, extracelulares, e intranucleares, por lo que se han desarrollado varios protocolos de tinción que cubrieran todas las necesidades. El análisis de estas muestras se realizó en un citómetro de cuatro láseres LSRFortessa (BD Biosciences).

2.3.1. Controles

Los controles requeridos para estos estudios están muy estandarizados, aunque debido al escaso número de células que se extraen del cuerpo carotídeo sólo una pequeña parte de las muestras se utilizó para los controles. Rutinariamente se realizaron controles de:

- Anticuerpos secundarios: una muestra que seguía todo el procedimiento pero sin anticuerpos primarios. Esto nos sirvió para comprobar la posible tinción inespecífica (*background*) de los anticuerpos secundarios.
- Marcaje individual: muestras que seguían todo el procedimiento pero que sólo llevaban uno de los anticuerpos primarios con su correspondiente anticuerpo secundario. Se realizó un control de este tipo por cada anticuerpo primario utilizado en el experimento. Esto nos sirvió para visualizar cada tinción de manera individual, como control positivo de cada

marcaje, y para detectar posibles interacciones entre marcajes, así como para ajustar las compensaciones en el citómetro de manera correcta.

- Blanco: se trata de una muestra de células que ha seguido el mismo procedimiento que las demás muestras, pero que no lleva ningún tipo de marcaje con anticuerpos, ni primario ni secundario. Nos sirvió como control negativo del experimento, para ajustar la compartimentalización de la población negativa y los parámetros físicos de tamaño (FSC) y complejidad (SSC), así como para detectar la posible autofluorescencia endógena de la muestra.
- Control de isotipo: consiste en realizar una tinción paralela a la de la muestra pero únicamente con la inmunoglobulina del isotipo del anticuerpo primario, para detectar uniones inespecíficas por parte de la inmunoglobulina genérica. Este control se realizó de manera excepcional sólo para los anticuerpos que se unen a receptores de membrana (en este trabajo HNK-1) durante la puesta a punto del protocolo, para detectar marcaje inespecífico.

2.3.2. Tinción para citometría de flujo extracelular e intracelular

Partiendo del pellet de células dispersas de cuerpo carotídeo completo, la tinción con el marcador extracelular HNK-1 se llevó a cabo con las células vivas tal y como se indica en el apartado 2.2. Sin embargo, las tinciones intracelulares tienen que hacerse con células fijadas, para posibilitar el acceso de los anticuerpos al interior celular. Para ello, tras el lavado del anticuerpo secundario del HNK-1 con solución de FACS, se procedió a realizar la fijación de las células utilizando 100 μ l de Solución 1 del kit *IntraPrep Permeabilization Reagent kit* (Beckman Coulter), aplicándoles un vórtex suave durante 10 segundos e incubándolas durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fijadas se lavaron con 4ml de PBS, se centrifugaron a 4°C y 1600 r.p.m. durante 5 minutos, y se les retiró el sobrenadante. A continuación, se añadieron 100 μ l de Solución 2 del kit *IntraPrep Permeabilization Reagent kit* (Beckman Coulter), se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con 4 ml de PBS, se centrifugó a 4°C y 1600

r.p.m. durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. Después se resuspendió el pellet en 200 μ l de solución de FACS y se pusieron los anticuerpos primarios de marcaje intracelular, incubándolos durante 20 minutos en hielo. Los anticuerpos primarios usados para citometría fueron: *rabbit anti-TH* (1:1000; Novus Biological), *mouse IgM anti-HNK-1 (CD57)* (1:500; BD Bioscience), *mouse IgG1 anti-TH* (1:500; Sigma), *rabbit anti-Neuron specific beta III tubulin (Tuj1)* (1:1000; Abcam) y *mouse IgG1 anti-Nestin* (1:500; Millipore). Tras la incubación se realizó un lavado con solución de FACS, se centrifugó, y se retiró el sobrenadante de la manera habitual, resuspendiéndose de nuevo en 200 μ l de solución de FACS para poner los anticuerpos secundarios correspondientes, que se incubaron en hielo durante 20 minutos. Los anticuerpos secundarios usados fueron: *FITC-goat-anti-rabbit-IgG* (1:200; Jackson ImmunoResearch), *PE-goat-anti-mouse-IgM* (1:200; Jackson ImmunoResearch), *AlexaFluor 488-donkey-anti-rabbit-IgG* (1:400; Molecular Probes), y *AlexaFluor 635-goat-anti-mouse-IgG* (1:500; Molecular Probes). Por último, se lavó con solución de FACS, se centrifugó y se retiró el sobrenadante de la manera habitual, y se resuspendieron las muestras en 500 μ l de solución de FACS, pasándolas a un tubo de 5 ml especial para análisis por citometría de flujo (Polystyrene Round-Botton Tube, Falcon).

2.3.3. Tinción para citometría de flujo extracelular, intracelular e intranuclear

Partiendo del pellet de células de cuerpo carotídeo vivas y dispersas, se realizó la tinción con el anticuerpo extracelular HNK-1 tal y como se ha descrito en los apartados anteriores. A continuación, para fijar las células en este caso se pusieron 150 μ l de solución fijadora de PFA al 4% en cada tubo, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se lavó con 4 ml de PBS, se centrifugó a 4°C y 1600 r.p.m. durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. Tras la fijación, se resuspendieron las células en 200 μ l de solución de bloqueo (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos), que al contener tritón actúa como solución de permeabilización, y se pusieron los anticuerpos primarios intracelulares e intranucleares (en este caso Ki67). El anticuerpo intranuclear anti-Ki67 se usó conjugado para optimizar la

tinción. El anticuerpo utilizado fue AlexaFluor 700 mouse IgG1 anti-Human Ki67 (1:200; BD Bioscience). Los anticuerpos intracelulares usados fueron los descritos en el apartado anterior. Se incubó durante 30 minutos en hielo, y se lavó igual que en el paso de fijación. Posteriormente se resuspendió cada muestra en 200 μ l de solución de FACS, y se añadieron los anticuerpos secundarios correspondientes (ver apartado anterior). Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los anticuerpos secundarios con solución de FACS y con agitación suave, para lo cual se pusieron los tubos en un Thermomixer Comfort (Eppendorf) a 400 r.p.m. durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó y se desechó el sobrenadante de la manera habitual. Este paso de lavado de los anticuerpos secundarios se realizó tres veces. Por último, se pasaron las muestras a tubos de 5ml (Polystyrene Round-Botton Tube, Falcon).

2.4. Inmunocitoquímica de células dispersas

Las células provenientes de la dispersión de cuerpos carotídeos completos, o de la separación mediante citometría de flujo, en ocasiones requirieron una caracterización más profunda, por lo que se les realizó la técnica de inmunocitoquímica para distintos marcadores. El protocolo de tinción es igual al descrito en el apartado anterior para citometría de flujo, usando el kit *IntraPrep Permeabilization Reagent kit* (Beckman Coulter), o igual al protocolo descrito en el apartado 2.3.3., según el tipo de marcador a utilizar. En ambos casos, tras el último paso de tinción, al resuspender la muestra en 500 μ l de solución de FACS, las células se pusieron en una cámara para muestras *Shandon TPX simple chamber* (Thermo Scientific), con un filtro (*filter card*, Thermo Scientific), y un portaobjetos tratado con poli-lisina (Polylysine slide, Thermo Scientific). A continuación, se colocó la cámara en una centrífuga *Cytospin 4* (Thermo Scientific), y se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. *Cytospin 4* es una centrífuga especial para técnicas citológicas. El diseño de sus cámaras permite centrifugar suspensiones celulares y que el líquido sea absorbido por un filtro, mientras que las células quedan adheridas a un portaobjetos. Tras el centrifugado, se retira el portaobjetos con la muestra, se

añade una gota de medio de montaje *Fluoroshield™* con DAPI (Sigma), para marcar los núcleos de las células, y un cubreobjetos para preservar la muestra.

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio Olympus BX-61 con cámara digital asociada, con los objetivos de 20X y 40X, a resolución máxima (1024 x 1024), y en formato jpg (*Joint Photographic Experts Group*).

2.5. Análisis de la expresión génica

Para los estudios de expresión génica se partió de células separadas mediante la técnica de FACS, dispensadas desde el citómetro directamente en un tubo eppendorf con *buffer* de lisis (*buffer* RLT, Qiagen) y posteriormente congeladas a -80°C, tal y como se describe en el apartado de FACS.

2.5.1. Detección de ARNm mediante PCR estándar

Para analizar la expresión de genes mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se prepararon las muestras siguiendo un protocolo estándar. Para ello se extrajeron los cuerpos carotídeos de 4 animales de la misma edad (todos ellos de entre 7 y 9 semanas de edad), 2 machos y 2 hembras. Se dispersaron los 8 cuerpos carotídeos hasta célula única y se preparó la muestra para separación por la técnica de FACS, tal y como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.2. de Materiales y Métodos). Se aislaron igual número de células HNK-1+ que de células TH+ en cada muestra. Todo este proceso se realizó por duplicado de manera simultánea, por lo que al final de cada experimento se obtuvieron dos muestras de células HNK-1 y dos muestras de células TH. Posteriormente, se extrajo el ARN de las muestras mediante el kit RNeasy Micro (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para analizar la calidad del ARN obtenido de todas las muestras aisladas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples de los servicios generales del IBiS una electroforesis de los ARNs 18S y 28S, en un aparato *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), y con un kit *Eukaryote Total RNA Pico* (Agilent Technologies). Este sistema ofrece una *ratio* indicadora de la integridad del ARN de la muestra, y con la que se calcula el número RIN (RNA Integrity Number) como medida de calidad e integridad del ARN. Para asegurar

unos criterios de calidad suficiente en nuestras muestras se descartaron todas las muestras con un RIN inferior a 7,5. El ARN seleccionado como válido se amplificó, con ayuda del Servicio de Genómica y Secuenciación del IBiS, mediante el kit *Gene Chip® WT Pico* (Affymetrix), y en el mismo servicio general se midió la concentración de ARN mediante un espectrofotómetro *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific). A continuación, se realizó la retrotranscripción de una parte del ARN obtenido, y el resto se guardó a -80°C. La retrotranscripción se llevó a cabo con la enzima *qScript cDNA Super mix* (Quanta), en un termociclador *Professional TRIO* (Biometra), hasta obtener el ADNc, que se guardó a -20°C hasta su uso.

Para llevar a cabo una reacción de PCR estándar, se elaboró una solución *mix* de 25 µl compuesta por: 2,5 µl de 10X *NH₄ Reaction Buffer* (Bioline), 0,75 µl de *MgCl₂ Solution* a 50 mM (Bioline), 0,5 µl de *Deoxynucleotide Mix* (Sigma) a 10 mM, 1 µl del *primer forward*, 1 µl del *primer reverse*, 1 µl de cDNA a 50 ng/µl, 0,2 µl de *Biotaq DNA polymerase* (Bioline), y 18,05 µl de agua (Sigma). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador *Professional TRIO* (Biometra) (ver secuencias de los *primers* en el apartado 5.2.). Una vez terminada la reacción, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa (INtRON biotechnology) al 1,5% con tampón TBE (Tris-Borato-EDTA, National Diagnostic), y las bandas de DNA se visualizaron con *Midori Green DNA Stain* (Genetics). Para determinar el tamaño de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular *SiZer™-100 DNA Marker* (INtRON). Las secuencias y condiciones de los primers P2X2, P2X3, y P2Y12 se tomaron de estudios previos (Hu et al., 2008; Prasad et al., 2001). Como muestras control para las PCRs se usaron cerebro de rata y células de la línea celular PC12 (células tumorales de glándula adrenal de rata). Como gen control se utilizó la Ciclofilina (Cph) (Bautista et al., 2009).

2.5.2. Estudio de la expresión diferencial de genes mediante *Microarray*

El estudio de la expresión diferencial de genes mediante *Microarray* se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del CABIMER (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa). Para la preparación de las

muestras se siguieron las recomendaciones de este servicio, contenidas en la "Guía del usuario de microarray", y se entregaron 4 réplicas de cada tipo celular: células TH/HNK y células TH. Cada réplica se obtuvo a partir de un grupo de 4 a 6 animales (mitad machos y mitad hembras), siguiendo las mismas indicaciones descritas en el apartado anterior, hasta obtener un RNA de integridad y calidad suficiente, con un RIN igual o superior a 9. La unidad de Genómica del CABIMER realizó un *microarray* en la plataforma de Affymetrix del tipo *GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array*, con el cual se caracterizó la expresión diferencial de 30.430 genes entre ambos tipos celulares. De esta forma, tras la hibridación de las muestras y el escaneado, se obtuvieron los datos brutos en formato ".CEL", gracias al *Affymetrix GeneChip® Command Console®* (AGCC). Posteriormente, con el software *Affymetrix® Expression Console* (EC), estos datos de intensidad de las distintas sondas se promediaron para obtener un único valor de expresión del gen, y se normalizó la intensidad de la señal de los distintos *arrays* para permitir la comparación entre ellos. La normalización se hizo mediante el método SST-RMA (*Signal Space Transformation-Robust Microarray Analysis*) (Irizarry et al., 2003), generándose al final de este proceso unos archivos con formato ".CHP".

2.6. Técnicas electrofisiológicas

La caracterización funcional de las células mediante técnicas de electrofisiología, realizada para este trabajo de tesis doctoral, se hizo en colaboración con la Dra. Patricia González Rodríguez, experta en técnicas electrofisiológicas del laboratorio del Dr. José López Barneo (IBiS).

Para todos los ensayos de tipo electrofisiológico se partió de poblaciones celulares aisladas vivas (TH/HNK y TH) mediante la técnica de FACS, y provenientes de cuerpos carotídeos dispersos hasta célula única, como se ha descrito en apartados anteriores. Una vez aisladas las células, se sembraron en pequeños cubreobjetos de cristal, previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma), y cubiertos con medio de cresta neural completo (ver composición en apartado 5.1. de Materiales y Métodos). Estos cristales con las células adheridas se introdujeron en un incubador a 37°C y en normoxia como

condición estándar, hasta su uso para las mediciones electrofisiológicas unas 4 horas después.

En el caso de los experimentos crónicos, se expusieron las células a condiciones de hipoxia (3% O₂) o normoxia (21% O₂), durante 24-48 horas, y en algunos casos se suplementó el medio de cultivo con distintas sustancias para estudiar su efecto (ATP a 100 μM (Sigma), UTP a 100 μM (Sigma), PPADS 1 μl/ml (Sigma), o Acetilcolina 10 μM (Sigma)).

Las técnicas empleadas por la Dra. Patricia González Rodríguez, para la caracterización electrofisiológica de los dos tipos celulares, fueron:

- Registro de la actividad secretora de las células TH/HNK y TH mediante amperometría, para estudiar la liberación de dopamina en ambos tipos celulares.
- Registro de los cambios en las corrientes iónicas mediante la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de célula completa (particularidades del método descritas en Fernández-Agüera et al., 2015).
- Técnicas microfluorimétricas:
 - para detectar un incremento en la concentración intracelular de calcio en respuesta a distintos estímulos, con el indicador radiométrico Fura2AM (TefLabs mW 1002) (método descrito en Ureña et al., 1994),
 - para detectar cambios en la concentración de NAD(P)H autofluorescente, que se encuentra en el citosol de las células, en respuesta al estímulo hipóxico.

3. Estudios *in vitro*

3.1. Cultivo de células dispersas del cuerpo carotídeo en placas antiadherentes y formación de neuroesferas

Se sembraron células dispersas de cuerpo carotídeo completo en placas antiadherentes de 6 pocillos (*Costar Ultra low binding plate*, Corning), para promover la formación de neuroesferas. El medio de cultivo utilizado fue el medio completo de cresta neural. Se añadieron 3 ml de medio por pocillo, y se repartieron las células de una misma dispersión (6-8 cuerpos carotídeos) entre todos los pocillos de dos placas, para poner una en condiciones de normoxia (21% O₂) y la otra en condiciones de hipoxia (3% O₂). Tras 10 días en cultivo se recogieron las neuroesferas formadas y se pusieron en un pocillo de una placa con PBS para lavarlas durante 10 minutos. Posteriormente se pasaron a otro pocillo con solución de PFA al 4% donde se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente, para fijarlas. Por último, las neuroesferas se pasaron a un pocillo con solución de sacarosa al 30% durante 30 minutos, para proteger al tejido frente a la congelación. Tras esta criopreservación, el proceso se continuó siguiendo el protocolo estándar descrito en el apartado 1.4.2., hasta obtenerse cortes de neuroesferas en portaobjetos, preparados para llevar a cabo tinciones de inmunohistoquímica.

Las células separadas por FACS HNK-1 *high*, HNK-1 *low* y negativas para el marcador HNK-1 se sembraron por separado en distintos pocillos a densidad media-baja (2000 células por pocillo aproximadamente), utilizando placas de baja adherencia (Corning) de 6 pocillos, con 3 ml de medio de cresta neural completo en cada pocillo. Las células se cultivaron en el incubador de normoxia durante 10 días. Posteriormente, se recogió todo el contenido de cada pocillo (células sueltas y neuroesferas) en tubos falcon de 15 ml, se centrifugó a 4°C y 1600 r.p.m. durante 5 minutos para quitar el medio de cultivo, se lavó con PBS, y se fijaron las muestras con solución de PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar de nuevo, se pusieron 200 µl de solución de bloqueo a cada tubo de muestra y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron los anticuerpos primarios *rabbit anti-TH* (1:1000; Novus Biological) y *mouse IgG1 anti-Nestin* (1:500; Millipore), a la solución de bloqueo, y se incubó durante 1 hora más a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron los anticuerpos con PBS de la manera habitual, y se añadieron los anticuerpos secundarios *AlexaFluor*

568-goat-anti-rabbit-IgG (1:500; Molecular Probes) y *AlexaFluor 488-donkey-anti-mouse-IgG* (1:500; Molecular Probes), diluyéndolos en 200 μ l de solución de bloqueo, incubando a continuación 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se lavó de la manera habitual, y se dispusieron las muestras para centrifugar sobre portaobjetos en la centrífuga *Cytospin 4*, como se ha descrito en el apartado 2.4. Por último, se añadió a los portaobjetos con las muestras una gota de medio de montaje *FluoroshieldTM* con DAPI (Sigma), para marcar los núcleos de las células, y un cubreobjetos para preservar la muestra.

La adquisición de imágenes se realizó con un microscopio Olympus BX-61 con cámara digital asociada, con objetivos de 20X y 40X, a resolución máxima (1024 x 1024) y en formato jpg.

3.2. Cultivo de células dispersas del cuerpo carotídeo en condiciones adherentes

Los ensayos de proliferación con compuestos (ATP, UTP, PPADS, etc.) se realizaron en placas *Nunc Multidish 24-well* (Thermo Scientific) previamente tratadas con una solución o *coating* para aumentar la adhesión de las células. Esta solución se componía de un 78% de ácido acético 17 mM (Sigma), un 20% de poli-D-lisina 0,5 mg/ml (Sigma) y un 2% de solución de colágeno tipo 1 (Sigma). Tras tratar las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, se retiró la solución y se lavaron los pocillos con PBS estéril, añadiéndose posteriormente 500 μ l de medio completo de cresta neural a cada uno de ellos. Las placas se depositaron en el incubador, para equilibrar el medio en cuanto a pH y temperatura, y a continuación se sembraron las células separadas por FACS (TH/HNK en varios pocillos y TH en un pocillo como control), a baja densidad (500 células por pocillo). Por último, los compuestos que se querían estudiar se añadieron a algunos de los pocillos, y sus controles (soluciones vehículo) a otros pocillos, manteniéndose en el incubador de normoxia durante 24-48 horas. Paralelamente, se preparó de igual forma otra placa con un pocillo control, y se introdujo el mismo tiempo pero en el incubador de hipoxia (3% O₂).

3.3. Inmunocitoquímica de células en adherente

Las células en condiciones adherentes se fijaron con solución PFA al 4%, durante 20 minutos a temperatura ambiente, y tras retirar la solución fijadora se lavó con PBS durante 10 minutos en agitación. Se realizaron 3 lavados antes de poner solución de bloqueo durante 1 hora en agitación. Posteriormente, se añadieron los anticuerpos primarios *mouse IgG1 anti-TH* (1:500; Sigma) y *rabbit anti-Ki67* (1:200; Thermo Scientific), diluidos en solución de bloqueo, y se colocó la placa en agitación a 4°C hasta el día siguiente. El segundo día se realizaron 3 lavados con PBS con BSA (Bovine Serum Albumin) al 0,1% durante 10 minutos cada uno, y a continuación se añadieron los anticuerpos secundarios *AlexaFluor 488-goat-anti-mouse-IgM* (1:200; Molecular Probes) y *AlexaFluor 568-goat-anti-rabbit-IgG* (1:500; Molecular Probes), diluidos también en solución de bloqueo, incubándose de 1 a 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Tras esta incubación de los anticuerpos secundarios, se llevó a cabo un único lavado de 10 minutos con PBS y en agitación, y se realizó el marcaje de los núcleos con DAPI (Sigma) (en PBS a 1:1000) durante 10 minutos. Por último, se lavó la tinción de DAPI con PBS, y se almacenaron las placas a 4°C hasta su observación al microscopio. Para la adquisición de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX-71.

3.4. Imágenes de célula viva mediante microscopía *Time-Lapse*

Un tipo de estudio adicional de proliferación, que se llevó a cabo con células vivas, fue mediante la utilización de la técnica de microscopía *time-lapse*. La preparación de las muestras para esta técnica fue muy similar a la descrita en el apartado anterior para los ensayos de proliferación con compuestos. Las células (TH/HNK y TH), separadas por FACS, se sembraron a baja densidad (1500 células por pocillo), en una placa *Nunc Multidish 6-well* (Thermo Scientific) previamente tratada para aumentar la adherencia con una solución de *coating* (ver apartado anterior), y conteniendo 2,5 ml de medio completo de cresta neural por pocillo. Posteriormente, se depositaron 24 horas en el incubador de normoxia para asegurar la adhesión de las células. Por

último, la placa se introdujo en la cámara de incubación del microscopio de *time-lapse*, para dar comienzo a la grabación.

Para realizar este tipo de experimento se utilizó un microscopio invertido *Nikon TiE Eclipse*, con una cámara oscura acoplada a la pletina, y un sistema de flujo de gases Okolab, que genera una atmósfera controlada y regulable tanto de temperatura (37°C), como de gases (5% CO₂ y 20% ó 10% O₂). Utilizando la técnica de contraste de Hoffmann para dar relieve y profundidad a las imágenes, y con el objetivo 20X, se programó el sistema para que adquiriera una foto cada 15 minutos durante un total de 48 horas. Se tomaron imágenes de 8 o de 12 bits, con 1344 x 1024 píxeles en escala de grises, en un campo total de 215 x 164 micras, y contando con un total de 80-100 campos distintos (mitad para TH/HNK y mitad para TH) en cada experimento. Tras terminar la grabación, se fijaron las células y se realizó una tinción por inmunocitoquímica tal y como se ha descrito previamente para células en adherente. Por último, se volvió a colocar la placa en la pletina del microscopio de *time-lapse*, se ajustaron las posiciones para corregir la deriva, y se programó una última captura para cada posición pero en fluorescencia, utilizando el filtro de FITC y el de DAPI. De esta forma se tuvo registro del fenotipo celular de cada una de las células grabadas.

Las imágenes se adquirieron en formato TIFF (*Tagged Image File Format*), y tanto el procesamiento de las imágenes como la composición de los vídeos se realizó con el programa Image J/Fiji.

4. Estudios *in silico*

4.1. Procesamiento de datos y análisis del *microarray* de expresión mediante TAC (*Transcriptome Analysis Console*)

El software TAC (*Transcriptome Analysis Console*) ha sido desarrollado por Affymetrix para la identificación de genes y el análisis de la expresión diferencial en estudios de *microarray*. Tras introducir los datos crudos (archivos “.CEL”) en el software, realizamos de manera automática un análisis de la

varianza (*ANOVA one-way* para muestras no pareadas) de los perfiles diferenciales de nuestras dos condiciones: TH/HNK vs. TH. Así se generaron varios parámetros, entre los que destacamos los siguientes:

- *Fold change (linear)* (FC) → nivel de cambio lineal del \log_2 de la *ratio* de las TH/HNK versus las TH.
- *ANOVA p-value* → test estadístico que indica la posibilidad de que los datos de expresión de genes que sufren cambios significativos se acerquen a un falso positivo.
- *FDR p-value* → corresponde al *False Discovery Rate p-value*, y se calcula utilizando un ajuste descrito por Benjamini y Hochberg. El concepto es el mismo pero es más restrictivo que el *ANOVA p-value* sin ajustar.

A continuación se seleccionaron las condiciones óptimas de *Fold Change* y *p-value*, para filtrar los 30.429 genes y acotar así el análisis. De esta forma se pudieron analizar variaciones significativas en la expresión de genes seleccionados, sin llegar a ser tan restrictivos como para perder información. El filtro de corte utilizado fue un *Fold Change* >2 o <-2 , y un *ANOVA p-value* $<0,05$ (para un intervalo de confianza del 95%), lo que generó una lista de 588 genes diferencialmente expresados entre las muestras TH/HNK y TH. De ellos, 331 genes estaban regulados al alza (significativamente más expresados en la población TH/HNK), mientras que otros 257 genes estaban regulados a la baja (significativamente más expresados en las TH).

Al aplicar estos criterios en el *software* TAC, se generaron distintos tipos de representaciones gráficas de los datos: *Volcano plots* para visualizar los FC más significativos, *Scatter plots* para ver la dispersión de los cambios de expresión, *Heatmaps* o mapas de calor, que realizan agrupaciones jerárquicas de las muestras y los genes basándose en sus niveles de expresión, y cambios de expresión génica de moléculas y rutas representadas visualmente en forma de Wikipathways.

4.2. Análisis de los *microarrays* de expresión génica mediante IPA

El software IPA (*Ingenuity Pathways Analysis*), desarrollado por Qiagen, permite el manejo de grandes grupos de datos de expresión génica. Esto nos permite realizar estudios en profundidad sobre los procesos biológicos en los que intervienen estos genes, y las rutas en las que participan. Este software provee de las herramientas necesarias para desarrollar todo el potencial que se puede obtener de un análisis de expresión génica por *microarray*.

El análisis mediante el software IPA se basa en información proveniente de la *Ingenuity knowledge database*, que es una base de datos que encuentra y revisa de forma automatizada el material publicado en un amplio rango de publicaciones científicas, lo que mantiene la base de datos siempre actualizada. El material encontrado es revisado manualmente por personal experto, que extrae los datos de las mejores publicaciones, y los enriquece añadiéndoles detalles contextualizados. De esta manera se crean los modelos de rutas, listas de toxicidad, etc.

En nuestro caso, para analizar los datos de expresión génica diferencial entre las dos poblaciones (TH/HNK versus TH), se creó un análisis central (*IPA analysis core*) seleccionando la plataforma *Ingenuity knowledge genes (genes only)*. El tamaño ideal que debe tener un conjunto de datos para el análisis de expresión génica en IPA es de entre 200 y 3000 genes. El nuestro se realizó con 20.887 genes. Los criterios para la selección de genes fueron los mismos que se habían usado para el análisis en TAC. Se filtraron los genes en base a un FC >2 o <-2, y un *p-value* <0,05. Una vez aplicados los filtros, el número de moléculas idóneo para analizar las *networks* y las funciones biológicas estaría entre 100 y 2000. En nuestro análisis se obtuvieron 761 moléculas. Generalmente durante el análisis central, IPA divide los datos y los organiza en grupos basándose en la conectividad entre moléculas (*networks*), en funciones celulares en las que intervienen, y en si están implicadas en rutas canónicas. Todas las agrupaciones y análisis que realiza el programa se basan en los datos obtenidos mediante dos estadísticos distintos:

- *p-value* → se calcula mediante el Test exacto de Fisher, y refleja la probabilidad de que la asociación o solapamiento entre un grupo significativo de moléculas de nuestro experimento y un proceso o ruta dado, sea debido al azar.
- *Z-score* → aplicado en algunos tipos de análisis, aporta predicciones acerca de los procesos que se encuentran aguas arriba (*upstream*) o aguas abajo (*downstream*), ya que tiene en cuenta el efecto direccional que pueda tener la regulación de una molécula sobre otra.

Los tipos de análisis que se pueden realizar en el *IPA core analysis* son:

- *Pathway analysis* → predice las rutas que están cambiando en base a la expresión génica. Sirve para predecir efectos direccionales en las rutas.
- *Upstream regulator analysis* → predice qué reguladores son los que provocan los cambios observados en la expresión génica. Predice la dirección del regulador, y predice rutas relevantes en base a reguladores *upstream*.
- *Diseases and functions analysis* → predice consecuencias biológicas (en procesos celulares o en funciones biológicas) basadas en la expresión génica, y predice el cambio direccional que tomará esa función biológica (aumento o disminución, por ejemplo).
- *Regulator effects* → lleva a cabo modelos de interacciones entre *pathways*, a partir de la predicción de reguladores que se encuentren aguas arriba, a través de la expresión diferencial de genes, y encaminado a procesos biológicos.
- *Networks* → predice la interacción de genes que no están direccionados unos con respecto a otros.

4.3. Análisis estadístico de los datos

En este trabajo de tesis todos los datos estadísticos se han expresado como la media \pm el error estándar de la media (s.e.m., *standard error of the*

media). Las comparaciones estadísticas se hicieron mediante la *prueba t de Student* de dos colas, excepto en la figura 20I que se utilizó un test ANOVA One-Way, y en la figura 18E donde se realizó un *test de Shapiro-Wilk* para comprobar la normalidad de las muestras, y al ser negativo el resultado, se realizó una comparación con el *test de Wilcoxon*, con el que se obtuvo una significación de $p=0,03$. En general, se consideraron significativos los datos con un p-value de $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) o $p<0,001$ (***).

5. Anexos y tablas

5.1. Anexo de soluciones

Solución de Tyrode $2Ca^{+2}$ $1Mg^{+2}$: (1 L)

NaCl (Sigma) → 8,65 gr

KCl (Sigma) → 0,15 gr

MgCl₂·6H₂O (Sigma) → 0,6 gr

Glucosa (Sigma) → 1,8 gr

HEPES (Gibco) → 2,38 gr

pH: 7,4

Solución enzimática para dispersión: (1 ml)

PBS (Gibco) → 1 ml

Tripsina (Sigma) → 10 µl (0,3 mg/ml)

Colagenasa tipo II (Sigma) → 10 µl (0,6 mg/ml)

Elastasa porcina (Calbiochem) → 10 µl (0,35 U/ml)

Solución de CaCl 5mM → 10 µl (50 µM)

Medio completo de cresta neural: (500 ml)

DMEM/F12 (Gibco) → 405 ml

FBS (Gibco) → 75 ml (15%)

N2 (Gibco) → 5 ml (1%)

B27 (Gibco) → 10 ml (2%)

Penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco) → 5 ml (1%)

IGF-1 (R&D System) → 100 µl (20 ng/ml)

FGF2 (R&D System) → 500 µl (10 ng/ml)

EGF (R&D System) → 20 µl (20 ng/ml)

Solución de bloqueo: (50 ml)

PBS (Gibco) → 43,5 ml

BSA (Sigma) → 0,05 gr (1 mg/ml)

Solución de tritón al 10% (Sigma) → 1,5 ml (0,3%)

Goat serum (Gibco) → 5 ml (10%)

Solución de FACS: (500 ml)

Leibovitz's L15 (Gibco) → 440 ml

H2O MilliQ → 5 ml

Penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco) → 0,5 ml (1%)

BSA (Sigma) → 1 gr (2 mg/ml)

HEPES (Gibco) → 5 ml (10 mM)

5.2. Primers

Tipo	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto de PCR (bp)
P2X2	(s)GAATCAGAGTGCAACCCCAA (as)TCACAGGCCATCTACTTGAG	375
P2X3	(s)TTGAGGGTAGGGGATGTGGT (as)GCTGATAATGGTGGGGATGA	326
P2Y12	(s)TCCCATTGCTCTACACTGTC (as)TGTCCTTTCTTCTTATTTGC	895
Cph	(s)GTCTCTTTTCGCCGCTTGCTG (as)GCTCATGCCTTCTTTCACCTTCC	437

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Estudio de la proliferación de células glómicas en respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo adulto

Como se ha expuesto en la Introducción, el cuerpo carotídeo es un órgano del sistema nervioso periférico que sufre un claro aumento de tamaño en respuesta a un estímulo hipóxico mantenido. Este crecimiento adaptativo del parénquima neurosecretor del CC implica un aumento en el número de células glómicas neuronales. En estudios clásicos del CC, algunos autores han descrito la posible proliferación de las propias células glómicas en respuesta al estímulo hipóxico (Chen et al., 2007; Paciga et al., 1999; Wang et al., 2008), como explicación al aumento en la celularidad. Tanto mediante tinciones con el marcador BrdU, que se intercala en el ADN durante la fase S del ciclo, como con marcadores más puramente de ciclo celular, como el PCNA o el Ki67, estos autores proponen que las células glómicas del CC, de forma muy distinta a otras células neuronales simpatoadrenales, son capaces de dividirse para generar el crecimiento del parénquima neurosecretor (McGregor et al. 1984; Paciga et al. 1999; Nurse and Fearon 2002; Chen et al. 2007). Aunque el descubrimiento reciente en nuestro grupo de células madre neurales en el CC adulto, capaces de diferenciarse hacia células glómicas en respuesta a hipoxia, podría explicar parte del BrdU heredado en el compartimento neuronal, sigue sin estar clara la naturaleza de esas células TH+ que se tiñen con marcadores de ciclo celular. Para esclarecer esta cuestión, se decidió investigar este fenómeno en profundidad, comenzando por estudios histológicos con distintos marcadores de proliferación.

En un primer ensayo (Fig. 9A-B) se establecieron tres grupos de animales, uno de ellos se mantuvo en condiciones normóxicas de oxigenación (PO₂ 21%), llamado grupo de Normoxia, otro se sometió a hipoxia (PO₂ 10%) durante 7 días (grupo Hipoxia), y el tercero se sometió al estímulo hipóxico paralelamente al grupo de Hipoxia, pero después se mantuvo en condiciones de re-oxigenación (PO₂ 21%) durante otros 7 días (grupo Renormoxia). Para

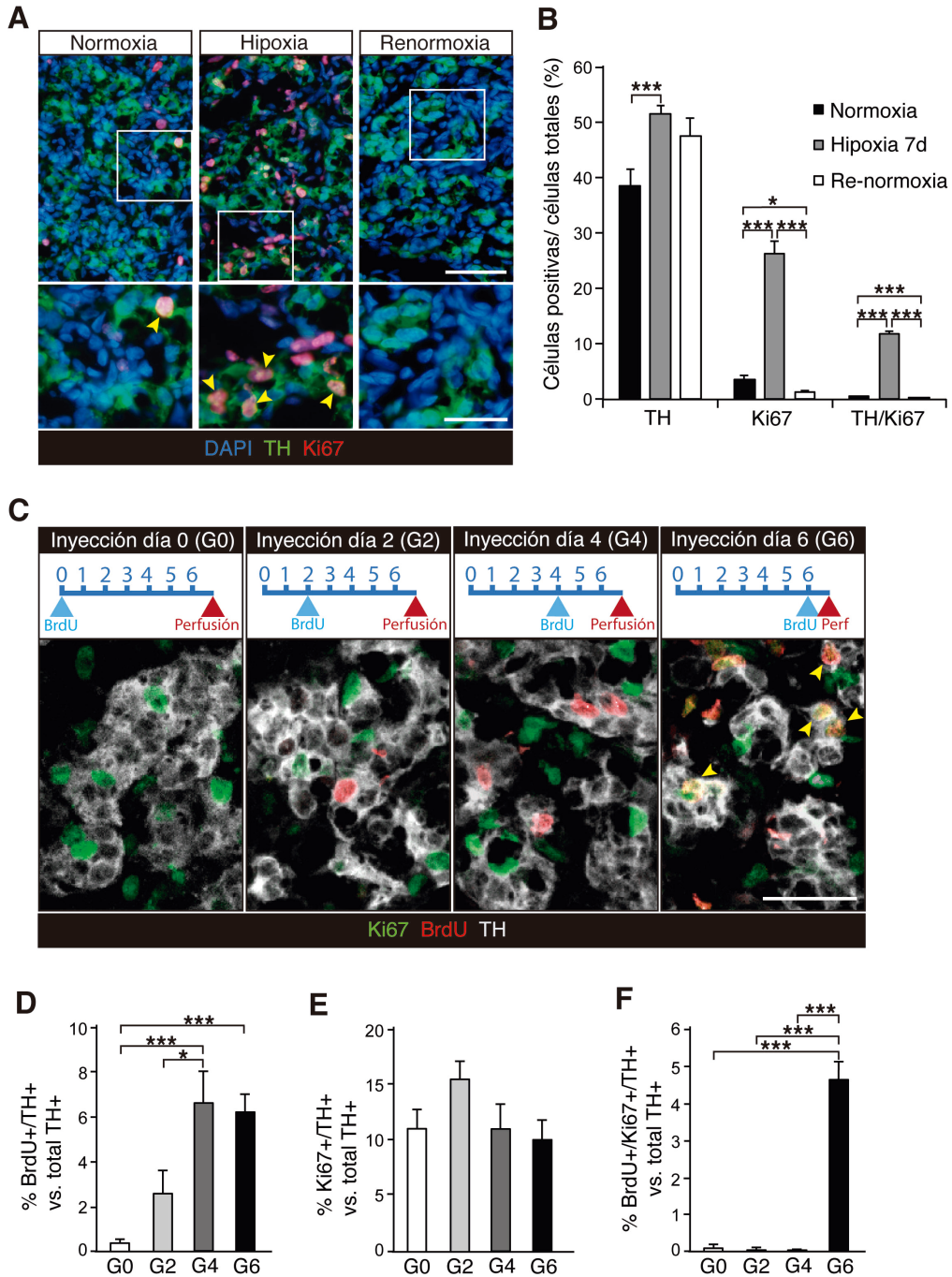


Figura 9. Estudios de proliferación de las células glómicas en respuesta al estímulo hipóxico.

A) Inmunohistoquímica para la detección de TH (verde) y Ki67 (rojo) en rodajas de CC, en condiciones de normoxia, hipoxia de 7 días, y renormoxia de 7 días (tras una hipoxia de 7 días). En los paneles aumentados de abajo se muestran células dobles positivas indicadas con puntas de flecha amarillas. Escalas: 100 μ m arriba y 50 μ m abajo. **B)** Cuantificaciones del porcentaje de células positivas frente al total de células del experimento mostrado en (A) (n= 4-5 CC por grupo). **C)** Imágenes de microscopía de un curso temporal continuo de exposición a hipoxia, donde se marcan las células TH+ en blanco, las células en proliferación (Ki67+) en verde, y las células que se han dividido (BrdU+) en rojo. Ejemplos de células triples positivas se encuentran indicadas con puntas de flecha amarillas. Escala: 40 μ m arriba y 80 μ m abajo. **D), E)** y **F)** Cuantificaciones del curso temporal mostrado en (C). Concretamente se representan los porcentajes de células BrdU+/TH+ frente al total de TH+ (D), las células Ki67+/TH+ (células glómicas en proliferación) frente al total de TH+ (E), y el porcentaje de células triples positivas frente al total de TH+ (F). n= 3-4 CC por grupo del curso temporal. *p<0,05, ***p<0,001.

estudiar la proliferación en estas tres condiciones experimentales, se realizó un marcaje con el anticuerpo Ki67, que marca una proteína nuclear que se encuentra expresada en cualquiera de las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M), mientras que está ausente en G0. En la figura 1A, se pueden observar algunas células glómicas (marcadas con el anticuerpo anti-TH en verde), que se encuentran en estadio proliferativo (Ki67+) en el grupo de Normoxia, aunque de manera aislada y puntual. Sin embargo, en el grupo de Hipoxia son muchas las células glómicas proliferando (TH+/Ki67+). Por último, en el grupo de Renormoxia no se observa prácticamente ninguna célula glómica en proliferación. En el gráfico de la figura 9B se muestra la cuantificación de los datos presentados en el panel A de la misma figura, una cuantificación en la que cabe destacar que tras 7 días de hipoxia el número de células glómicas pasa del $38,6 \pm 2,9\%$ de células totales del órgano en normoxia al $51,6 \pm 1,3\%$ en hipoxia. En esta condición de hipoxia, un $22,9 \pm 1,5\%$ de las células glómicas están en ciclo celular, lo que supone casi una cuarta parte del total de células glómicas del órgano. Para profundizar en este fenómeno de la proliferación de las células glómicas, se decidió realizar estudios de curso temporal combinando marcadores generales de proliferación (Ki67) con marcadores de fase S de la división (BrdU) a distintos tiempos. En la figura 1C se muestra el primero de estos estudios de curso temporal, en el cual se dividieron los animales en 4 grupos y se sometieron todos ellos a hipoxia durante un total de 7 días, para minimizar la contribución de nuevas células neuronales a partir de células madre. Cada grupo recibió una inyección de BrdU en distinto momento (ver esquemas en la Fig. 9C). El primer grupo recibió el BrdU a día 0 (grupo G0), es decir, justo antes de entrar en la cámara de hipoxia. El segundo grupo recibió la inyección tras 2 días en la cámara de hipoxia (G2), el tercer grupo tras 4 días en la cámara de hipoxia (G4), y el último grupo tras 6 días en la cámara de hipoxia (G6). Tras 7 días en hipoxia todos los animales fueron perfundidos y sus tejidos procesados. Con las inyecciones puntuales de BrdU a distintos tiempos (sin BrdU en el agua de bebida), se pretendió marcar las células que estuvieran en fase S en ese momento, y a toda su progenie, con lo cual se puede hacer un seguimiento de la evolución de la proliferación. Los resultados del grupo G2 indican que tras

solo 48 horas en hipoxia ya existían células TH⁺ que estaban replicando su DNA (Fig. 9D), aunque el aumento importante de la proliferación se da alrededor del día 4 (incremento de 6 veces en el número de células BrdU⁺/TH⁺ en el grupo G4 con respecto al grupo G0; Fig. 9D). Sin embargo, y de forma interesante, la cantidad de proliferación se estabiliza en el último grupo (G6), sugiriendo un descenso neto en el número de células TH⁺ que entran en ciclo a partir del día 6. En general, estos resultados sugieren que las células glómicas podrían verdaderamente estar proliferando, y que el pico máximo de proliferación estaría entre los días segundo y cuarto de estímulo. Otra conclusión interesante que puede obtenerse de este experimento de curso temporal es que la longitud del ciclo celular de las células TH⁺ debe ser inferior a 48 horas, por eso no se observan células triples positivas en el grupo G4.

Para corroborar el curso temporal de la proliferación en el compartimento neuronal del órgano, se decidió realizar otro estudio a intervalos de tiempo más cortos, sacrificando los animales siempre tras 48 horas desde la inyección del BrdU, y con BrdU en el agua de bebida durante esas 48 horas. Se hicieron tres grupos de animales, que entraron a la vez en la cámara de hipoxia pero se fueron sacando cada dos días, de modo que el grupo 2d estuvo sólo 2 días en hipoxia, ambos con BrdU, el grupo 4d estuvo 4 días en hipoxia, los dos últimos con BrdU, y el grupo 6d estuvo 6 días en hipoxia, los dos últimos con BrdU (esquemas en la Fig. 10A). La foto del grupo 2 días en la figura 2A muestra que hay células TH⁺ que ya están en ciclo celular (un $15 \pm 5,1\%$ de todas las células TH⁺ son también Ki67⁺, según la cuantificación mostrada en la Fig. 10B), pero aún no hay células BrdU⁺, es decir, en fase S. En el grupo de 4 días la proliferación total de células neuronales aumenta a un $21,3 \pm 1,9\%$ (Fig. 10B), lo que significa que entre los días 3 y 4 de hipoxia se produce el máximo pico de proliferación de células TH. Además, el BrdU en este grupo revela que casi la mitad de las células TH⁺ proliferativas están o han pasado ya por fase S (Fig. 10C). De forma consistente con el curso temporal mostrado en la figura 1, en el grupo de 6 días se vio que la proliferación de las células TH⁺ volvía a los niveles del grupo de 2 días (Fig. 10B y D), lo que implica que entre los días quinto y sexto del estímulo hipóxico

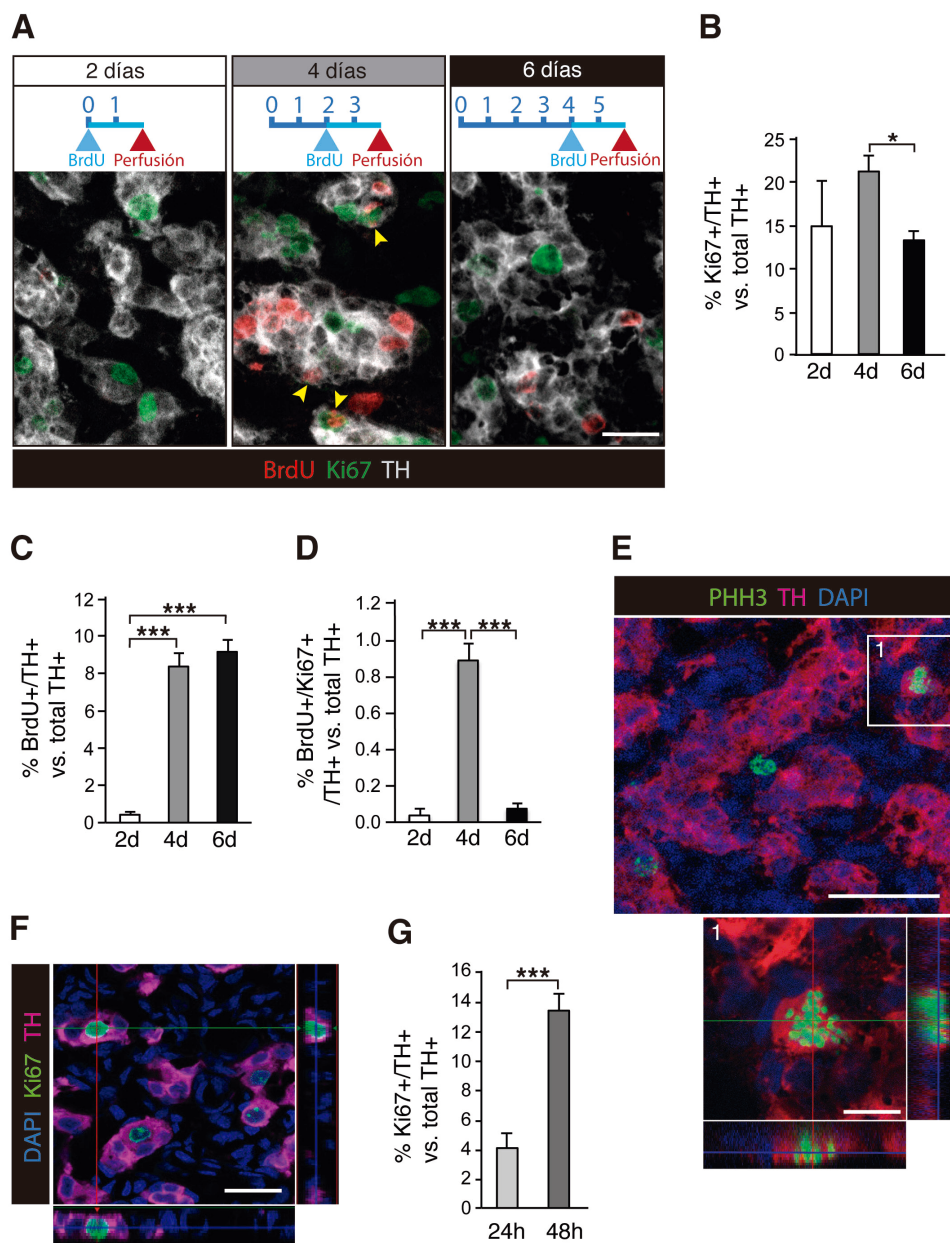


Figura 10. Estudios de proliferación de células TH+ a tiempos cortos.

A) Imágenes de microscopía de un curso temporal a intervalos de tiempo de 48h. La división celular se ha marcado en las últimas 48 horas con BrdU, para estudiar el periodo de división máxima de las células TH+. Las células TH+ se muestran en blanco, las BrdU+ en rojo, y las Ki67+ en verde. Se muestran también ejemplos de células triple positivas, indicados con puntas de flecha amarillas. Escala: 40 μ m. **B)** Cuantificación en porcentaje de células TH+ que están en proliferación (Ki67+/TH+) en relación al total de células TH+, para cada grupo del curso temporal mostrado en (A). **C)** Representación gráfica de los porcentajes de células TH+ que se han dividido en (A) (BrdU+/TH+), con respecto al total de células TH+. **D)** Cuantificación del porcentaje de células triples positivas (BrdU+/Ki67+/TH+) con respecto al total de células TH+, en cada grupo del curso temporal mostrado en (A) (n= 3-4 CC por grupo). **E)** Imagen de microscopía confocal mostrando células TH+ en mitosis. El marcador PHH3 (en verde) marca células mitóticas. En E1 se muestra amplificación de una célula TH+/PHH3+. Escala: 40 μ m (15 μ m en E1). **F)** Imágenes de microscopía confocal de células TH+ (rosa) en proliferación (Ki67+, en verde) de CC de rata tras sólo 24 horas de hipoxia crónica. Escala: 20 μ m. **G)** Cuantificaciones de la frecuencia de células TH+ proliferativas tras 24 y 48 horas de hipoxia crónica (n= 4-6 CC por grupo). *p<0,05, ***p<0,001.

el grueso de células TH⁺ con capacidad de división ya se han dividido. Tomando en consideración todos los resultados de los experimentos de curso temporal, podemos concluir que las células glómicas del CC, o al menos una parte de ellas, tienen capacidad de dividirse, que la proliferación en estas células se activa a tiempos cortos, ya que se puede observar desde el segundo día de estímulo, y que el pico máximo de proliferación y división se produce entre los días tercero y cuarto del estímulo de hipoxia mantenida. Se trata por tanto de una proliferación rápida y transitoria la que tiene lugar en el compartimento neuronal del cuerpo carotídeo adulto en respuesta al estímulo hipóxico.

Para afianzar nuestros resultados con respecto a la división de células TH⁺, se decidió marcar las células con un marcador específico de mitosis como es la fosfohistona H3 (PHH3), que marca a la histona H3 cuando está fosforilada en la Serina 28, lo que solamente ocurre en una fase concreta de la mitosis (Goto, 1999). En la figura 10E se puede observar una imagen de microscopía confocal del parénquima de un CC de un animal tras 4 días de hipoxia, en la que se aprecian dos células TH⁺ que son también positivas para PHH3. La ampliación de una de ellas en el panel inferior permite apreciar la cromatina organizada en cromosomas y la ausencia de una membrana nuclear, típicas características de la profase de la mitosis.

Por último, al ser la proliferación de células neuronales en el CC un proceso tan rápido, quisimos estudiar la activación proliferativa de las células glómicas a tiempos aún más cortos, durante las primeras 24 y 48 horas de hipoxia. En la figura 10F se muestran células TH⁺ en proliferación (Ki67⁺) a tan sólo 24 horas del comienzo del estímulo, cuantificándose hasta un $4,2 \pm 0,8\%$ del total de células TH⁺ (Fig. 10G). Este porcentaje asciende hasta un $13,7 \pm 1,1\%$ en el segundo día de hipoxia, consistente con el resultado a 2 días del curso temporal por intervalos (Fig. 10B).

Este primer conjunto de resultados nos permite concluir que la activación proliferativa de las células glómicas es un proceso muy rápido, que se produce desde el primer día que comienza el estímulo hipóxico, y que al parecer

desencadena la división de estas células en cuestión de 3-4 días. Se trata por tanto de un mecanismo de neurogénesis, o formación de nuevas neuronas, mucho más rápido que la respuesta dependiente de células madre del CC (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014), que aproximadamente requiere de al menos 7 días para completar la proliferación y diferenciación hasta célula glómica.

1.1. Estudio de la subpoblación de células glómicas con capacidad proliferativa mediante el antígeno HNK-1

Una vez corroborada la capacidad proliferativa dentro del compartimento neuronal del CC, una de las primeras cuestiones que surgieron fue si esta capacidad proliferativa era una propiedad común a todas las células glómicas o si era propia sólo de alguna subpoblación. Esta pregunta era relevante dado que en ningún otro sistema se habían observado neuronas que retuvieran capacidad proliferativa. Para intentar esclarecer esta cuestión se probaron marcadores clásicamente utilizados en nuestro laboratorio para separar células TH+. El más prometedor era el marcador HNK-1, pues se había utilizado con éxito en nuestro grupo (Pardal et al., 2007), y al ser un antígeno de membrana (también denominado CD57) permitía la separación de células vivas. Para caracterizar la expresión de este marcador en la población TH+ del CC, y su posible identificación de células glómicas proliferativas, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en combinación con el marcador PHH3 (Fig. 11A y B), utilizando para ello CC de animales expuestos 48 horas a hipoxia. En los resultados puede apreciarse que solo algunas células glómicas expresan el marcador HNK-1, coincidiendo además con aquellas que están en mitosis (PHH3+; Fig. 11A y B).

Una vez localizado un marcador específico de las células glómicas con capacidad proliferativa, quisimos profundizar en la caracterización de estas células TH+/HNK-1+ y estudiar la expresión del marcador en condiciones de normoxia. Al ser HNK-1 un marcador de membrana, y que por tanto suele disponerse en forma de agrupaciones irregulares en distintos puntos de la membrana de las células, resultaba más fiable la cuantificación de su expresión

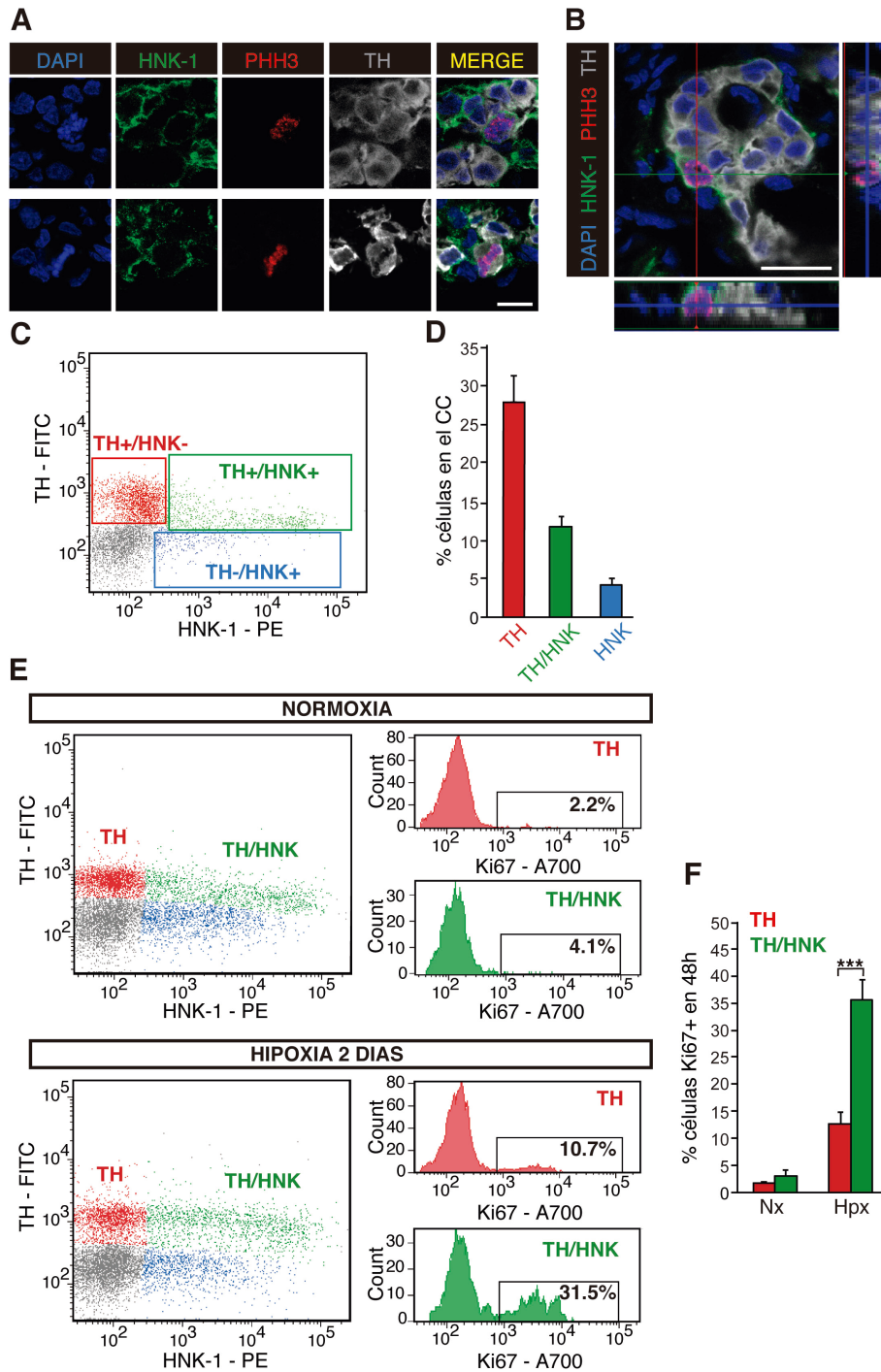


Figura 11. Identificación de la población TH+/HNK+ y estudio de su capacidad proliferativa.

A) Imágenes de microscopía que muestran células TH+ (blanco) y HNK+ (verde) en mitosis (PHH3+, en rojo), tras 48 horas de hipoxia mantenida. **B)** Fotografía de microscopía confocal que muestra un glomérulo de CC de rata tras 48 horas de hipoxia, con una célula TH+/HNK+/PHH3+ en la periferia del glomérulo, localización habitual de este tipo celular. Escala: 20 μ m. **C)** *Plot* de citometría de células de CC de rata marcadas con TH y HNK-1, en el que se puede apreciar tres subpoblaciones: las células TH+/HNK- (TH, en rojo), las células TH+/HNK+ (TH/HNK en verde), y las células TH-/HNK+ (HNK, en azul). **D)** Porcentaje de cada una de las tres subpoblaciones identificadas en (C) con respecto al total de células del CC de rata normóxica (n= 5 experimentos). **E)** Análisis de proliferación de las células TH y TH/HNK por citometría de flujo. En los *plots* se muestran los porcentajes de células TH en proliferación (Ki67+) y TH/HNK en proliferación (Ki67+), en normoxia (n= 5 experimentos) e hipoxia de 2 días (n= 6 experimentos) para el experimento concreto mostrado. **F)** Cuantificación de las medias de proliferación por citometría de flujo, tomando en consideración todos los experimentos llevados a cabo como el mostrado en (E). ***p<0,001.

total por técnicas citométricas. Para poder combinar el estudio de la expresión de TH y de HNK-1 por citometría, se llevó a cabo tinción intra y extracelular en células dispersas y fijadas de CC completo (ver Materiales y Métodos). Como resultado de esta tinción se caracterizaron 3 poblaciones bien determinadas en el CC (Fig. 11C y D): a) las células glómicas que no expresan HNK-1 (población TH+/HNK-), que suponen un $27,8\pm 3,6\%$ de la población total del CC (representadas en color rojo); b) las células glómicas que co-expresan HNK-1 (población TH+/HNK+), que constituyen un $11,9\pm 1,3\%$ de la población total (representadas en color verde); y c) un pequeño grupo de células que expresan HNK-1 pero no expresan el marcador TH (población TH-/HNK+), que por tanto no son células glómicas, y que suman un $4,4\pm 0,6\%$ del total de células del CC (representadas en azul). Cabe destacar que el nivel de expresión del marcador HNK-1 en la población representada en verde con respecto a la población representada en azul es muy distinto, siendo por lo general mucho mayor la expresión de HNK-1 en las células glómicas dobles positivas (TH+/HNK+; verde en Fig. 11C) que en las que no son glómicas (TH-/HNK+; azul en Fig. 11C). Otro dato interesante que puede extraerse de este estudio es que el nivel de expresión del marcador TH es mucho mayor en la población que sólo expresa TH (rojo en la Fig. 11C) en comparación con la doble positiva (verde en la Fig. 11C). Teniendo en cuenta que el marcador TH es típico de diferenciación, y que las células TH+/HNK+ presentan un nivel de expresión de esta TH de moderado a bajo, estos datos nos hacen sospechar cierta inmadurez neuronal en este tipo celular.

Decidimos a continuación combinar el análisis de citometría descrito, con Ki67 como marcador de proliferación, para comprobar si verdaderamente las células TH+/HNK+ (representadas en adelante como TH/HNK) son las células glómicas que entran en proliferación bajo el estímulo hipóxico. En el *plot* obtenido a partir de un animal normóxico (Fig. 11E, panel superior) se muestra un ejemplo de la proliferación de los dos tipos celulares TH+ en condiciones basales, existiendo una división celular remanente del $1,7\pm 0,3\%$ de media en las células TH+/HNK- (representadas en adelante como células TH), frente al $3,2\pm 1\%$ de media en las TH/HNK. Sin embargo, tras solo dos días de

exposición de los animales a hipoxia (Fig. 11E, *plots* en el panel inferior), esta proliferación asciende hasta un promedio de $12,7\pm 2,2\%$ en las células TH y hasta un $35,6\pm 3,7\%$ en las dobles positivas (Fig. 11F). Cabe destacar que la técnica de tinción para citometría que incluye marcadores intranucleares (ver Materiales y Métodos), como es el caso del Ki67, es bastante agresiva para la membrana, por lo que podríamos estar perdiendo detección del marcador de membrana HNK-1 en las células dobles positivas. Esto se traduciría en que estaríamos subestimando el porcentaje de células dobles positivas, es decir células glómicas proliferativas. Además, las células dañadas engrosarían la población TH+/HNK-, causando igualmente una sobreestimación del porcentaje de células TH+/HNK- en proliferación.

La población que sólo expresa el marcador HNK-1 (azul en la Fig. 11C y E), al no tratarse de células glómicas no formó parte de este análisis inicial, sino que se estudiará brevemente más adelante en un apartado independiente. A continuación decidimos centrarnos en afinar la caracterización de las células glómicas con capacidad proliferativa, y en estudiar comparativamente las células TH y las células TH/HNK.

1.2. Caracterización de las células TH/HNK durante una hipoxia prolongada

Dada la respuesta proliferativa generada en las células TH/HNK con tan sólo dos días de hipoxia (Fig. 11E y F), y para continuar con la caracterización inicial de la naturaleza de estas células, se decidió estudiar el efecto de la hipoxia a tiempos más largos. Para ello se seleccionaron tres grupos de animales: un grupo se sometió a hipoxia durante 5 días, otro durante 21 días, y el tercer grupo se mantuvo en normoxia de manera paralela y el mismo tiempo (la mitad de ellos durante 5 días y la otra mitad durante 21 días). Tras las exposiciones a hipoxia los animales se procesaron de manera individual, hasta obtener el conjunto completo de células de CC dispersas (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, se realizó la tinción para análisis por citometría utilizando anticuerpos frente a los marcadores TH y HNK-1, de la manera anteriormente descrita. En la figura 12A se muestran las poblaciones TH

(23,3%) y TH/HNK (9,3%) en condiciones de normoxia, resaltando con una elipse la población que expresa el antígeno HNK-1 con mayor intensidad (HNK *high*), que expresa también el antígeno TH aunque a niveles bajos (se trata del grueso de la población TH/HNK). En la figura 12B, tras 5 días de hipoxia crónica, se pueden observar tres fenómenos importantes: a) la población TH/HNK total ha disminuido en porcentaje (de 9,3 a 6%, células en verde); b) la población HNK *high* prácticamente desaparece (células dentro de la elipse), mientras que la población TH aumenta en casi un 10% más; y c) se observa un aumento muy significativo del nivel de expresión del marcador TH tanto en la población de células TH como en las TH/HNK, poniéndose ambas a un nivel sin diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Fig. 12E). En la figura 12C se muestran los resultados obtenidos tras una exposición de los animales a hipoxia durante 21 días. En este *plot* de citometría puede observarse que la población TH/HNK prácticamente ha desaparecido (1,2%), y el remanente que queda expresa unos niveles de HNK-1 muy bajos, mientras que su expresión de TH sigue siendo alta. En la figura 12D se muestran las cuantificaciones de las dos poblaciones en los tres grupos experimentales de animales, encontrándose diferencias significativas en las variaciones sufridas por la población de las células TH/HNK, que se va depletando a medida que incrementa el número de días de exposición a hipoxia. En la figura 12E se puede apreciar cómo aumenta el nivel de fluorescencia medio para FITC (expresión de TH) en ambas poblaciones a lo largo del estímulo hipóxico. En el gráfico de la figura 12F se representa la disminución de la fluorescencia media para PE (expresión de HNK-1) en la población TH/HNK, la cual no solo disminuye en frecuencia sino que además disminuye su expresión del antígeno de superficie con la exposición a hipoxia crónica. Todos estos resultados tomados en conjunto parecen indicar que la exposición prolongada al estímulo hipóxico hace que la población TH/HNK sufra un proceso de tipo madurativo, mediante el cual estas células pasan a convertirse en células TH maduras, engrosando así la población de células glómicas postmitóticas. Este fenómeno constituiría un nuevo mecanismo celular de neurogénesis en el CC adulto, gracias al cual se contribuiría de manera muy rápida al crecimiento adaptativo del órgano en respuesta a hipoxia.

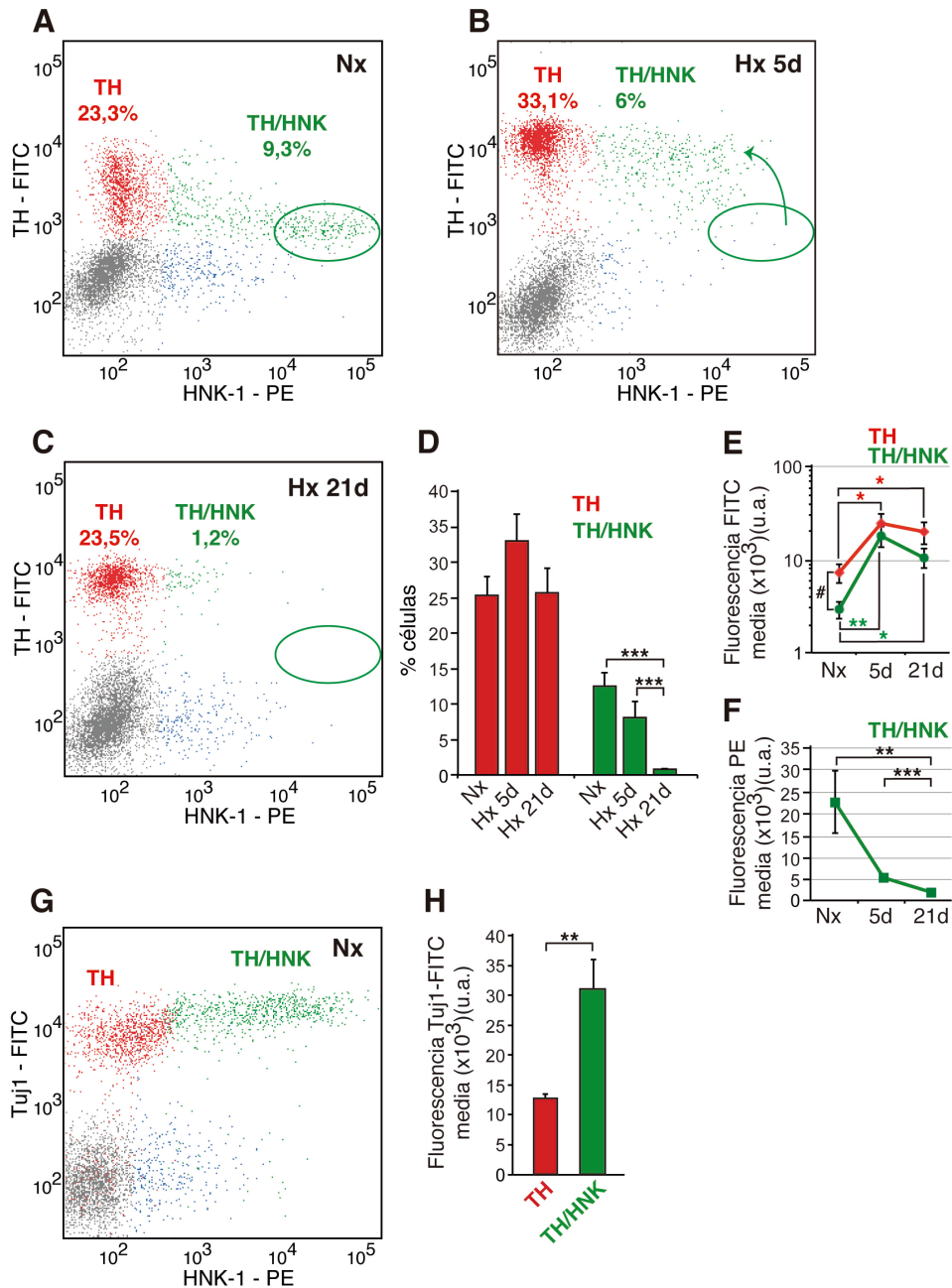


Figura 12. Análisis citométrico de la dinámica de la población de neuroblastos TH/HNK en hipoxia prolongada.

A) Plot de citometría de células del CC en normoxia, marcadas con TH y HNK-1. La población TH/HNK correspondiente a los neuroblastos del CC se muestra rodeada por una elipse verde. **B)** Plot de citometría de células dispersas del CC, provenientes de animales que han estado 5 días en condiciones de hipoxia crónica. **C)** Plot de citometría de células del CC de animales que se han sometido a hipoxia durante 21 días, en el que se puede apreciar que la población TH/HNK (verde) casi ha desaparecido. **D)** Cuantificaciones del porcentaje de células TH y TH/HNK de los experimentos de citometría en normoxia, hipoxia de 5 días e hipoxia de 21 días (n= 5-7 experimentos independientes por grupo). **E)** Representación gráfica de los niveles de fluorescencia en FITC, que representa los niveles de expresión del antígeno TH, tanto en la población TH (línea roja) como en la población TH/HNK (línea verde). **F)** Representación gráfica de los niveles de fluorescencia para PE en la población TH/HNK (verde), que representa los niveles del antígeno HNK-1 en esta población. **G)** Plot de citometría de flujo de células de CC, procedentes de animales normóxicos, donde se ha realizado tinción para los marcadores HNK-1 frente al marcador de neuroblastos Tuj1. **H)** Representación gráfica de los niveles medios de expresión de Tuj1 asociado al fluoróforo FITC, en las poblaciones TH y TH/HNK (n= 3 experimentos independientes). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Para corroborar por citometría de flujo el carácter inmaduro de las células TH/HNK, se llevó a cabo un nuevo estudio con los marcadores HNK-1 y TH pero en este caso combinándolos con un marcador típico de neuroblastos inmaduros como es la beta III tubulina o Tuj1. En la figura 12G se muestran ambas poblaciones (TH y TH/HNK) en un *plot* de citometría donde se representa la expresión de Tuj1 (canal FITC) frente a la expresión de HNK-1 (canal PE). Consistente con nuestra hipótesis de la inmadurez, los niveles de expresión de Tuj1 en la población TH/HNK son más altos que en la población TH. El gráfico de la figura 12H muestra una cuantificación de los niveles de expresión de Tuj1 en ambas poblaciones celulares, y confirma la mayor expresión de este marcador de inmadurez en la población TH/HNK).

2. Caracterización morfo-funcional de la población TH/HNK del CC en comparación con las neuronas maduras

2.1. Estudios morfológicos de ambos tipos de células neuronales del CC por microscopía electrónica

Una vez identificada la población de células neuronales con capacidad proliferativa, gracias al marcador HNK-1, y teniendo en cuenta la hipótesis de su inmadurez (ver apartados anteriores), procedimos a completar la caracterización morfológica de estas células mediante microscopía electrónica, antes de pasar a los estudios funcionales comparativos. Para analizar la ultraestructura de ambas poblaciones de células neuronales se llevó a cabo microscopía electrónica de cuerpos carotídeos de ratas normóxicas, en colaboración con la Dra. Valentina Annese, experta de nuestro laboratorio en esta técnica. Para poder identificar y distinguir a las células TH/HNK, la Dra. Annese combinó la técnica de microscopía electrónica con técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-HNK-1 conjugados con partículas de oro (ver Materiales y Métodos). Esta técnica permite visualizar la expresión del marcador HNK-1 mediante la detección de los acúmulos de partículas de oro en las fotografías del microscopio electrónico. En la figura 13A se muestra una célula TH/HNK, pseudocoloreada en verde para facilitar su identificación, con el

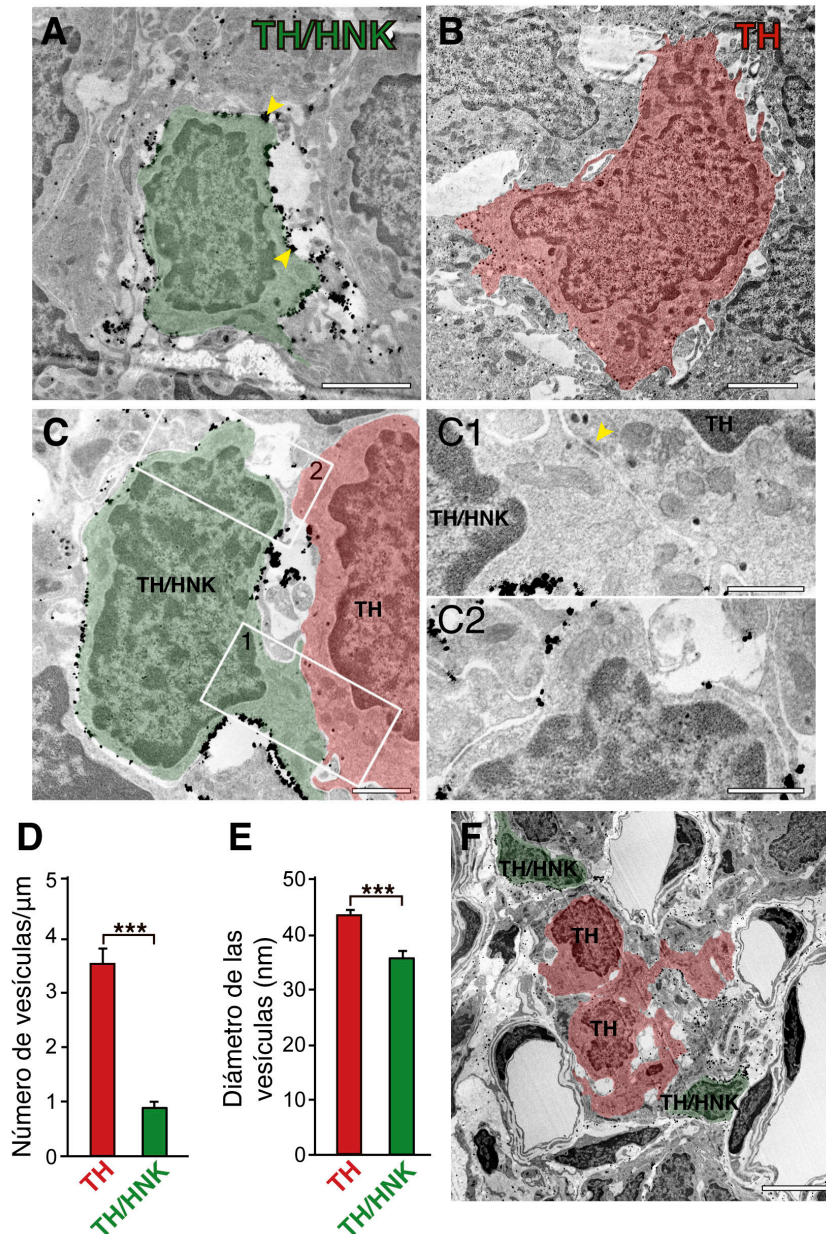


Figura 13. Estudios morfométricos de las poblaciones TH y TH/HNK del CC por microscopía electrónica.

A) Imagen de microscopía electrónica (M.E.) con inmunodetección del marcador HNK-1 mediante oro coloidal. Aparece una célula TH/HNK (pseudocoloreada en verde) marcada con partículas de oro coloidal (puntas de flecha amarillas). Escala: 2 μm. **B)** Imagen de inmunohistoquímica para HNK-1 por M.E., en la que se aprecia una célula TH (pseudocoloreada en rojo), negativa para el marcador HNK-1. En (A) y (B) se pueden apreciar las diferencias entre ambos tipos celulares en cuanto a tamaño, cantidad de mitocondrias y vesículas, y tamaño del núcleo. Escala: 2 μm. **C)** Fotografía de M.E. en la que se muestra la interacción entre la célula TH y la TH/HNK. En C1 se muestra ampliada una zona de contacto entre los dos tipos celulares. La punta de flecha amarilla indica una zona electrón-densa de unión entre ambos tipos celulares. En C2 se muestra la ausencia casi total de vesículas en el citoplasma de los neuroblastos. Escalas: 1 μm. **D)** y **E)** Cuantificaciones del número de vesículas en cada tipo celular (D), y del diámetro de las vesículas (E) (n= 31 células TH y 33 células TH/HNK, de 3 animales distintos). **F)** Imagen de M.E. de un glomérulo de CC de rata, en el que se aprecia la localización de los neuroblastos hacia la periferia del glomérulo, rodeando a las células glómicas que se encuentran en el centro. Escala: 5 μm. ***p<0,001.

marcaje de HNK-1 en forma de agregados electrón-densos a lo largo de toda la membrana (ejemplos de agregados señalizados mediante puntas de flecha amarillas). La figura 13B en cambio, muestra una célula glómica madura, pseudocoloreada en rojo, completamente negativa para el marcaje HNK-1. Las células glómicas se pueden distinguir morfológicamente en microscopía electrónica sin necesidad de usar marcadores, ya que sus características distintivas están clásicamente muy bien descritas (Chen and Yates, 1984; Hellström, 1975). Entre estas características morfológicas propias de las células glómicas se encuentran su gran tamaño, la presencia de numerosas mitocondrias y de un gran número de vesículas de grano denso, y el mayor tamaño del núcleo con respecto a los demás tipos celulares. Todas estas características pueden apreciarse en el ejemplo mostrado en la figura 13B. Contrariamente, la célula TH/HNK mostrada en la figura 13A es de menor tamaño, parece poseer menos mitocondrias, y claramente contiene muy pocas vesículas, características todas ellas esperables en un tipo celular inmaduro.

Las células TH/HNK suelen aparecer siempre en contacto con alguna célula glómica (Fig. 13C), mostrando incluso zonas electrón-densas de interacción (punta de flecha amarilla en la Fig. 13C1), probablemente correspondientes a acúmulos de receptores y proteínas de membrana. El aspecto del citoplasma de ambos tipos celulares es por tanto también muy distinto. El de las células maduras aparece generalmente lleno de mitocondrias y de vesículas de grano denso, mientras que el de las células TH/HNK contiene menos mitocondrias, muy pocas vesículas (Fig. 13C1 y 2), y aquellas vesículas que están presentes son de menor tamaño. Los gráficos en los paneles D y E de la figura 13 muestran cuantificaciones del número de vesículas por micra de longitud de membrana, y del diámetro medio de las vesículas en ambos tipos celulares, encontrándose diferencias muy significativas en ambos casos, apuntando de nuevo hacia el carácter inmaduro de las células TH/HNK.

Por último, cabe destacar también de estos estudios de microscopía electrónica la localización especial de las células TH/HNK con respecto al glomérulo de neuronas TH maduras. La micrografía mostrada en la figura 13F

sugiere una localización de las células TH/HNK en la periferia de los glomérulos, lo cual podría estar relacionado con su carácter inmaduro y su posible función de formación de nuevos glomérulos.

2.2. Aislamiento prospectivo de células neuronales del CC para su caracterización funcional

Una vez completada la identificación y caracterización morfológica de los dos subtipos de células neuronales en el CC, procedimos a intentar poner a punto un método de separación prospectiva de estas células, para facilitar su estudio funcional. El aislamiento de células dopaminérgicas funcionales a partir del CC para su caracterización biológica ha sido uno de los objetivos clásicos de nuestro grupo durante los últimos años. Para poder cultivar estas células o para aislar su ARN se han usado en ocasiones ratones mutantes que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor de la tirosina hidroxilasa (Platero-Luengo et al., 2014). Sin embargo, estos trabajos con ratones transgénicos en general no permiten conseguir los números de células que permite el trabajo con rata. Recientemente, en nuestro grupo se utilizó precisamente el marcador CD57 (HNK-1), típico de cresta neural (Bronner-Fraser, 1987), para aislar células glómicas funcionales de rata mediante la técnica de FACS (Pardal et al., 2007). Sin embargo, como se ha descrito en los apartados anteriores, este marcador solo identifica una subpoblación de células dopaminérgicas, y no permite la separación del total de células neuronales del órgano.

En otros sistemas celulares se han usado a veces propiedades físicas de las células para separarlas por citometría de flujo, sobre todo cuando no se cuenta con anticuerpos de membrana específicos para la población de interés. Es el caso de los protocolos clásicos de separación de las distintas subpoblaciones de células sanguíneas presentes en la médula ósea (Dorward et al., 2013; Weil and Chused, 1981). Estas propiedades físicas celulares, aprovechadas por la citometría de flujo, se basan en la dispersión de la luz que se produce cuando las células atraviesan el haz del láser. Esta dispersión de la luz es recogida por los sistemas ópticos del citómetro de flujo para generar dos

parámetros de medida que son: FSC (*forward scatter*), relativo a la luz que se dispersa hacia adelante, y SSC (*side scatter*), relativo a la luz que se dispersa lateralmente. El FSC aporta información acerca del tamaño de la célula que ha atravesado el haz de luz, mientras que el SSC genera un valor proporcional a la complejidad interna y granulosidad de la célula. La combinación de estos dos parámetros físicos es única para cada tipo celular, y en el caso de poblaciones heterogéneas, como por ejemplo la médula ósea, se puede utilizar para distinguir las distintas subpoblaciones celulares (Boatman et al., 2013). En el CC se ha descrito que las células glómicas son las de mayor tamaño del órgano, y también de mayor complejidad, debido a su gran número de mitocondrias, numerosísimas vesículas, etc. (Chen and Yates, 1984; Hellström, 1975). Estas propiedades hacen que las células glómicas por tanto tengan un tamaño y una complejidad interna mucho mayores que el resto de tipos celulares del CC.

Por otro lado, en citometría de manera clásica se han descrito algunos tejidos o tipos celulares que pueden generar fluorescencia basal a longitudes de onda concretas. Este fenómeno se conoce como “autofluorescencia” y genera una señal de fondo detectable por el citómetro y que es necesario tener en cuenta al analizar los resultados. Pero esta característica de autofluorescencia también se ha utilizado, en determinados casos, para el aislamiento de poblaciones discretas mediante la técnica de FACS (Dorward et al., 2013). Por ejemplo, se ha descrito que metabolitos como el NAD(P)H o el FAD, que suelen generarse en la mitocondria, producen autofluorescencia en un rango de emisión característico, por lo que células que estén produciendo altos niveles de estos metabolitos serán especialmente autofluorescentes (Shah et al., 2016). Como se ha mencionado anteriormente, las células glómicas contienen gran cantidad de mitocondrias y son metabólicamente muy activas, lo que podría provocar alta autofluorescencia. El *plot* de citometría de la figura 6A muestra una típica tinción de las células del CC con el anticuerpo anti-HNK-1, representada frente a un canal de fluorescencia no utilizado por ninguna tinción con anticuerpos (FL2, *Fluorescence emission channel 2*), canal que nos permite observar el nivel de autofluorescencia de las células. La elipse marcada como TH selecciona una población de células altamente

autofluorescentes en el canal FL2, comparadas con el resto de células negativas para HNK-1. Cuando estas células se separan y se lleva a cabo una tinción de citometría intracelular para detectar la tirosina hidroxilasa (ver Materiales y Métodos), efectivamente el $90,6\pm 0,7\%$ de ellas resultan ser TH+ (Fig. 14A y B). Este método de la autofluorescencia permite por tanto separar células glómicas funcionales, negativas para HNK-1, con una pureza muy alta (Fig. 14A-E). De forma paralela se pueden separar también células muy positivas para HNK-1 (Fig. 14A-D), que corresponden aproximadamente en un 80% a las células con expresión baja de TH (Fig. 14A y B) descritas en apartados anteriores (TH/HNK). Y finalmente, podemos separar también en paralelo células completamente negativas y no autofluorescentes (elipse marcada como Neg en la Fig. 14A) como control.

Como comprobación de la identidad de las poblaciones separadas, la figura 14F muestra dos histogramas de frecuencia de los parámetros FSC (arriba) y SSC (abajo), obtenidos mediante el análisis de células incluidas en las elipses TH y Neg de la figura 14A. En estos histogramas, las células glómicas (en rojo) destacan por su mayor tamaño, quedando a la derecha en el *plot* de FSC, y por su mayor complejidad, quedando de nuevo a la derecha en el histograma de SSC, tal y como era esperable según sus características celulares expuestas más arriba. En el mismo panel F de la figura 14 pero a la derecha, se muestran los mismos histogramas pero normalizados, para facilitar la comparación entre ambas poblaciones. Finalmente, en la figura 14G se muestran los mismos histogramas normalizados para FSC y SSC, pero incluyendo la población TH/HNK (según la ventana de selección mostrada en la Fig. 14A). Analizando ambos parámetros físicos se puede observar que la población TH/HNK se encuentra en una situación intermedia, tanto en relación al tamaño como en relación a la complejidad, entre las células TH y la población negativa. Esto indicaría que la población TH/HNK tiene un tamaño algo menor que la población TH, y también menos granulosidad. Estos resultados, perfectamente en consonancia con los datos mostrados en apartados anteriores, parecen indicar una vez más que las células TH/HNK podrían constituir una población similar a la neuronal pero más inmadura, una especie de neuroblastos del CC. La figura 14H muestra una representación

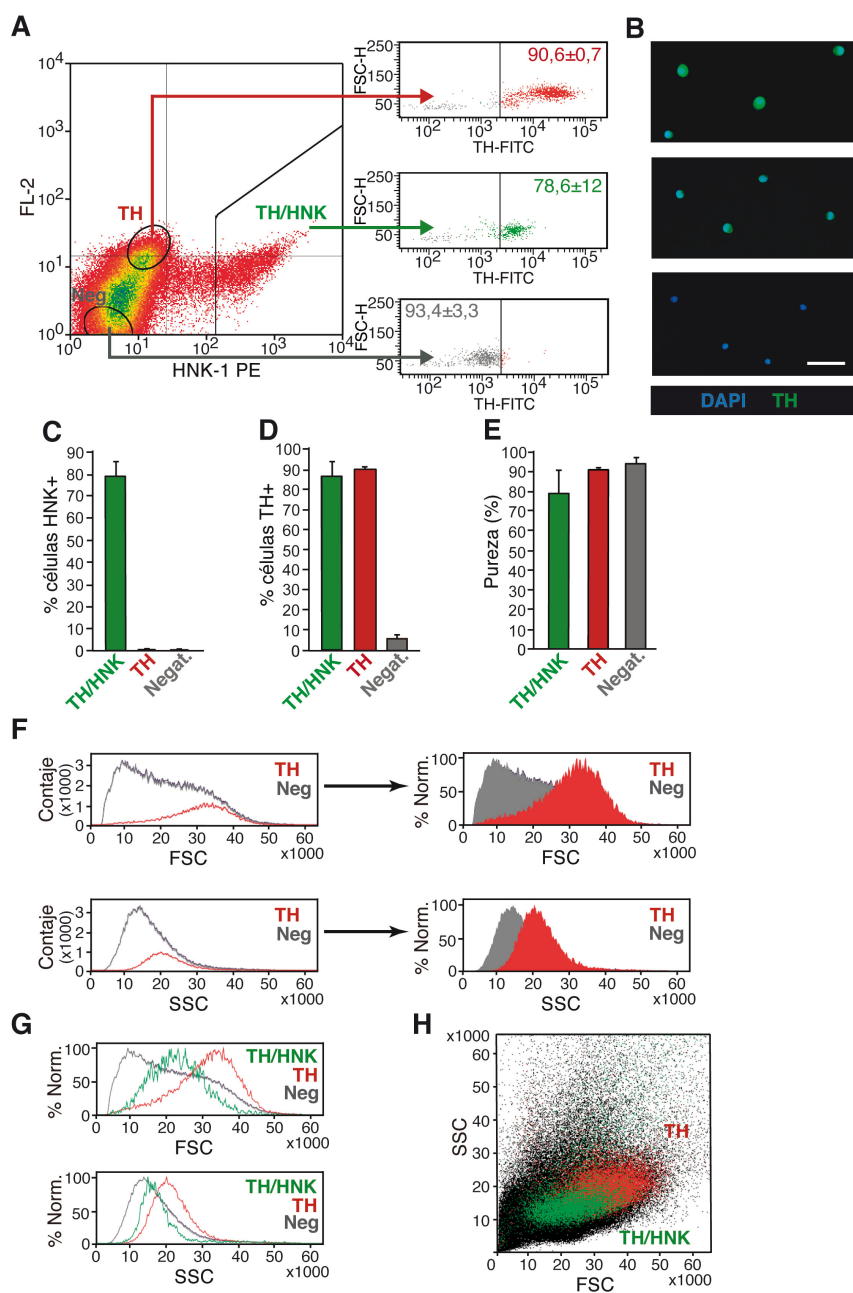


Figura 14. Metodología de aislamiento de las células glómicas del CC mediante FACS.

A) *Plot* de citometría de flujo donde se muestran las tres poblaciones de células vivas, aisladas para los estudios funcionales. Se trata de la población de células glómicas, separada por tamaño y autofluorescencia en FL2 e identificada como TH; la población de neuroblastos (TH/HNK), aislada gracias al marcaje con HNK-1 en PE; y la población negativa (Neg). A la derecha se muestran, una vez fijadas y teñidas intracelularmente con el anticuerpo anti-TH en FITC, el porcentaje de células que expresan el antígeno TH en cada una de las tres poblaciones. **B)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de las tres poblaciones separadas en (A), una vez teñidas con TH (verde). Escala: 25 μm . **C)** Representación gráfica del porcentaje de células positivas para el antígeno HNK-1 en las tres poblaciones en estudio. **D)** Representación gráfica del porcentaje de células positivas para TH en cada población separada. **E)** Representación gráfica de la pureza de cada una de las tres poblaciones aisladas por el método descrito. **F)** Histogramas de frecuencia de citometría de flujo que representan los valores de FSC (proporcional al tamaño) arriba, y el SSC (proporcional a la complejidad) abajo, de las poblaciones TH y Negativas. La población TH tiene mayor tamaño y mayor complejidad que la Negativa. A la derecha se muestran los mismos diagramas pero normalizados a 100, para poder realizar una comparación más visual. **G)** Diagramas normalizados de FSC y SSC que contienen las tres poblaciones en estudio. **H)** *Plot* bidimensional que representa SSC frente a FSC, en el que pueden distinguirse las diferencias entre la población TH y la TH/HNK.

bidimensional de los dos parámetros físicos (FSC vs. SSC), donde se aprecia más claramente la separación existente, en términos de tamaño y granulosidad, entre la población más madura (TH) y la inmadura (TH/HNK).

En resumen, este nuevo método experimental, de separación de células según su autofluorescencia combinado con el marcaje de HNK-1, nos ha permitido separar las células TH/HNK, de menor tamaño y complejidad, de las neuronas TH maduras del órgano, todo ello manteniendo la viabilidad celular *in vitro*. De esta forma hemos podido afrontar la caracterización funcional de ambas poblaciones celulares, como se expondrá en los siguientes apartados de Resultados.

2.3. Confirmación in vitro de la capacidad proliferativa de los neuroblastos TH/HNK del CC

Para confirmar la capacidad específica de proliferación de las células TH/HNK, se realizaron experimentos de microscopía de *time-lapse* en célula viva, tanto con células aisladas TH como con células TH/HNK, utilizando el método de aislamiento anteriormente expuesto. Además, las células se registraron tanto en condiciones de normoxia (PO₂ 21%) como de hipoxia suave (PO₂ 10%), durante 48 horas (ver condiciones en Materiales y Métodos). En la figura 15A se muestra un ejemplo de cada tipo celular en condiciones de hipoxia, donde se puede observar que no se produce ninguna división en la célula TH a lo largo de las 48h, mientras que la célula TH/HNK entra en división pasadas 22 horas desde el comienzo del experimento. Ambas poblaciones se sometieron a tinción por inmunocitoquímica con el marcador tirosina hidroxilasa al final del registro, para confirmar su naturaleza neuronal. La figura 15B muestra una cuantificación del porcentaje de células TH y TH/HNK que se dividieron tanto en normoxia como en hipoxia. En normoxia no se apreció prácticamente ninguna división en la población TH, y el número de divisiones en las células TH/HNK fue muy bajo (7,1%). Mientras que en hipoxia hubo un pequeño remanente (3,1%) de células TH que se dividieron (probablemente debido a impurezas en el método de separación), y casi la mitad de las células TH/HNK (el 46,1%) se dividieron al menos una vez.

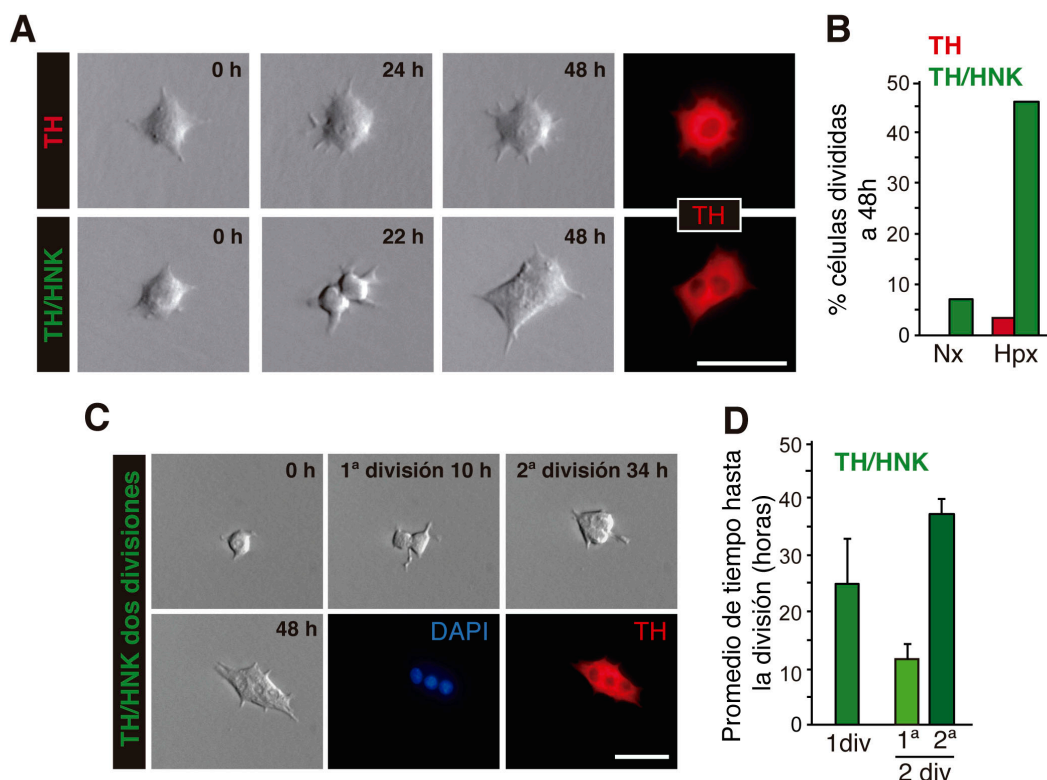


Figura 15. Estudios *in vitro* de la capacidad proliferativa de los neuroblastos del CC.

A) Secuencia de imágenes de microscopía *time-lapse* en las que se puede confirmar que las células TH/HNK tienen capacidad de proliferación en respuesta a hipoxia, llegando a dividirse casi la mitad de la población en tan sólo 48 horas de estímulo. **B)** Cuantificación del porcentaje de células glómicas (n= 96 células) y neuroblastos (n= 89 células) que se dividen en normoxia y en hipoxia. **C)** Secuencia de imágenes de microscopía *time-lapse* en las que se observa cómo una célula TH/HNK llega a dividirse dos veces dentro de las 48 horas de grabación. **D)** Representación gráfica de la duración media del ciclo celular de los neuroblastos que se dividen sólo una vez (a la izquierda), y de los que se dividen dos veces (a la derecha).

La mayoría de las células TH/HNK se dividieron una sola vez, pero se observó que un 23,5% de ellas lo hicieron una segunda vez dentro de las 48 horas del experimento y siempre en condiciones hipóxicas (Fig. 15C). En el caso de estas células que se dividen dos veces, la primera división ocurrió tras un promedio de 11,6 horas en cultivo, y la segunda división tuvo lugar tras unas 37,6 horas de media (Fig. 15D). La longitud del ciclo celular completo en estas células se sugiere por tanto que es de unas 24 horas. Este tiempo coincide también con lo que tardan en dividirse aquellas células que se dividen una sola vez (25,2 horas de media; Fig. 15D). Por tanto, el hecho de que algunas células, las que se dividen dos veces, tarden menos en dividirse en su primera división, podría indicar que en la primera división la célula es algo más inmadura, y por tanto su ciclo celular es más rápido que en la segunda división.

Otra posibilidad más simple es que estas células podrían ya haber iniciado su ciclo celular en el momento de comenzar el registro. En cualquier caso, no podemos descartar que dentro de la población TH/HNK exista una cierta heterogeneidad entre las células, siendo algunas, las que se dividen dos veces, posiblemente algo más inmaduras, con mayor capacidad de proliferación, y un ciclo celular más rápido.

2.4. Caracterización funcional de las células neuroblásticas TH/HNK en comparación con las células TH maduras

A raíz de las diferencias observadas, y expuestas en los apartados anteriores, entre las células TH/HNK y las TH, se decidió llevar a cabo una caracterización funcional más detallada de ambas poblaciones mediante técnicas electrofisiológicas y microfluorimétricas. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Patricia González Rodríguez, experta en este tipo de técnicas, y para ello se utilizaron células viables separadas por la técnica de FACS según el protocolo anteriormente expuesto (ver Materiales y Métodos).

Utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa, se estudiaron las corrientes iónicas dependientes de voltaje presentes en estas células y puestas de manifiesto mediante pulsos despolarizantes (Fig. 16A y C). Ambos tipos celulares demostraron tener canales de potasio (K^+) voltaje-dependientes en sus membranas, dando lugar a corrientes de salida con cinéticas muy parecidas (Fig. 16A). La representación de las curvas corriente/voltaje (I/V) para ambos tipos celulares reveló una mayor densidad de canales de K^+ en las células TH/HNK con respecto a las células TH (Fig. 16B). Al cambiar las soluciones de registro para poder estudiar las corrientes de entrada en respuesta a pulsos despolarizantes (Fig. 16C), se observaron corrientes de calcio (Ca^{2+}) correspondientes a una densidad similar de canales de Ca^{2+} en ambos tipos celulares (Fig. 16D). Sin embargo, de forma interesante, se observó que la mayoría de las células TH/HNK también mostraban corrientes rápidas de entrada de sodio (Na^+ ; Fig. 16C), una característica que se ha descrito como típica de inmadurez en otros sistemas

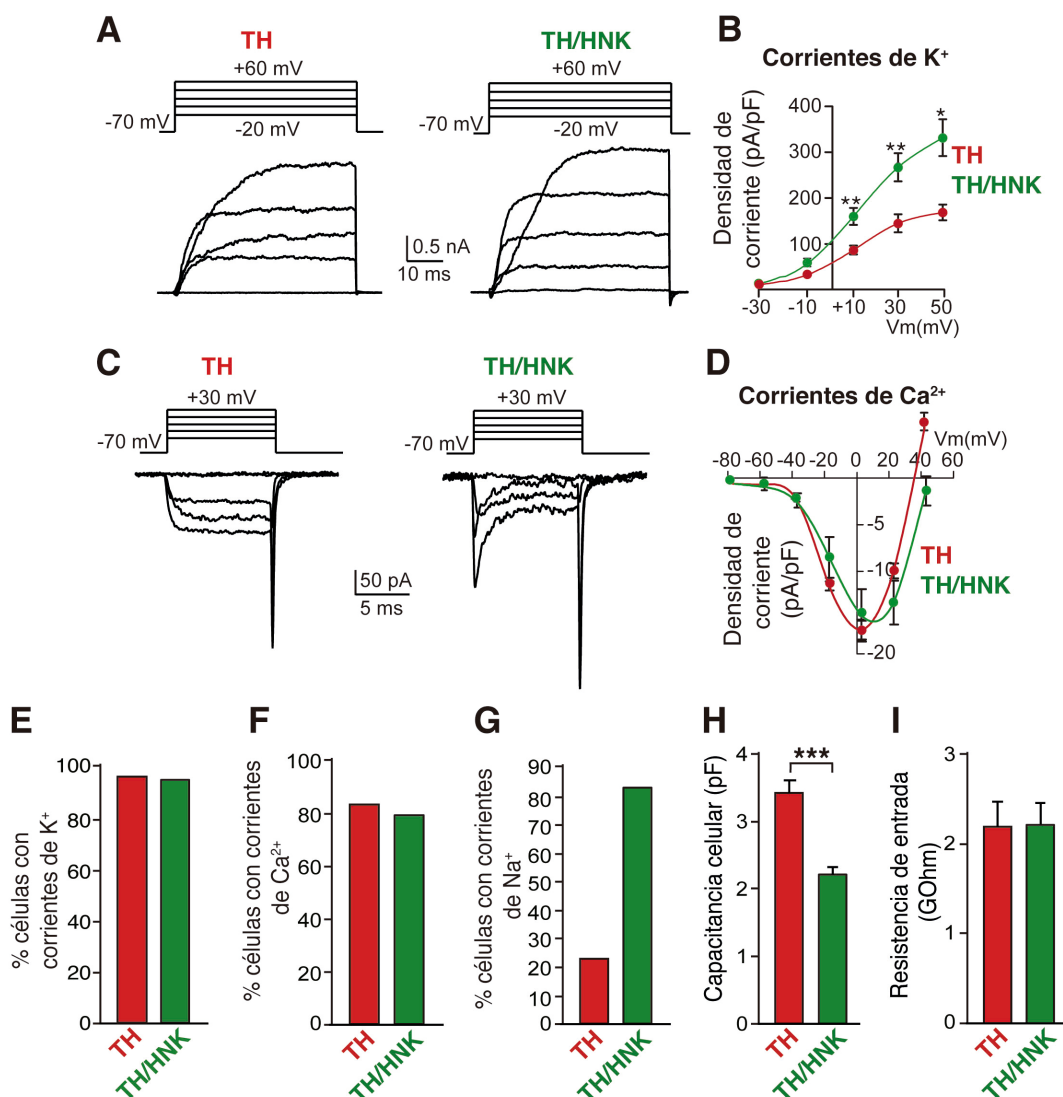


Figura 16. Estudio comparativo de las propiedades electrofisiológicas de neuroblastos y células glómicas maduras.

A) Estudio de las corrientes iónicas de salida en ambos tipos celulares en respuesta a pulsos despolarizantes, mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa. **B)** Representación gráfica de las densidades de corriente de K⁺ en células TH (n= 14 células) y TH/HNK (n= 13 células). **C)** Estudio de las corrientes iónicas de entrada dependientes de voltaje en respuesta a pulsos despolarizantes, mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa, en células TH (n= 18 células) y TH/HNK (n= 21 células). Obsérvese la presencia de corrientes de calcio en ambos tipos celulares, y de corrientes de sodio únicamente en los neuroblastos. **D)** Representación gráfica de la densidad de corrientes de Ca²⁺. **E), F)** y **G)** Porcentajes de células registradas que contenían corrientes de K⁺ (**E**), Ca²⁺ (**F**) y Na⁺ (**G**), en ambos tipos celulares. **H)** e **I)** Medida de la capacitancia celular y de la resistencia de entrada mediante *patch-clamp* en células glómicas (n=29 células) y en neuroblastos (n= 30 células). *p< 0,05, **p< 0,01 y ***p<0,001.

(Belluzzi et al., 2003). Mientras las corrientes de K⁺ y Ca²⁺ están presentes en la mayoría de células registradas de ambos tipos celulares (Fig. 16E y F), las corrientes de entrada de Na⁺ se observaron preferentemente en las células

TH/HNK, y en tan sólo un 25% de las células TH (Fig. 16G). Estos resultados indican que ambos tipos celulares son muy parecidos en cuanto a presencia de canales iónicos, mostrando los neuroblastos TH/HNK un fenotipo que podríamos llamar pre-diferenciado. La medida de la capacitancia celular, que es directamente proporcional al tamaño de las células (Fig. 16H), corrobora el menor tamaño de las células TH/HNK mostrado en apartados anteriores. Por último, la similitud encontrada entre las resistencias de entrada (Fig. 16I) da idea de nuevo de la enorme semejanza funcional a nivel electrofisiológico que existe entre ambos tipos celulares.

A continuación se decidió estudiar la liberación de vesículas por parte de ambos tipos celulares en respuesta a distintos estímulos, utilizando para ello la técnica de registro amperométrico (Ureña et al., 1994). A pesar de las similitudes que mostraron ambos tipos celulares en relación a las corrientes iónicas, los registros amperométricos revelaron las primeras diferencias funcionales entre ambas poblaciones (Fig. 17A). En respuesta a una despolarización directa por alto K^+ externo, las células maduras TH mostraron una mayor actividad secretora que las TH/HNK inmaduras, tanto en el número de eventos secretores como en la carga media de catecolaminas presentes en esas vesículas (Fig. 17C). Además, algo más del 60% de las células TH/HNK registradas ni siquiera respondieron al estímulo despolarizante (Fig. 17B). Todo ello indica que aunque los neuroblastos ya tienen canales de Ca^{2+} funcionales que permiten la liberación de vesículas en respuesta a estímulos despolarizantes, su capacidad secretora es mucho menor que la de las neuronas maduras. Esta conclusión está en consonancia con los resultados de microscopía electrónica que mostraron que las células TH/HNK contienen un menor número de vesículas y de menor tamaño que las TH.

Se midió también en ambos tipos celulares el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a distintos estímulos mediante la técnica de FURA (ver Materiales y Métodos) (Fig. 17D). Se observó que ambos tipos celulares tenían una respuesta similar a alto potasio, e incluso a hipoglucemia (Fig. 17G y H), un estímulo fisiológico que también se ha descrito que activa la exocitosis de las células glómicas (Pardal and López-Barneo, 2002). Sin embargo, la

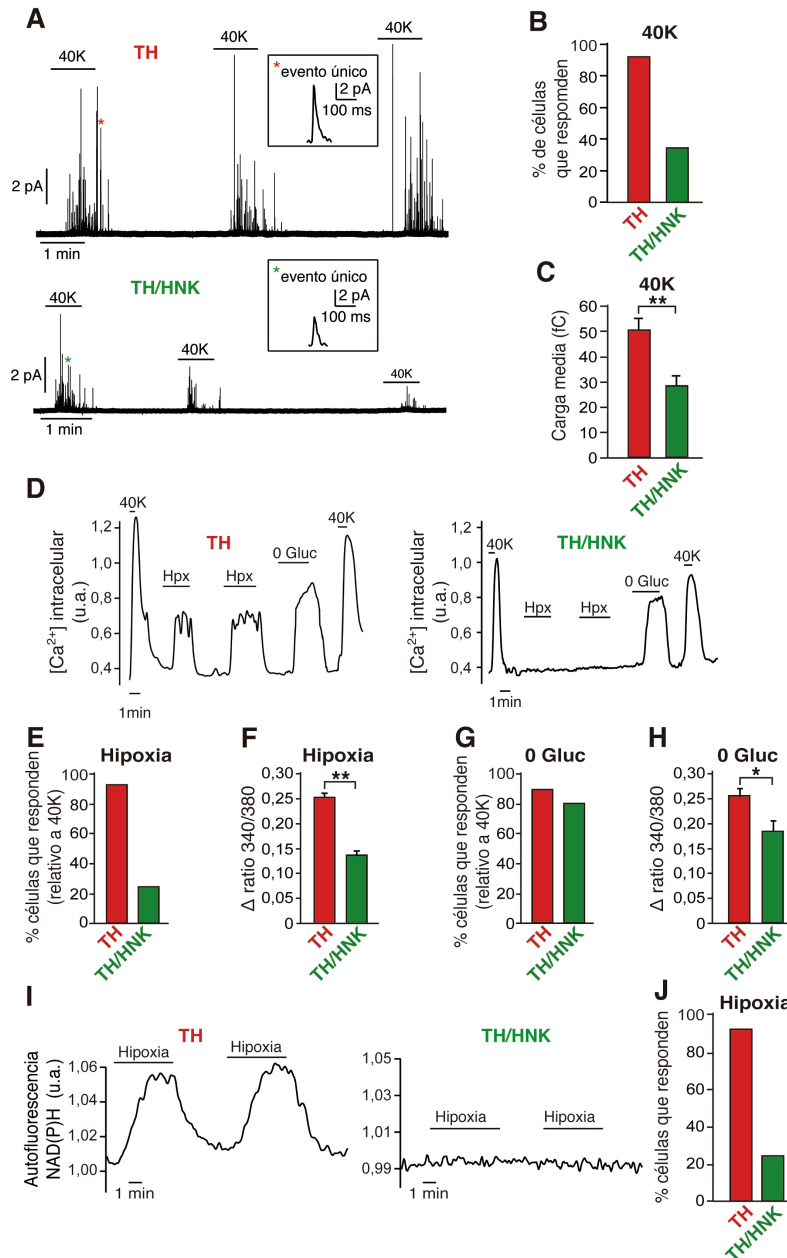


Figura 17. Caracterización electrofisiológica funcional de los neuroblastos del CC en comparación a las células glómicas.

A) Medidas amperométricas de la capacidad secretora de una célula glómica madura (arriba), y de un neuroblasto inmaduro (abajo), en respuesta a despolarización por alta concentración externa de potasio (40K). La espiga marcada con el asterisco se muestra ampliada en el recuadro. **B)** Porcentaje de células que respondieron al estímulo despolarizante de alto K⁺ durante las medidas de amperometría (n= 25 células de cada tipo). **C)** Cuantificación de la carga media de los eventos exocitóticos registrados en células TH (n= 6 células) y en células TH/HNK (n= 6 células). **D)** Medidas del incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular, mediante el indicador FURA-2, en células TH (izquierda) y células TH/HNK (derecha), en respuesta a distintos estímulos (alto potasio, hipoxia aguda y 0 glucosa). **E)** Porcentaje de células que respondieron a hipoxia en las medidas de Ca²⁺ intracelular. **F)** Magnitud de la respuesta al estímulo hipóxico agudo en ambos tipos celulares (n=57 células TH y 79 células TH/HNK). **G)** y **H)** Porcentaje de células que respondieron (G), y magnitud de la respuesta (H), al estímulo de 0 glucosa, en células TH y TH/HNK (n= 47 células TH y 61 células TH/HNK). **I)** Ejemplos de medidas de autofluorescencia de NAD(P)H generado en la mitocondria en respuesta a hipoxia aguda, en células TH (n=117 células) y en células TH/HNK (n=193 células). **J)** Porcentaje de células TH y TH/HNK que respondieron a hipoxia en las medidas de la autofluorescencia del NAD(P)H. *p< 0,05 y **p< 0,01.

mayoría de las células inmaduras registradas no respondieron a hipoxia (Fig. 17D y E), y las que sí lo hicieron tuvieron una respuesta mucho menor (Fig. 17F). En base a estos resultados, que indicaban una inmadurez particularmente acusada en la sensibilidad de estas células al estímulo hipóxico, se decidió estudiar su capacidad para acumular NAD(P)H en la mitocondria en respuesta a hipoxia, un proceso recientemente descrito como importante en la respuesta quimiosensora de las células glómicas (Fernández-Agüera et al., 2015). En la figura 17I se puede apreciar cómo aumentan los niveles de autofluorescencia de las células glómicas TH maduras en respuesta a hipoxia debido a la acumulación de NAD(P)H autofluorescente. Por el contrario, prácticamente el 80% de los neuroblastos (TH/HNK) analizados no mostraron el más mínimo cambio en los niveles de autofluorescencia en respuesta a hipoxia (Fig. 17I y J). Estos resultados muestran claramente que el sistema sensor de oxígeno, que convierte a la célula glómica madura y funcional en la principal célula quimiorreceptora periférica del organismo, no se encuentra aún activo en las células inmaduras TH/HNK, a pesar de mostrar estas células un fenotipo pre-diferenciado con presencia de canales iónicos y capacidad de respuesta a otros estímulos fisiológicos.

3. Mecanismo molecular de activación proliferativa en los neuroblastos TH/HNK del CC

En apartados anteriores se ha descrito que los neuroblastos del CC entran de manera rápida en estadio proliferativo en respuesta a hipoxia crónica. Aunque los datos de microscopía *time-lapse* sugieren que estas células son intrínsecamente sensibles a la hipoxia crónica, los datos de electrofisiología confirman la inmadurez de las respuestas a hipoxia aguda de estas células. Por tanto, se decidió averiguar si podrían existir otros factores, probablemente liberados por las células glómicas maduras, que comunicaran la situación de hipoxia a los neuroblastos, en lo que constituiría un nuevo ejemplo de regulación de la proliferación del órgano por parte de la actividad neuronal (Pardal and López-Barneo, 2016; Platero-Luengo et al., 2014). Para responder

a esta pregunta, se sometieron animales a una dosis continuada de Cadmio en el agua de bebida (ver Materiales y Métodos), durante todo el tiempo que duró el estímulo hipóxico (3 días). El cadmio es un bloqueante de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, por lo que se trata de un potente inhibidor de la secreción de vesículas en las células glómicas. Como resultado se obtuvo una clara disminución de la proliferación de células TH+/Ki67+ (consideradas neuroblastos por ser las únicas células TH+ que se dividen) desde un $47,3\pm 4,4\%$ hasta un $28,7\pm 1,8\%$ (Fig. 18A y B). Esta disminución en la proliferación de los neuroblastos de casi un 50% sugiere que su activación se produce, al menos parcialmente, gracias a moléculas de señalización que se encuentran en las vesículas de las neuronas maduras. Para intentar identificar alguna de estas moléculas, se realizó un sencillo experimento de proliferación *in vitro* con varias de las sustancias descritas en la literatura como liberadas por las células glómicas (Bisgard, 2000; Nurse, 2014; Nurse and Piskuric, 2013) (Fig. 18C). De entre ellas, la que produjo una mayor respuesta de activación proliferativa de las células TH/HNK fue el ATP, uno de los neurotransmisores más abundantes descrito en las células glómicas, y el principal en relación al funcionamiento de la sinapsis quimiosensora del órgano (Piskuric and Nurse, 2013). En la figura 18D y E se puede apreciar el aumento significativo en proliferación de neuroblastos, que produce la adición de $100\mu\text{M}$ ATP al medio de cultivo, tras sólo 24-48 horas. Se probaron igualmente el UTP, como agonista del ATP pero de acción más potente, y la Acetilcolina, como compuesto sinérgico del ATP en las vesículas sinápticas, sin obtenerse resultados claros con ninguna de ambas sustancias (Fig. 18F). La inclusión en el cultivo de antagonistas de ATP como la Suramina (antagonista generalista) o el PPADS (antagonista más específico de los receptores P2Y) produjo una bajada relativa en los niveles de proliferación de los neuroblastos cultivados con ATP, principalmente en el caso de la Suramina (Fig 18G), pero con resultados no significativos. Este efecto no se observó en los neuroblastos activados directamente por la hipoxia, es decir, los inhibidores no tuvieron efecto alguno sobre la proliferación inducida por hipoxia. Estos resultados indicarían que el mecanismo de activación proliferativa mediado por ATP

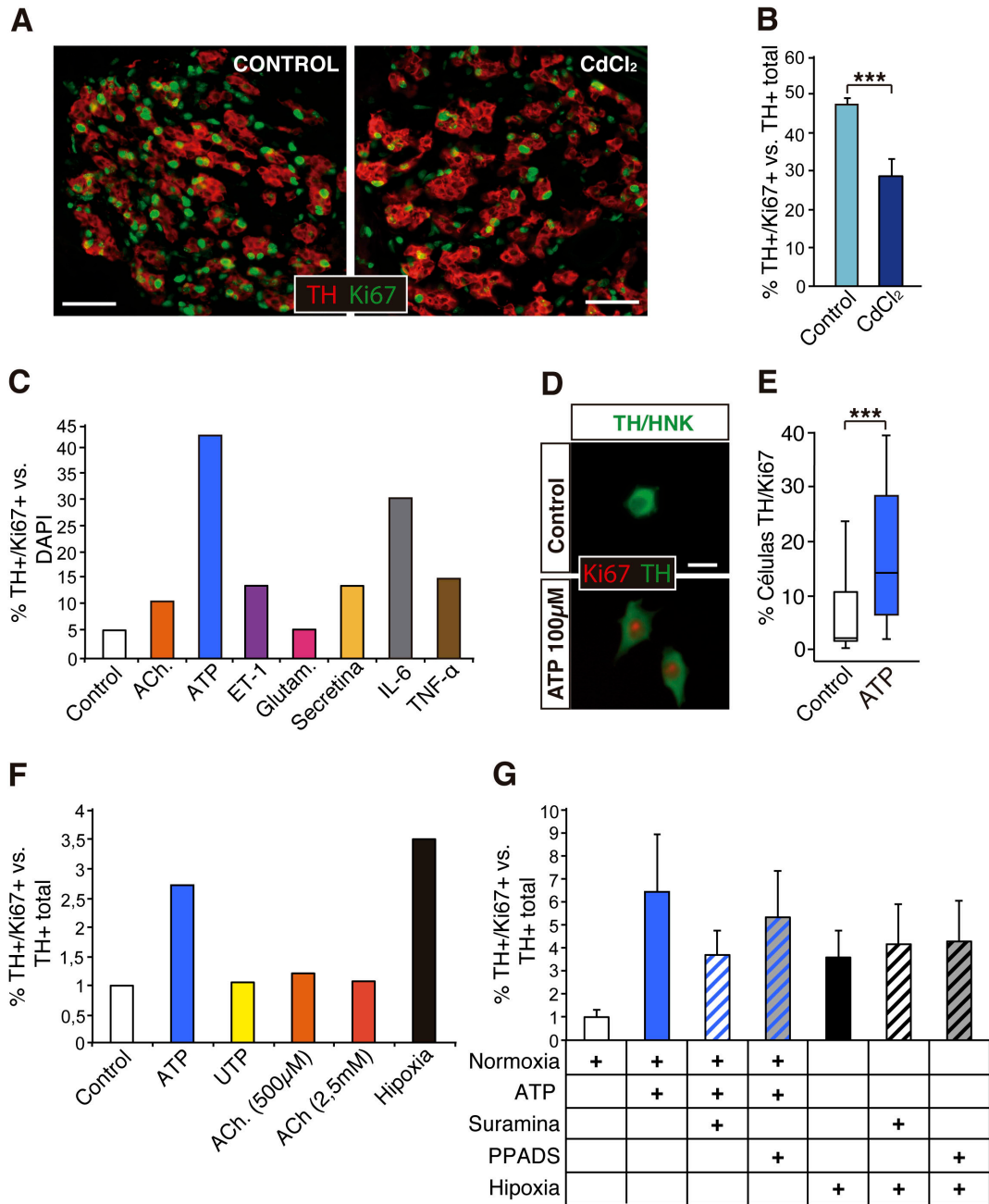


Figura 18. Mecanismo molecular de inducción de la proliferación en los neuroblastos del CC.

A) Imagen de inmunofluorescencia del CC de animales tratados con CdCl₂ y control, y sometidos a hipoxia durante tres días. Puede apreciarse la disminución de la proliferación en los animales tratados con CdCl₂, donde la exocitosis de las células glómicas está inhibida. **B)** Representación gráfica de la cuantificación de células TH+ proliferativas en los experimentos descritos en (A) (n= 4 CC por grupo). **C)** Ensayo de proliferación *in vitro* de células TH/HNK tras 24 horas de exposición a distintos compuestos, presentes todos ellos en las vesículas de las células glómicas del CC. **D)** Experimento de proliferación *in vitro* en respuesta a ATP 100 µM. Los neuroblastos activados con ATP entran en proliferación expresando el marcador de ciclo celular Ki67. **E)** Cuantificación de los experimentos de proliferación *in vitro* con ATP, donde se muestra un aumento del nivel medio de proliferación en presencia del factor. **F)** y **G)** Representaciones gráficas de los resultados de los experimentos de proliferación *in vitro* realizados con compuestos agonistas (UTP), sinérgicos (ACh), y antagonistas (PPADS y Suramina) del ATP, en células neuroblásticas TH/HNK. En estos gráficos aparecen tendencias, pero no se aprecian variaciones estadísticamente significativas en respuesta a los compuestos estudiados (n=3-4 experimentos por cada compuesto). ***p<0,001.

podría estar ocurriendo en paralelo y de forma independiente al de la hipoxia *per se*.

3.1. Efecto de los neurotransmisores purinérgicos sobre la respuesta funcional electrofisiológica de los neuroblastos

Para una mejor caracterización del papel del ATP sobre los neuroblastos del CC, se quiso comprobar su efecto funcional sobre la electrofisiología de estas células. Para ello se estudió el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a ATP, a su agonista UTP, y a la acetilcolina. Se pudo comprobar que en las células glómicas maduras ninguna de las moléculas purinérgicas tuvo efecto alguno (Fig. 19A), pero sí la acetilcolina (ACh). Sin embargo, en los blastos TH/HNK, el neurotransmisor UTP produjo una potente respuesta de incremento de Ca^{2+} (Fig. 19B), que además fue abolida de forma reversible por el inhibidor PPADS (Fig. 19C). En la cuantificación de la figura 19D se puede apreciar claramente el efecto del UTP, un activador más potente y específico que el propio ATP, de los receptores purinérgicos de tipo P2Y, y cuyo efecto se suprime con PPADS, un antagonista muy específico de los mismos receptores. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio mediante PCR (Fig. 19E) que puso de manifiesto la expresión de receptores purinérgicos tanto de tipo P2X (P2X2 y P2X3) como de tipo P2Y (P2Y12) en los neuroblastos del CC. Los receptores P2X2/3 se han implicado clásicamente en la respuesta quimiosensora del CC (Prasad et al., 2001). Mediante la técnica de inmunohistoquímica en rodajas de CC efectivamente se confirmó la expresión de estos receptores P2X2 en los neuroblastos del CC (Fig. 19F). Harán falta nuevos experimentos para descifrar de manera más exacta los receptores y las cascadas de señalización que se ponen en marcha para activar la proliferación en los neuroblastos TH/HNK en respuesta a la comunicación purinérgica desde las células TH maduras.

3.2. Maduración *in vitro* de los neuroblastos del CC mediada por señalización purinérgica

La exposición de animales a hipoxia ha mostrado que en tan sólo 48 horas de estímulo se activa la proliferación de los blastos del CC, y además se

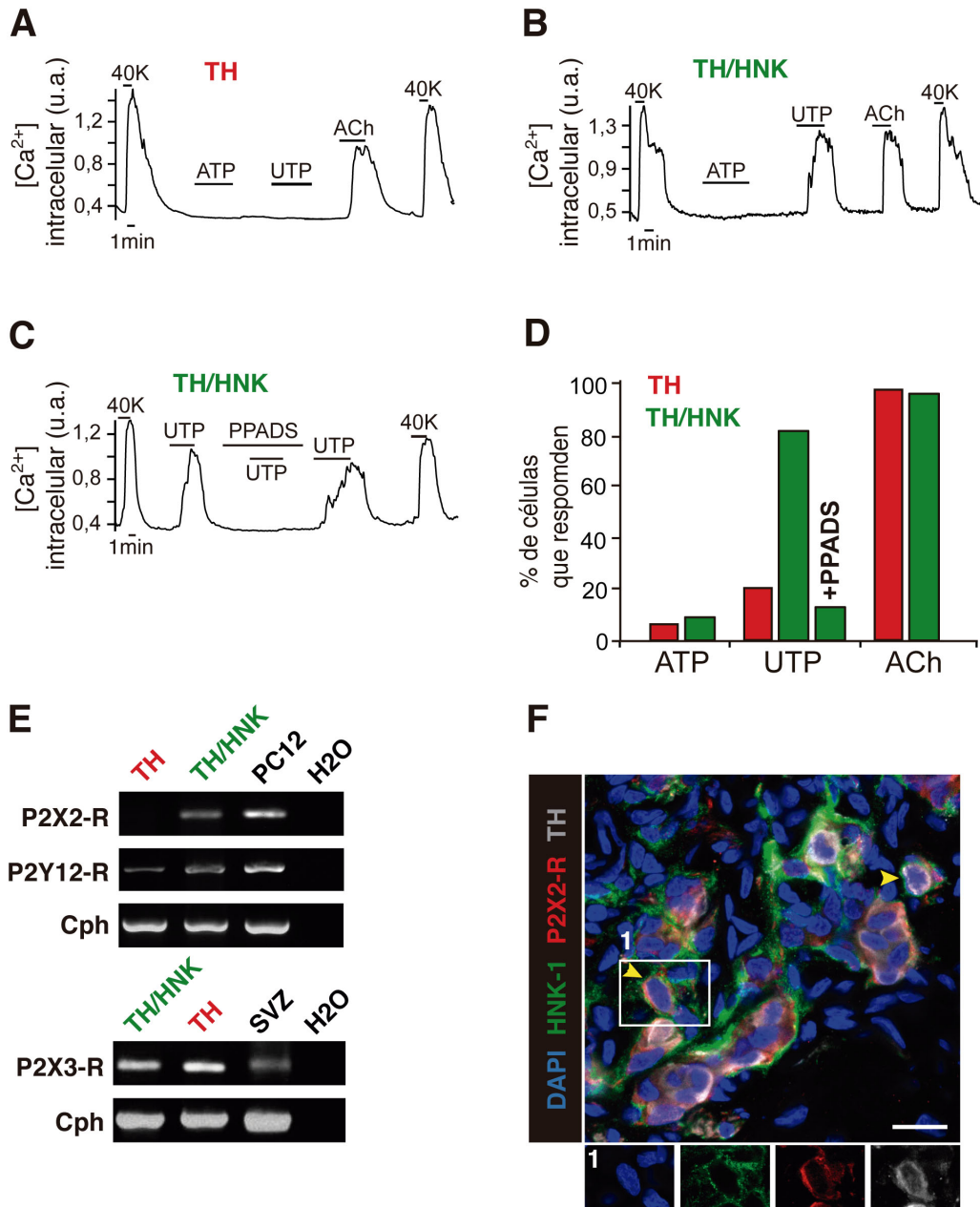


Figura 19. Estudio de la respuesta funcional a la señalización purinérgica en células maduras e inmaduras del CC.

A) Registro de los niveles de Ca^{2+} intracelular en una célula glómica madura, en el que se muestra la ausencia de respuesta a ATP y UTP, y la respuesta positiva a la acetilcolina. **B)** Registro de los niveles de Ca^{2+} intracelular en un neuroblasto del CC, donde se muestra ausencia de respuesta a ATP, pero presencia de una clara respuesta a UTP y a acetilcolina. **C)** Registro de Ca^{2+} intracelular en un neuroblasto del CC, donde se muestra la respuesta de incremento de Ca^{2+} provocada por UTP, y cómo esta respuesta es abolida por PPADS, un inhibidor de los receptores purinérgicos. **D)** Cuantificación del porcentaje de células que responden a ATP, UTP y ACh en ambos tipos celulares ($n = 67-106$ células), y a PPADS en neuroblastos que responden a UTP ($n = 13$ células). **E)** RT-PCR para detección de la expresión de receptores purinérgicos en células TH y TH/HNK de CC separadas por FACS. **F)** Inmunohistoquímica de fluorescencia para mostrar colocalización del receptor P2X2-R (rojo) en células HNK-1 positivas (en verde), y positivas también para TH (gris), lo que indica que los neuroblastos del CC expresan este receptor de membrana, detectado anteriormente por PCR.

produce cierta maduración, observable por un aumento de los niveles de expresión de TH, y una disminución de los niveles de HNK-1 (ver Fig. 11E). Además, en los ensayos *in vitro* de microscopía *time-lapse* también se observaron resultados parecidos, de aumento de la expresión de TH, utilizando células aisladas puestas en cultivo y sometidas a hipoxia moderada (10% de PO₂) (ver Fig. 15). A la luz de estos resultados, quisimos comprobar si un estímulo continuado de 24-48 horas *in vitro* de exposición a los neurotransmisores que activan la proliferación y la respuesta funcional (ver Figs. 18 y 19), podría también tener un efecto sobre la maduración de los neuroblastos. El grado de maduración funcional de las células se ha puesto de manifiesto anteriormente por la capacidad de responder a hipoxia, y más específicamente por la capacidad de acumular NAD(P)H mitocondrial en respuesta a esa hipoxia (Fig. 17I). La figura 20 muestra los resultados del experimento de maduración tras exposición corta a distintos factores. Los paneles A y B muestran la situación control, en la que las células glómicas (Fig. 20A) y los blastos (Fig. 20B) han estado en cultivo durante 24-48 horas en condiciones de normoxia. En la figura 20C se muestra el registro de una célula TH/HNK tras haber sido mantenida al 3% de PO₂ durante 24-48 horas, denotando una capacidad de respuesta equivalente a la de las células maduras. Los paneles D, E y F de la figura 20 muestran los resultados obtenidos tras el cultivo de neuroblastos con ATP, UTP o acetilcolina respectivamente. Los tres compuestos tuvieron un efecto positivo sobre la adquisición de capacidad para responder a hipoxia de las células TH/HNK, aunque en ningún caso se llega al nivel de las células maduras. Posiblemente se requieran más de 24-48 horas para completar el efecto de maduración de estos compuestos sobre los neuroblastos.

Hemos puesto en marcha experimentos *in vivo* inyectando el antagonista generalista de los receptores purinérgicos, la suramina, en animales hipóxicos, o el agonista 2-Me SATP en animales normóxicos, sin que por ahora estos experimentos hayan mostrado efectos concluyentes sobre la proliferación de las células TH⁺ en el CC *in vivo*. Aún así no podemos descartar la existencia de problemas técnicos que nos hayan impedido ver un

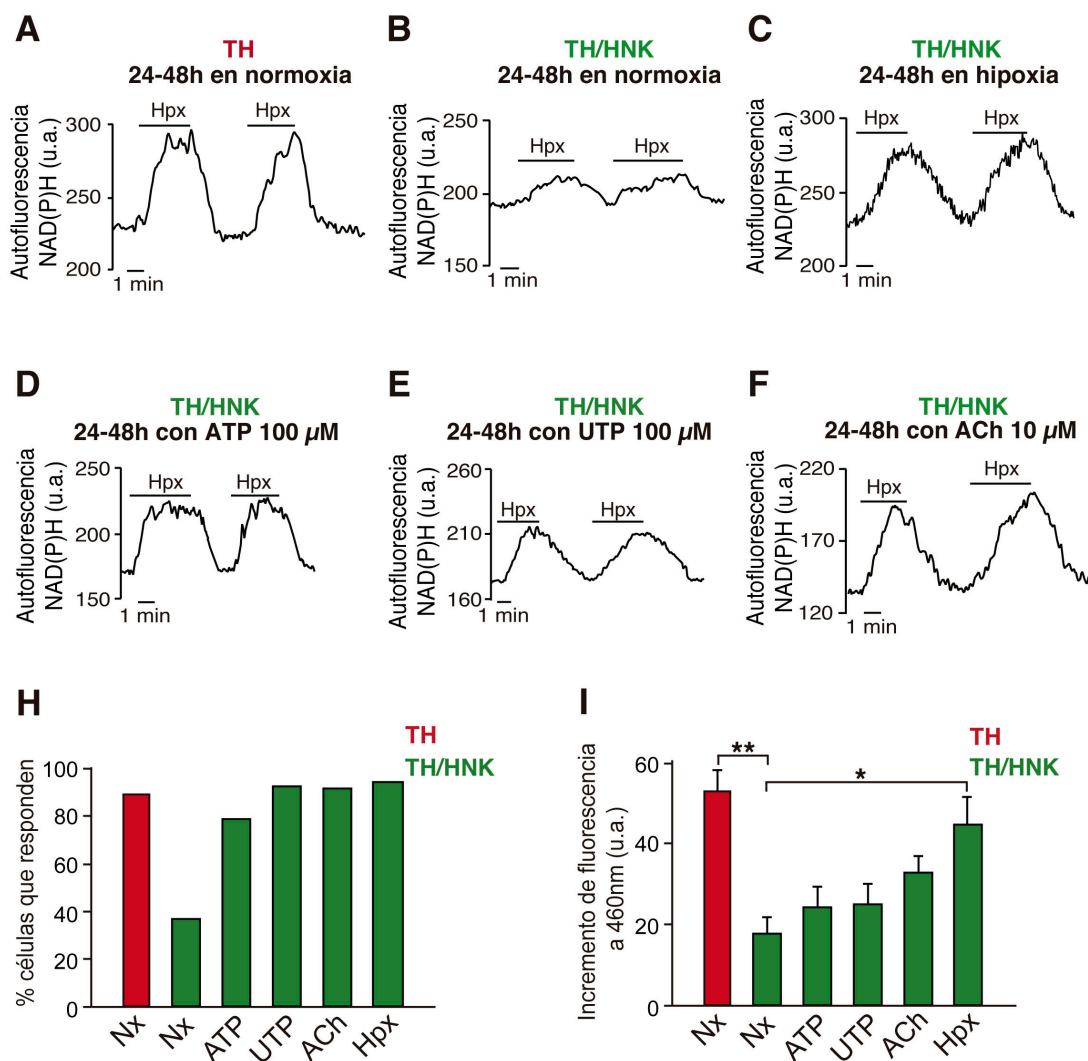


Figura 20. Maduración funcional de los neuroblastos en respuesta a compuestos purinérgicos y colinérgicos.

A) Incremento de la autofluorescencia del NAD(P)H en una célula glómica madura funcional en respuesta a hipoxia aguda, tras 24-48 horas de cultivo *in vitro* en condiciones normóxicas. **B)** Respuesta de incremento de autofluorescencia del NAD(P)H en un neuroblasto en respuesta a hipoxia aguda, tras 24-48 horas de cultivo *in vitro* en condiciones normóxicas. Se muestra un ejemplo en el que hay algo de respuesta, aunque los neuroblastos que responden son menos del 40% del total registrados. **C)** Ejemplo de respuesta a hipoxia aguda, utilizando la misma técnica de registro, de un neuroblasto que ha estado 24-48 horas en cultivo en condiciones de hipoxia. La respuesta es equivalente a la observada en una célula glómica madura (A). El resultado sugiere que la hipoxia por sí sola ha inducido la maduración terminal de estas células. **D-F)** Incremento de autofluorescencia de NAD(P)H en respuesta a hipoxia aguda tras la incubación de los neuroblastos 24-48 horas con ATP (D), con UTP (E), y con acetilcolina (ACh; F). Se produce cierta maduración funcional en todos los casos, sin llegar a los niveles inducidos por la hipoxia, ni a los niveles de las células glómicas maduras. **H)** Gráfico que muestra el porcentaje de células que responden a hipoxia aguda tras los distintos tratamientos *in vitro*. **I)** Cuantificación de la magnitud de la respuesta en las condiciones mostradas (n=11-33 células por grupo). Test ANOVA *one-way*, *p<0,05, **p<0,01.

efecto, y hará falta más experimentación para sacar conclusiones al respecto. Se han probado igualmente otras sustancias en experimentos *in vivo*, como un

agonista (Apomorfina) y un antagonista (Haloperidol) de receptores de Dopamina, principal catecolamina contenida en las vesículas del CC, o el bosentán, un antagonista de los receptores de Endotelina-1, que se ha descrito previamente en nuestro grupo como bloqueante de la proliferación de las células madre del órgano (Platero-Luengo et al., 2014). En ningún caso de nuevo se observó un efecto claro sobre la proliferación de los neuroblastos del CC (Fig. 21).

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que aunque existen indicios claros de la importancia de la señalización purinérgica y colinérgica para la proliferación y maduración de los neuroblastos del CC, no podemos concluir ningún mecanismo de acción concreto, ni podemos descartar que estas moléculas actúen como efectores secundarios, o simples mediadores de un mecanismo de señalización más amplio. En conclusión, hace falta profundizar en la experimentación para esclarecer el mecanismo molecular concreto por el que se activan las células neuronales inmaduras del CC. El conocimiento detallado de este mecanismo permitiría el control farmacológico del proceso y podría suponer avances terapéuticos en el tratamiento de enfermedades asociadas como la hipertensión o la apnea del sueño.

4. Caracterización del resto de población positiva para HNK-1 en el CC

Para realizar una mejor caracterización de la población total de células que expresan el antígeno HNK-1, y no sólo de las células TH/HNK, se realizaron estudios de expresión de GFAP y Nestina en la población HNK-1 positiva. Las células madre del CC expresan la proteína GFAP, mientras que los progenitores intermedios expresan Nestina como marcador principal (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014). En un primer ensayo se quiso ver la expresión y colocalización de Nestina y HNK-1 por microscopía confocal. La figura 22A muestra unas imágenes donde podemos observar células doble positivas para ambos marcadores, indicadas con puntas de flecha amarillas, otras positivas sólo para Nestina (puntas de flecha blancas), y otras sólo

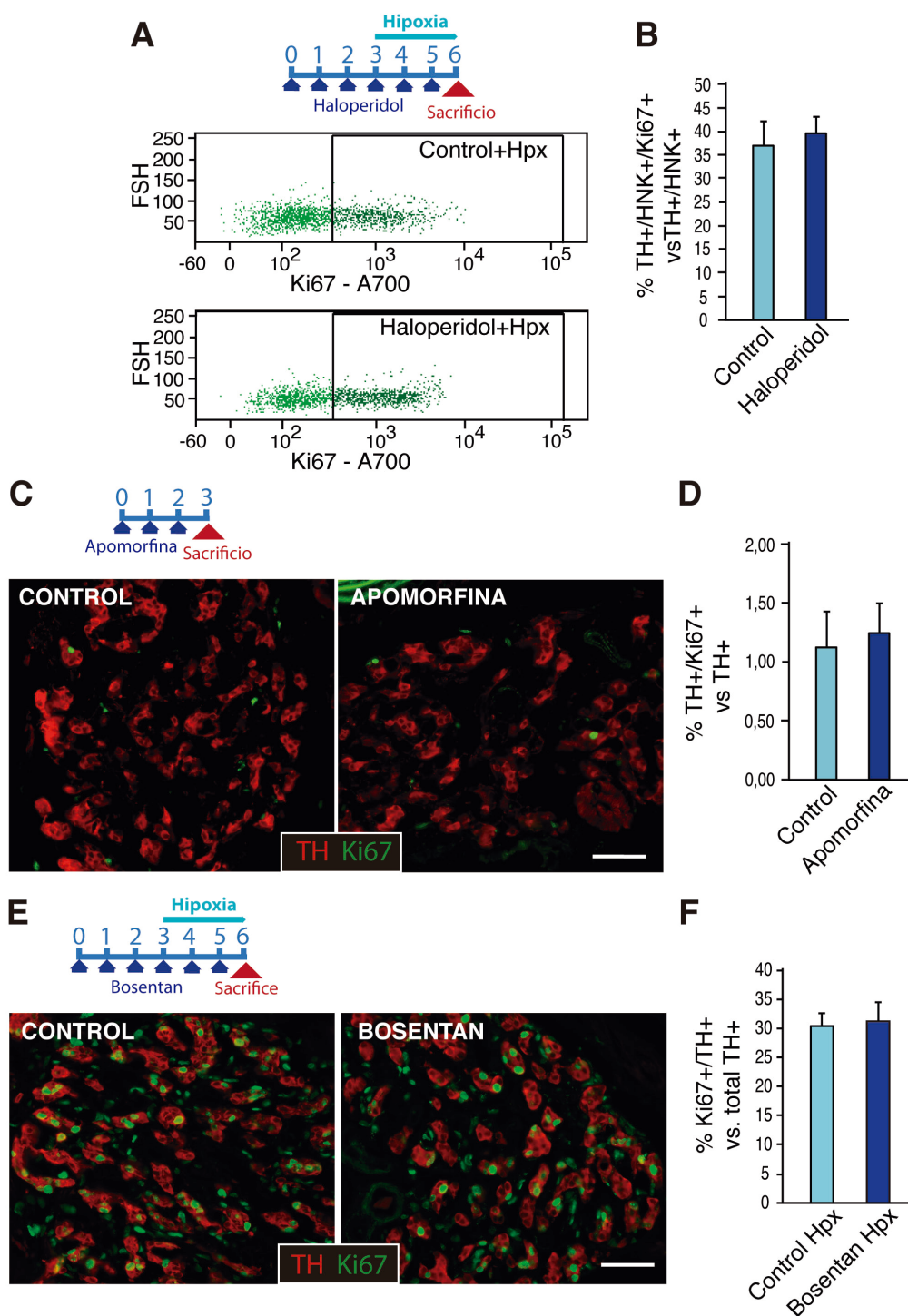


Figura 21. Estudio de la proliferación *in vivo* de los neuroblastos del CC en respuesta a distintos factores.

A) y **B)** Experimento de inyección del antagonista de los receptores de dopamina Haloperidol en ratas hipóxicas. El gráfico en **(B)** muestra la falta de efecto del Haloperidol *in vivo* sobre la proliferación de los blastos. **C)** y **D)** Estudio de proliferación en el CC de animales inyectados sistémicamente con el agonista de la dopamina, Apomorfina, en ratas normóxicas. De nuevo se observa una falta de efecto de estos compuestos sobre la proliferación de los blastos. Estos resultados sugieren que la dopamina no estaría actuando como sustancia mediadora en la activación de la proliferación de los blastos. Escala: 50 μ m. **E)** y **F)** Experimento *in vivo* con Bosentan, bloqueante de los receptores de la Endotelina-1, la citoquina descrita como principal activador de las células madre del nicho del CC (Platero-Luengo et al., 2014). De nuevo los resultados muestran una falta total de efecto de este inhibidor. Escala: 50 μ m.

positivas para HNK-1 (punta de flecha celeste). En la figura 22B se muestra el estudio de estas poblaciones por citometría de flujo, combinándolas también con el marcador TH, para determinar qué células HNK-1 positivas son las que expresan Nestina. En el *plot* de la izquierda se puede ver una situación basal en normoxia, con las células TH maduras en rojo y el total de células HNK-1 positivas en verde, mientras que en el *plot* central se ha ocultado el color verde para mostrar (en el mismo *plot* de normoxia) qué células HNK-1 expresan también Nestina (en color celeste). Esta estrategia nos permite comprobar que muchos de los blastos (muy positivos para HNK-1), que expresan niveles bajos del marcador TH, son positivos también para Nestina, por lo que co-expresan los tres marcadores aunque a distintos niveles de intensidad. En el mismo *plot* central también se puede distinguir una población que expresa niveles bajos de HNK-1 (HNK *low*), y no expresa el marcador TH pero sí la Nestina, por lo que podría tratarse de una población aún más inmadura que las TH/HNK, es decir, de progenitores intermedios. En el *plot* de la derecha se han seleccionado exclusivamente las células Nestina+ (en azul y celeste). Del total de células HNK-1+ (no mostradas en este *plot*), aproximadamente el 70% son Nestina+ (color celeste en el *plot*), de las cuales la mitad son TH/HNK/Nestina+ y la otra mitad HNK *low*/Nestina+. Con respecto al total de neuroblastos HNK-1 muy positivos (células TH/HNK utilizadas en la caracterización funcional), aproximadamente el 60% de ellos muestran expresión de Nestina y por tanto un carácter supuestamente más inmaduro. Estos resultados nos permiten concluir que existen tres subpoblaciones dentro de las células que expresan HNK-1 en el CC, un tercio expresarían HNK-1 y Nestina, y presumimos que corresponderían a los progenitores intermedios, otro tercio coexpresarían TH, HNK-1 y Nestina, y serían los neuroblastos algo más inmaduros, y la tercera población serían las células HNK-1/TH dobles positivas pero negativas para Nestina, que serían neuroblastos prediferenciados, que aún no han perdido el marcador HNK-1 pero que estarían más cercanos a convertirse en células glómicas maduras.

También decidimos estudiar la coexpresión de HNK-1 con el marcador de célula madre del CC, el GFAP, pero no se encontró ninguna colocalización por inmunohistoquímica en microscopía confocal (Fig. 22C). De este resultado

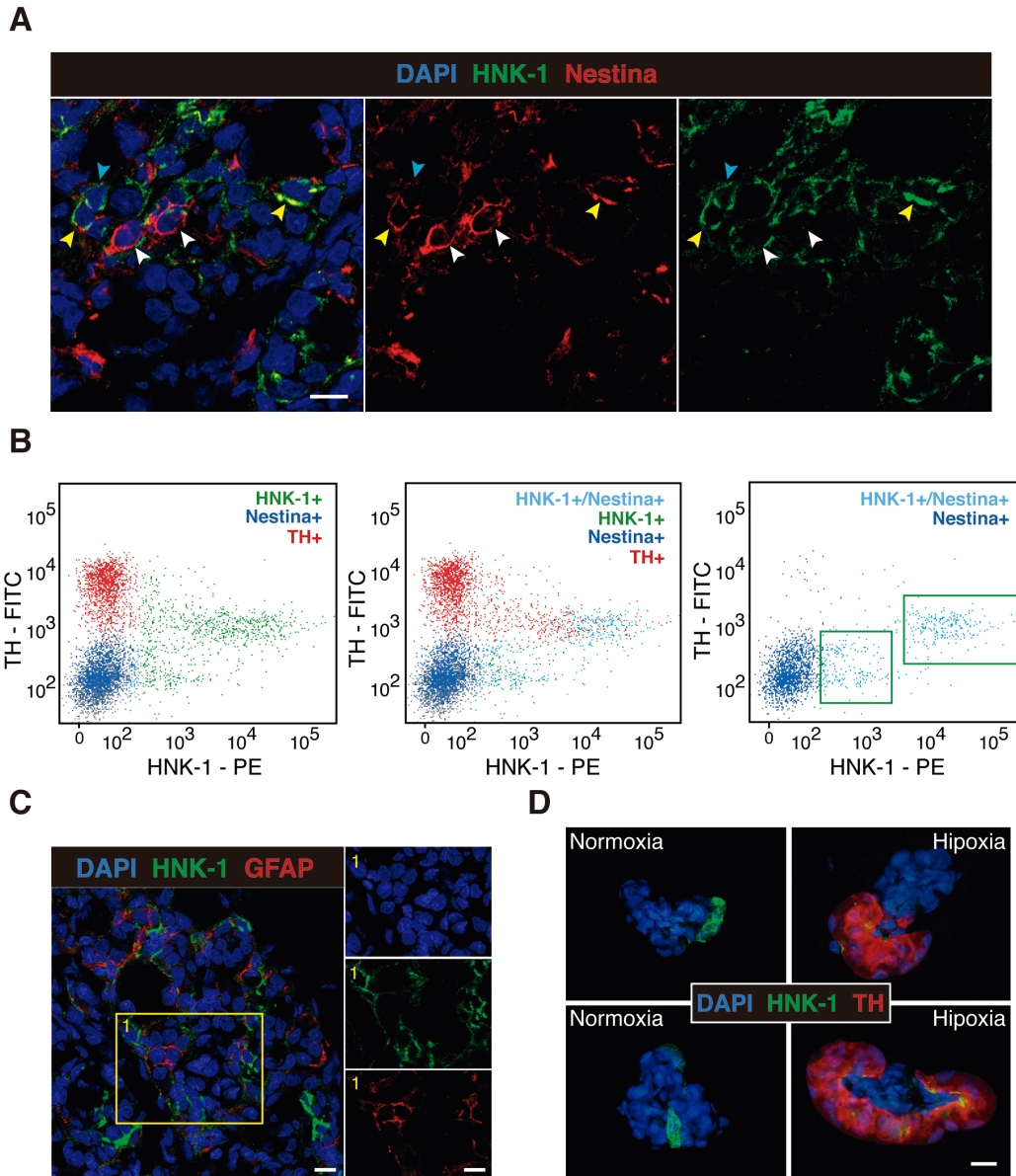


Figura 22. Expresión de HNK-1 en otras células del CC.

A) Imagen de inmunofluorescencia de una sección de CC de rata teñida frente a los marcadores HNK-1 (verde) y nestina (rojo), para observar posible colocalización. La punta de flecha celeste muestra un ejemplo de célula positiva sólo para HNK-1. Las puntas de flecha blancas indican células positivas sólo para nestina. Las puntas de flecha amarillas muestran ejemplos de colocalización. Escala: 10 μ m. **B)** Experimento de citometría de flujo con tres marcadores: TH (en rojo), nestina (en azul y celeste), y HNK-1 (en verde). En el *plot* de la izquierda se muestra la situación habitual de normoxia con las células positivas para HNK-1 en verde. El *plot* central es el mismo pero se ha ocultado el color verde para descubrir que muchas de las células verdes son también positivas para TH (rojo) y nestina (celeste). El *plot* de la derecha es de nuevo el mismo, pero además de ocultar el color verde se han eliminado las células que no expresaban el marcador nestina, de forma que podemos apreciar con claridad toda la población positiva para nestina y HNK-1 (en celeste), o solo para nestina (en azul). **C)** Imagen de inmunohistoquímica de fluorescencia de una sección de CC de rata normóxica, con tinción frente a los marcadores HNK-1 (verde) y GFAP (rojo). En este tipo de tinción no se encontró ningún caso claro de colocalización de ambos marcadores. Escala: 10 μ m. **D)** Fotos de inmunofluorescencia en cortes de neuroesferas de CC, sembradas en normoxia (a la izquierda) o en hipoxia (a la derecha). En las imágenes se muestran las células positivas para el marcador HNK-1 en verde, y las positivas para TH en rojo. Obsérvese la colocalización de los marcadores en las neuroesferas cultivadas en hipoxia. Ambos marcajes se localizan a nivel del *bleb* de la neuroesfera. En el caso de HNK-1, el marcaje está principalmente en las zonas de unión del *bleb* con el *core*. Escala: 10 μ m.

puede deducirse que la población de células madre quiescentes del CC, o células tipo II, no expresan el marcador HNK-1, o no lo expresan a niveles detectables por inmunohistoquímica.

Por último, quisimos comprobar, en cualquier caso, si las células madre del CC pueden dar lugar a células que expresan el marcador HNK-1. Para ello se realizó un ensayo de neuroesferas con CC completo tanto en normoxia como en hipoxia. En la figura 22D se muestran tinciones con anticuerpos frente a TH y HNK-1 en secciones de estas neuroesferas, donde puede apreciarse la presencia de células HNK-1+ en ambas condiciones experimentales. En normoxia se encontraron células de este tipo habitualmente en la periferia del *core* (siendo el *core* la zona central de la neuroesfera, generalmente repleta de progenitores Nestina+), zona donde se suelen formar los *blebs* (pequeños abultamientos repletos de células TH+). En hipoxia, una condición que favorece la diferenciación dopaminérgica en las neuroesferas y por tanto la aparición de *blebs* (Platero-Luengo et al., 2014), el marcaje HNK-1 se encontró en los propios *blebs*, colocalizando con células TH+ pero normalmente en la zona del *bleb* que está en contacto con el *core*. Esta disposición sugiere que el marcador podría estar siendo expresado por células en transición entre las células progenitoras y las células glómicas maduras. En conjunto, los datos indican que la célula madre que forma la neuroesfera, durante su proliferación y diferenciación, podría generar un estadio neuroblástico HNK-1+, que bajo el estímulo hipóxico podría diferenciarse hacia célula glómica madura formando los *blebs*.

4.1. Estudio de la capacidad proliferativa y la identidad de las subpoblaciones de células HNK-1 positivas en el CC

Como se ha descrito anteriormente, las células HNK-1+ constituyen una población heterogénea en cuanto a su naturaleza. Para afinar en su caracterización, quisimos llevar a cabo un estudio de la capacidad proliferativa y de diferenciación de las distintas subpoblaciones, mediante ensayos de formación de esferas, ya que de esta forma podríamos hacernos una mejor idea de la identidad de estas células. Para ello, separamos por citometría de

flujo, de entre todas las células del CC dispersas (Fig. 23A), tres subpoblaciones fácilmente distinguibles: 1) las llamadas “HNK H” (del inglés HNK *high*), que expresan niveles altos del marcador HNK-1 y corresponden mayoritariamente a los neuroblastos TH/HNK (ver Resultados anteriores); 2) las llamadas células “HNK L” (del inglés HNK *low*), que expresan niveles bajos de HNK-1 y corresponderían a células mayoritariamente más indiferenciadas (ver Fig. 22); y 3) células negativas para el marcador HNK-1 (aunque también se intentan evitar las células autofluorescentes que serían las células glómicas). Se excluyeron de este ensayo las células glómicas tras comprobar que, como era de esperar, no forman neuroesferas por ser células postmitóticas. Las células separadas de los tres grupos se cultivaron en condiciones óptimas para la formación de neuroesferas (ver Materiales y Métodos), tanto en condiciones de normoxia (PO₂ 21%) como de hipoxia (PO₂ 3%). En normoxia (Fig. 23B y C), no se observaron diferencias significativas ni en cuanto al diámetro de las esferas aparecidas, ni en cuanto a la eficiencia de formación de las mismas, lo que indica que en normoxia la capacidad proliferativa de las tres subpoblaciones es parecida. En condiciones de hipoxia (Fig. 23D-F), el diámetro de las neuroesferas fue significativamente mayor en la población negativa frente a las dos poblaciones HNK-1+, dando idea de mayor capacidad proliferativa en aquella subpoblación, aunque la eficiencia de formación de esferas no varió de manera significativa. Para estudiar la potencialidad de diferenciación de las esferas producidas por las tres subpoblaciones en condiciones de hipoxia, se llevaron a cabo tinciones por inmunocitoquímica para detectar Nestina y TH en las esferas completas. Como se muestra en la figura 23G y H, la composición de los tres tipos de esferas fue significativamente muy distinta, siendo la diferenciación hacia célula TH de casi el 90% en las células HNK H, de aproximadamente un 30% en las HNK L, y de prácticamente el 0% en las negativas. Estos resultados indican, por un lado que la población HNK H está compuesta por neuroblastos totalmente comprometidos hacia el linaje neuronal del CC, lo que concuerda perfectamente con lo determinado en secciones anteriores de Resultados. Por otro lado, el ensayo de formación de esferas también indica que la población HNK L es más heterogénea y contiene células inmaduras no comprometidas

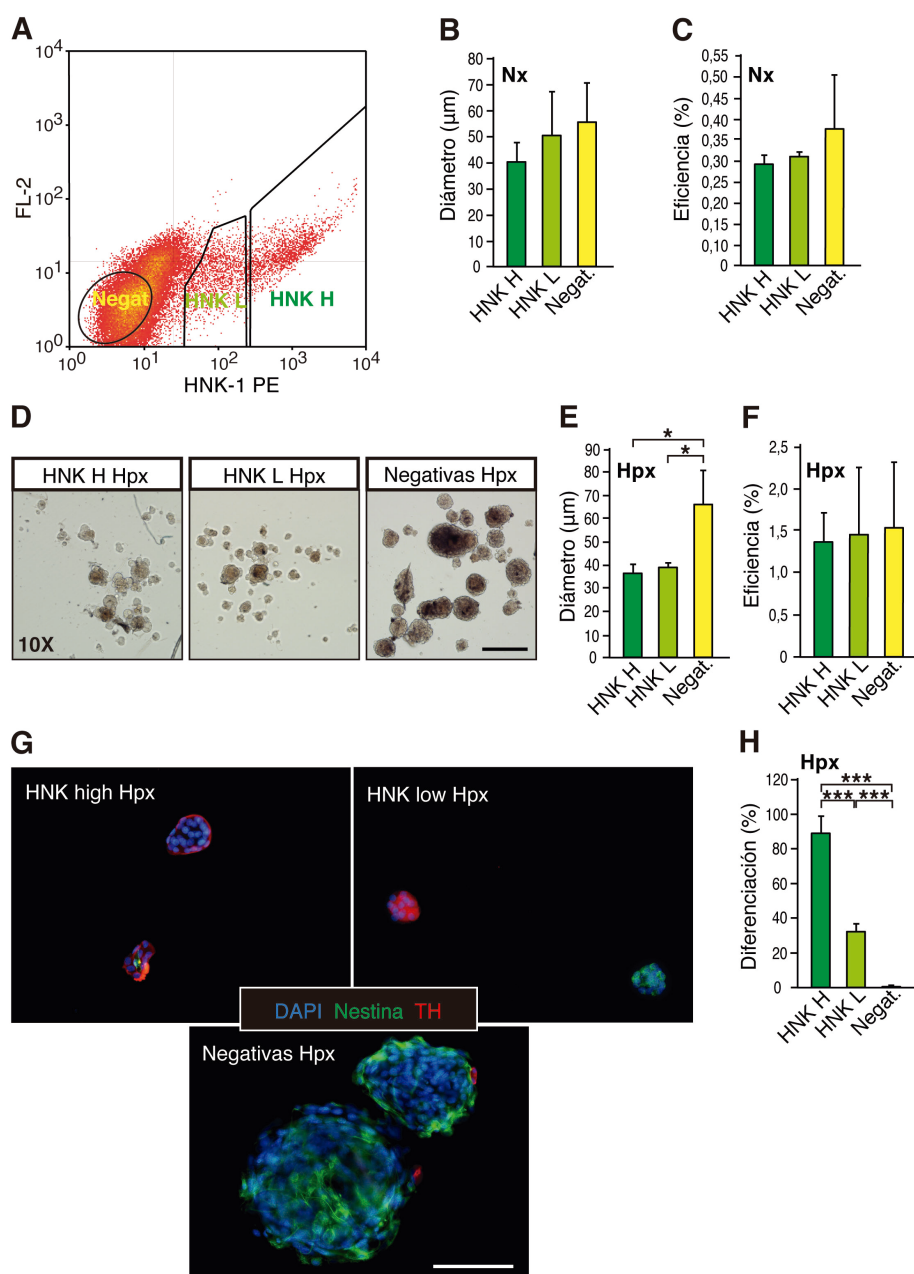


Figura 23. Estudio de la capacidad proliferativa y potencialidad de diferenciación de las subpoblaciones de células HNK-1+ en el CC.

A) *Plot* de citometría donde se muestran las ventanas de selección y separación celular utilizadas para estos experimentos: la población HNK H que expresa altos niveles del marcador HNK-1, la población HNK L que expresa bajos niveles de HNK-1, y la población Negativa. Las tres poblaciones se cultivaron en condiciones de hipoxia y normoxia para la formación de esferas. **B)** Diagrama de barras que representa el diámetro de las esferas obtenidas a partir de las tres poblaciones cultivadas en normoxia. **C)** Representación de la eficiencia de formación de esferas en las tres poblaciones, cultivadas en normoxia. **D)** Imágenes de microscopía a campo claro de las neuroesferas de los tres grupos cultivadas en hipoxia. Escala: 200 μm . **E)** Representación del diámetro de las neuroesferas cultivadas en hipoxia. Obsérvese cómo la población negativa tiene un diámetro significativamente mayor, indicando que tiene mayor capacidad proliferativa en hipoxia. **F)** Representación gráfica de la eficiencia de formación de esferas en hipoxia. **G)** Imágenes de inmunofluorescencia de neuroesferas completas cultivadas en hipoxia, teñidas frente a los marcadores TH (rojo) y nestina (verde), en las tres poblaciones. En estas fotos se aprecia el distinto tamaño y composición celular de los tres grupos de esferas. **H)** Representación gráfica del porcentaje de células diferenciadas hacia TH en las neuroesferas cultivadas en hipoxia. Escala: 100 μm . (n= 3 experimentos independientes para cada condición (hipoxia y normoxia)). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

hacia ningún linaje. Las neuroesferas obtenidas de esta población, con hasta un 30% de diferenciación dopaminérgica, podrían contener el producto de la proliferación y diferenciación multipotente de las células madre del CC (células tipo II). Esto significa que las células tipo II del CC estarían expresando niveles bajos del marcador HNK-1, compatible con su origen de cresta neural, aunque estos niveles sean indetectables por inmunohistoquímica (ver Fig. 22C). Por último, la población de células negativas para HNK-1 produce neuroesferas con un diámetro significativamente mayor y sin capacidad de diferenciación dopaminérgica. Nuestro grupo ha descrito recientemente que estas neuroesferas grandes son el resultado de la proliferación y diferenciación de progenitores restringidos hacia linaje mesectodérmico, presentes en el órgano para contribuir a la angiogénesis que se desencadena en respuesta a hipoxia (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016). Una conclusión adicional interesante de estos resultados podría ser que el marcador HNK-1 en el CC sirve para distinguir los linajes neuronal y mesectodérmico derivados de las células madre multipotentes del órgano.

5. Estudio de la población HNK en el cuerpo carotídeo de otras especies

En el apartado de Introducción se ha descrito cómo la glicoproteína HNK-1 está presente en la cresta neural de numerosos modelos animales (rata, aves, cerdo, etc.), pero ausente en las células de la cresta neural de ratón, (Huang et al., 2016; Kerosuo et al., 2015; Tucker et al., 1988). La ausencia del marcador HNK-1 en ratón dificulta enormemente el estudio de los neuroblastos del CC, ya que impide la utilización de modelos animales transgénicos. Con objeto de identificar y caracterizar los neuroblastos del CC de ratón, y estudiar su funcionalidad comparados con los de rata, se decidió realizar un curso temporal de hipoxia en CC de ratones C57. Se dividieron los animales en tres grupos, y se sometieron al estímulo hipóxico en la cámara isobárica al 10% de PO₂, durante distintos tiempos. El primer grupo estuvo 3 días en hipoxia, el segundo 5 días, y el tercero 7 días. En la figura 24A y B se muestran los

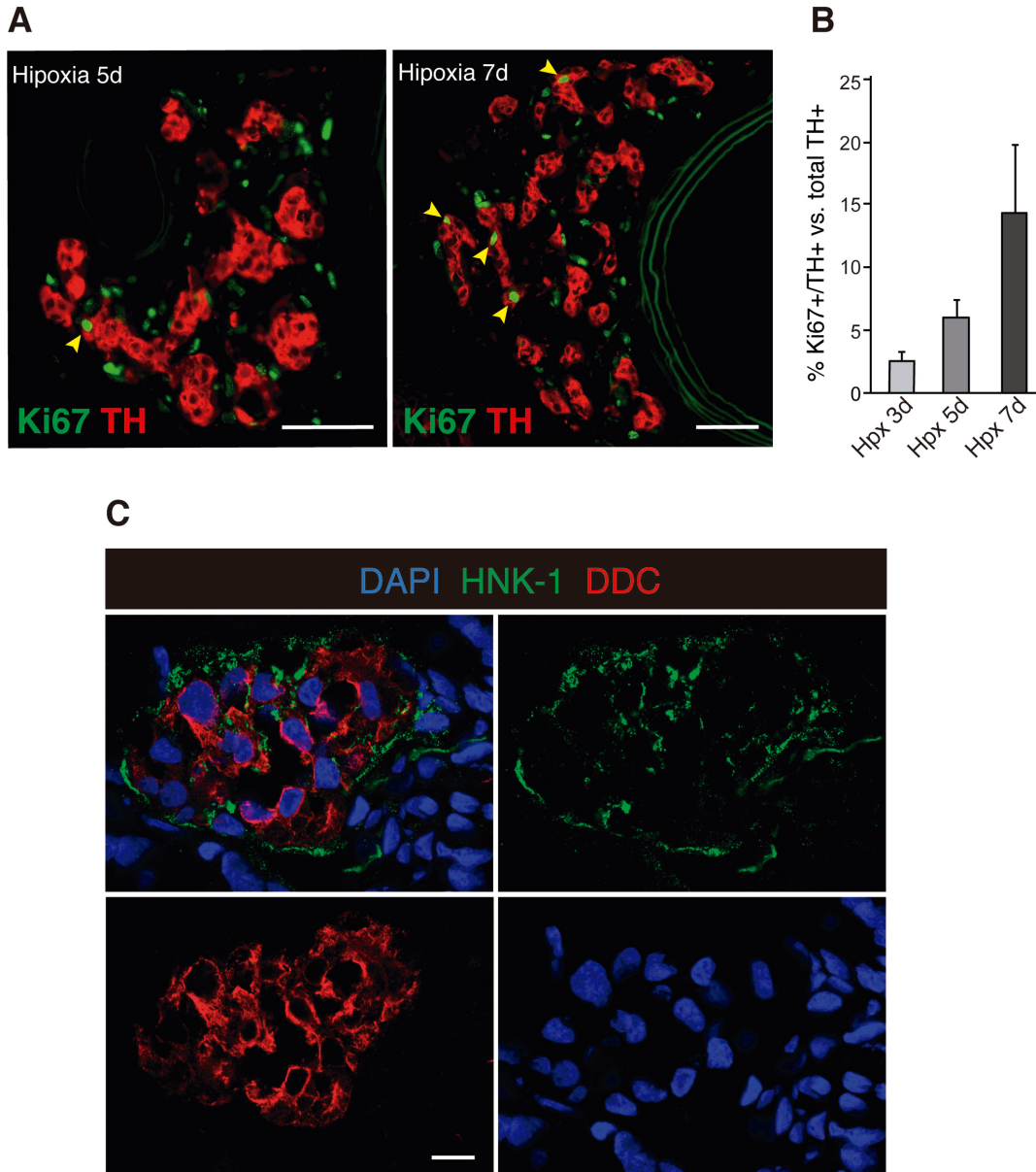


Figura 24. Identificación de neuroblastos en el CC de ratón y en el de humano.

A) Imágenes de inmunofluorescencia de un curso temporal de hipoxia en ratón. Las imágenes ejemplo corresponden al grupo de 5 días en hipoxia (izquierda) y 7 días en hipoxia (derecha). Las puntas de flecha amarillas muestran células TH+/Ki67+, que corresponderían a neuroblastos. Escalas: 50 μ m. **B)** Representación gráfica del porcentaje de neuroblastos identificados en los tres grupos de tratamiento (n= 2-4 CC por grupo). **C)** Imágenes de microscopía de fluorescencia en rodajas de CC humano, tras realizar una inmunohistoquímica frente a los marcadores HNK-1 (verde) y DDC (rojo). Existe marcaje de HNK-1 en la muestra pero es difuso, por lo que resulta difícil mostrar colocalización de ambos marcadores e identificar a los neuroblastos. Escala: 10 μ m.

resultados del experimento. Se muestran dos fotografías como ejemplo, en las que se advierte muy escasa proliferación a 5 días de hipoxia, y algo más de proliferación a 7 días. En la cuantificación (Fig. 24B) se puede apreciar que el curso temporal en ratón no sigue en absoluto una dinámica parecida al de la

rata (Fig. 2A y B). En el ratón los niveles de células TH proliferativas (indicadas con puntas de flecha amarillas) son escasísimos en los primeros días, y van incrementando lentamente, mientras que en el caso de la rata el pico de proliferación de estas células se producía entre los días tercero y cuarto de estímulo (Fig. 10B). A partir de estos resultados sólo podemos concluir que si existen neuroblastos en el CC de ratón, su número es mucho menor y su activación bajo el estímulo hipóxico es mucho más lenta, por lo que no aceleraría el proceso de neurogénesis tanto como en el caso de la rata. Estos resultados son muy preliminares y será necesaria una mejor caracterización de las poblaciones del CC de ratón, utilizando otros marcadores que las identifiquen correctamente.

Continuando con la caracterización de la población HNK-1 en el CC de otras especies, se intentaron realizar técnicas de inmunofluorescencia en el CC humano. Las muestras provenientes de donante cadavérico se habían recibido como tejido fresco, y se habían fijado con solución de PFA al 4%, siendo el procesamiento posterior igual al del tejido animal descrito en Materiales y Métodos. Para marcar las células glómicas del CC humano se utilizó el anticuerpo anti-dopamina decarboxilasa (DDC), que funciona mejor que el anticuerpo TH (Ortega-Sáenz et al., 2013). En la figura 24 C se muestra una imagen de microscopía confocal del resultado obtenido tras la tinción con DDC y HNK-1. En la fotografía se aprecia que existe marcaje HNK-1, pero está muy disperso, siendo imposible realizar la identificación de ningún neuroblasto concreto. La inmunohistoquímica de marcadores de membrana es una técnica compleja que requiere contar con tejidos en condiciones muy óptimas. En el caso del tejido humano, al no estar perfundido, sufre cierto deterioro que hace muy difícil técnicamente el marcaje con determinados anticuerpos, como es el caso de HNK-1. Serían necesarios otro tipo de estudios partiendo del tejido fresco (como análisis de célula viva por citometría) para determinar si verdaderamente existen células neuroblásticas HNK-1 positivas en el CC humano.

6. Estudios preliminares de la vuelta a la normoxia en el CC de rata

Desde hace décadas se conoce que durante una hipoxia crónica el CC crece y forma nuevas células neuronales, pero que al volver a la normoxia, y en un periodo relativamente corto, el tejido vuelve a las condiciones originales en cuanto a número de células TH+ (Arias-Stella and Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984; Pardal et al., 2007; Wang and Bisgard, 2002). En la figura 9A y B de este trabajo se muestra un experimento que incluye la renormoxia (periodo normóxico tras un periodo hipóxico) tras una hipoxia mantenida de 7 días, y los resultados confirman lo que estaba descrito en la literatura en cuanto a la vuelta a condiciones basales. Sin embargo, en este trabajo hemos querido afinar algo más acerca de lo que ocurre en renormoxia con las células HNK-1 muy positivas, es decir, los neuroblastos. Para ello se realizaron estudios *in vitro*, que aunque fueron muy preliminares, mostraron resultados de interés para nuestra línea de investigación.

Para resolver esta cuestión acerca de los neuroblastos en renormoxia, se tomaron dos grupos de animales y se sometieron a un estímulo hipóxico durante dos tiempos distintos. Uno de los grupos se sometió a hipoxia durante 5 días, tiempo suficiente para movilizar parte de la población de neuroblastos (ver Fig. 12B), pero sin llegar a perder toda la población HNK-1 positiva. El otro grupo de animales se sometió a una hipoxia crónica prolongada de 21 días, que como se mostró en la figura 12C produce prácticamente la total depleción de la población HNK-1 muy positiva. Una vez concluida la exposición a hipoxia de ambos grupos de animales, se les extrajeron los CC y se dispersaron para realizar la separación de células glómicas (TH+ y HNK-1 negativas) mediante FACS (elipse sobre la población de células autofluorescentes de la Fig. 25A). Por último, las células glómicas separadas se pusieron en cultivo en condiciones de normoxia durante 10 días (ver esquema completo del experimento en la figura 25A). A continuación, las células se fijaron y se tiñeron mediante inmunocitoquímica con anticuerpos frente a TH y HNK-1, para conocer si los neuroblastos se recuperaban en este periodo de renormoxia *in*

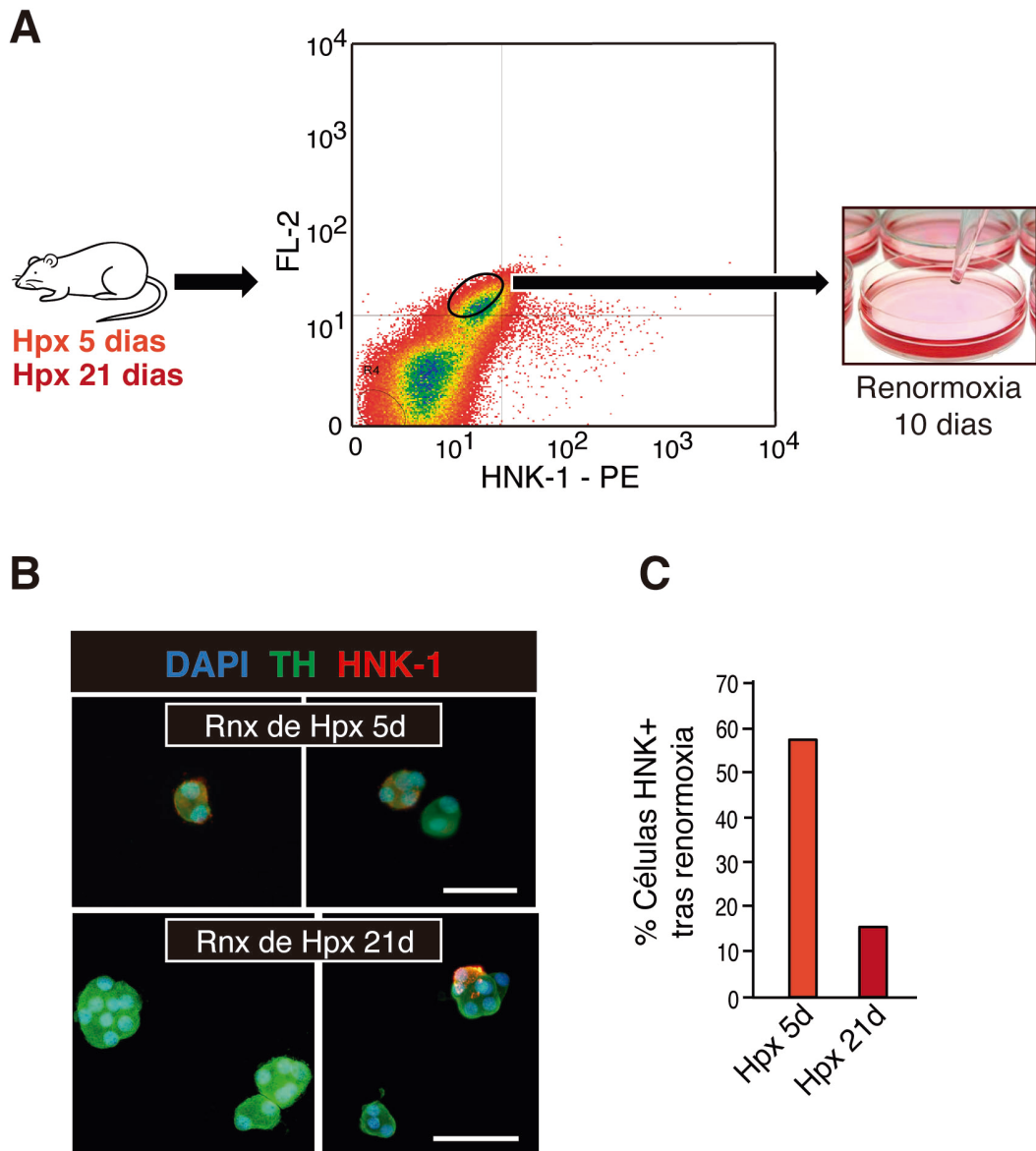


Figura 25. Experimento de renormoxia *in vitro* y recuperación del fenotipo HNK-1+ en células glómicas.

A) Diagrama del diseño experimental realizado. Dos grupos de animales se someten a hipoxia durante 5 días y 21 días, después se separan por FACS las células glómicas maduras, y se siembran en condiciones de normoxia durante 10 días. **B)** Imágenes de inmunofluorescencia en las que se observa recuperación del fenotipo HNK-1 positivo (rojo) en ambos grupos de células glómicas. Escala: 25 μ m. **C)** Cuantificación del porcentaje de células HNK-1+ recuperadas en los dos grupos experimentales. Se observa mayor capacidad de recuperación del fenotipo inmaduro HNK-1+ en el grupo que ha estado menor tiempo en hipoxia.

in vitro. Los resultados obtenidos (Fig. 25B y C) mostraron que las células TH+ que provenían de ratas que habían estado 5 días en hipoxia recuperaban la expresión del marcador HNK-1 en prácticamente un 60% de los casos. Por el contrario, las células TH+ que provenían del grupo de animales que habían estado 21 días en hipoxia recuperaban la expresión del marcador de superficie

en tan solo un 15% de los casos. Estos resultados, aunque de forma muy preliminar, sugerirían que ciertas células glómicas obtenidas en hipoxia no llegan a completar del todo su maduración, reteniendo la capacidad de desdiferenciarse hacia neuroblastos de nuevo, una vez desaparecido el estímulo hipóxico. Esta propiedad se iría perdiendo conforme aumenta el tiempo de exposición al estímulo diferenciador que es la hipoxia crónica. Esta hipótesis, que parece la más plausible para explicar los resultados de estos experimentos, tendría que ser confirmada mediante una caracterización mucho más profunda de este proceso de vuelta a la normoxia.

7. Estudio de expresión diferencial de genes entre células TH/HNK y células TH

Los datos aportados hasta el momento indican la existencia de dos subpoblaciones neuronales en el CC adulto, similares en muchos aspectos pero con diferencias importantes, principalmente en cuanto a la fisiología celular y a su capacidad de respuesta al estímulo hipóxico. Las células TH/HNK expresan marcadores de linaje neuronal como TH y Tuj1, pero retienen cierta capacidad proliferativa y poseen características ultraestructurales de inmadurez. Además, su capacidad de detectar la hipoxia se encuentra aún restringida, por lo que concluimos que se trata de una población de neuroblastos prediferenciados, preparados para acelerar el proceso de formación de nuevas neuronas en respuesta a hipoxia. Por otro lado, hemos identificado la población de células TH (negativas para HNK) como las células glómicas maduras del órgano, plenamente funcionales y sensibles a todos los estímulos fisiológicos que activan al CC. Con objeto de caracterizar más en profundidad las diferencias existentes entre ambas poblaciones, decidimos realizar un estudio de expresión diferencial de genes entre las células TH/HNK y las células TH mediante *microarray*. De esta forma, pretendemos identificar diferencias moleculares entre ambos tipos celulares, que se traduzcan en diferencias en las funciones biológicas presentes en los neuroblastos y las células neuronales maduras.

C Para llevar a cabo este análisis de *microarray* se recopilaron 4 muestras de ARN de cada condición (condición TH/HNK y condición TH), que se procesaron y se hibridaron con el correspondiente *microarray* (ver Materiales y Métodos). Con los datos obtenidos de expresión génica se realizaron varios estudios preliminares on los programas descritos en el apartado de Materiales y Métodos, y los resultados obtenidos se exponen a continuación.

Primero se realizó un análisis básico, filtrando los datos obtenidos, mediante el programa TAC (*Transcriptome Analysis Console*, Affymetrix). Los datos de expresión diferencial se expresan en base a un factor de cambio, denominado *Fold Change* (FC), y a un valor de significación de ese cambio, denominado *p-value* (en este caso FDR *p-value* que es aún más restrictivo que el *ANOVA p-value*). El filtro inicial aplicado mediante el programa TAC fue de un FC >2 ó <-2, y un FDR *p-value* <0,05, lo que nos aseguraba un alto grado de significación para cambios importantes en la expresión génica. Este análisis preliminar dio como resultado un listado de los 137 genes más diferencialmente expresados en el *microarray*, 80 de ellos eran los más expresados en las células TH/HNK, y 57 los más expresados en las células TH.

En la tabla 1 se muestra un resumen de los 20 genes con mayor expresión diferencial en la población TH/HNK, con un FC que va desde 17,92 en el primer caso, hasta 5,87 en el gen número 20. Hemos consultado las bases de datos utilizadas por los programas de análisis para conocer algunos detalles acerca de estos genes. Entre ellos cabe destacar genes típicamente neurales, como el regulador transcripcional Rbfox, o Ascl1, un factor de transcripción implicado en el compromiso y diferenciación hacia el linaje neuronal. También hay moléculas que intervienen en la migración neuronal como Tubb2B y Slit3, y moléculas de adhesión como Epcam, Ncam2, o Cdh7, sugiriendo la posible importancia de la posición y el movimiento en los neuroblastos. La lista también contiene genes que codifican para subunidades de canales de sodio (Scn9) y de potasio (Kcnd2) voltaje-dependientes (consistente con los datos obtenidos en el análisis electrofisiológico de estas células), y genes asociados a diferenciación como la Dbh o el Sv2c. También

Fold Change	Increase/Decrease	ANOVA p-value	Gene Symbol	Gene Description
17,92	Increase	0,000012	Rbfox1	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1
16,06	Increase	0,000007	Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
12,71	Increase	0,000142	Grm7	glutamate receptor, metabotropic 7
11,94	Increase	0,000042	Mgat4c	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative)
11,91	Increase	0,000007	Kcnd2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2
11,84	Increase	0,000012	Epcam	epithelial cell adhesion molecule
11,65	Increase	0,000003	Prlh	prolactin releasing hormone
11,25	Increase	0,000003	Dbh	dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monooxygenase)
9,95	Increase	0,000013	Sv2c	synaptic vesicle glycoprotein 2c
9,91	Increase	0,000004	Sctr	secretin receptor
8,78	Increase	0,000126	Cdh7	cadherin 7, type 2
7,86	Increase	0,000102	Ntng1	netrin G1
7,52	Increase	2,99E-07	Ascl1	achaete-scute family bHLH transcription factor 1
7,22	Increase	0,000217	Slit3	slit homolog 3 (Drosophila)
7,21	Increase	0,000042	Sidt1	SID1 transmembrane family, member 1
7,18	Increase	0,000002	Tubb2b	tubulin, beta 2B class IIb
7,03	Increase	0,000032	Ncam2	neural cell adhesion molecule 2
6,51	Increase	0,000111	Ar	androgen receptor
6,09	Increase	0,000244	Lppr5	lipid phosphate phosphatase-related protein type 5
5,87	Increase	0,000083	Tspan1	tetraspanin 1

Tabla 1. Lista de los 20 genes más diferencialmente expresados en la población de neuroblastos del CC.

se incluyen receptores de membrana, algunos de ellos de neurotransmisores (Grm7, Sctr, Ar).

En la tabla 2 se resumen los 20 genes más expresados en las células TH, con FC que van desde -17,54 hasta -3,55 (el signo negativo indica que están sobreexpresados en las TH con respecto a las TH/HNK). Entre estos genes hay más variabilidad, aunque la mayoría son genes claramente neuronales como Slc18a1, implicado en el transporte de monoaminas en vesículas, Pcp4, proteína de unión a calmodulina, receptores como Cnr1, y varias moléculas que intervienen en la ruta de señalización de Wnt-Beta-Catenina, como Fzd5, Nkd, Notum y Lgr5.

En relación a los neuroblastos TH/HNK, nos interesó también en este primer análisis preliminar comprobar la presencia de genes que codificaran

Fold Change	Increase/Decrease	ANOVA p-value	Gene Symbol	Gene Description
-17,54	Decrease	0,000039	Cldn5	claudin 5
-10,08	Decrease	0,000038	Lgr5	leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5
-8,26	Decrease	0,000179	Gnas	GNAS complex locus
-7,56	Decrease	0,000249	Gngt2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2
-7,2	Decrease	0,000126	Notum	notum pectinacetylerase homolog (Drosophila)
-5,81	Decrease	0,00021	Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
-5,6	Decrease	0,000181	Lamc3	laminin gamma 3
-5,45	Decrease	0,000167	Pcp4	Purkinje cell protein 4
-5,31	Decrease	0,000007	Cnr1	cannabinoid receptor 1 (brain)
-4,99	Decrease	0,00014	Pfkip	phosphofructokinase, platelet
-4,52	Decrease	0,000298	Fzd5	frizzled class receptor 5
-4,49	Decrease	0,000295	Hspb6	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
-4,37	Decrease	0,000061	Cacna2d2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2
-3,97	Decrease	0,000133	Cmklr1	chemokine-like receptor 1
-3,87	Decrease	0,000095	Msx2	msh homeobox 2
-3,79	Decrease	0,000137	Il20ra	interleukin 20 receptor, alpha
-3,7	Decrease	0,000223	Myo5b	myosin Vb
-3,66	Decrease	0,000002	Slc18a1	solute carrier family 18 (vesicular monoamine transporter), member 1
-3,63	Decrease	0,000266	Nkd1	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)
-3,55	Decrease	0,000115	Apoc4	apolipoprotein C-IV

Tabla 2. Lista de los 20 genes más diferencialmente expresados en la población de células glómicas del CC.

para receptores de membrana (Tabla 3), con idea de dilucidar mecanismos de señalización que nos ayudaran a entender mejor la biología de estas células. Con los criterios establecidos de FC y *p-value* al comienzo de este análisis, se encontraron 19 receptores de membrana en estas células, la mayoría bien conocidos y descritos en otros sistemas neuronales. Aunque variados, la mayoría de estos receptores tienen funciones de neurotransmisión y neuromodulación, como son los receptores de Glutamato, tanto metabotrópicos como ionotrópicos, los receptores de Acetilcolina nicotínicos y muscarínicos, o los receptores de sustancias descritas en las vesículas de las células glómicas como la Secretina y el Neuropeptido Y. La presencia de todos ellos indica la importancia de la comunicación entre los neuroblastos y las células neuronales maduras para el funcionamiento del nicho neurogénico del CC.

Fold Change	Increase/ Decrease	ANOVA p-value	Gene Symbol	Gene Description
12,71	Increase	0,000142	Grm7	glutamate receptor, metabotropic 7
9,91	Increase	0,000004	Sctr	secretin receptor
7,91	Increase	0,00043	Grik3	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3
6,51	Increase	0,000111	Ar	androgen receptor
5,13	Increase	0,002026	Cntfr	ciliary neurotrophic factor receptor
4,2	Increase	0,000096	Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1
3,79	Increase	0,000239	Epha4	Eph receptor A4
3,28	Increase	0,003385	Gpr137c	G protein-coupled receptor 137C
2,98	Increase	0,000957	Chrm3	cholinergic receptor, muscarinic 3
2,98	Increase	0,001256	Chrna3	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3 (neuronal)
2,94	Increase	0,000003	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1
2,63	Increase	0,002177	Epha7	Eph receptor A7
2,56	Increase	0,000156	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1
2,34	Increase	0,006145	Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
2,25	Increase	0,007564	Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
2,14	Increase	0,001159	Nrbp2	nuclear receptor binding protein 2
2,1	Increase	0,0085	Lifr	leukemia inhibitory factor receptor alpha
2,04	Increase	0,002053	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
2,03	Increase	0,00741	Ptger3	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)

Tabla 3. Receptores de membrana más expresados en los neuroblastos del CC.

7.1. Identificación de rutas de señalización mediante el programa *Transcriptome Analysis Console* (TAC)

Tras el análisis básico recién expuesto, decidimos utilizar el mismo programa TAC para un análisis con condiciones menos restrictivas ($FC > 2$ ó < -2 , y ANOVA p -value $< 0,05$; ver Materiales y Métodos). Simplemente cambiando el FDR p -value por un ANOVA p -value, son muchos más los genes que ahora participarán en el análisis, lo que permite tener datos suficientes para identificar rutas de señalización o *pathways* importantes en las dos poblaciones. De esta forma podremos también poner de manifiesto los principales procesos de señalización que se establezcan entre ambos tipos celulares, lo que nos dará idea de la relación y comunicación existente entre el neuroblasto y la neurona

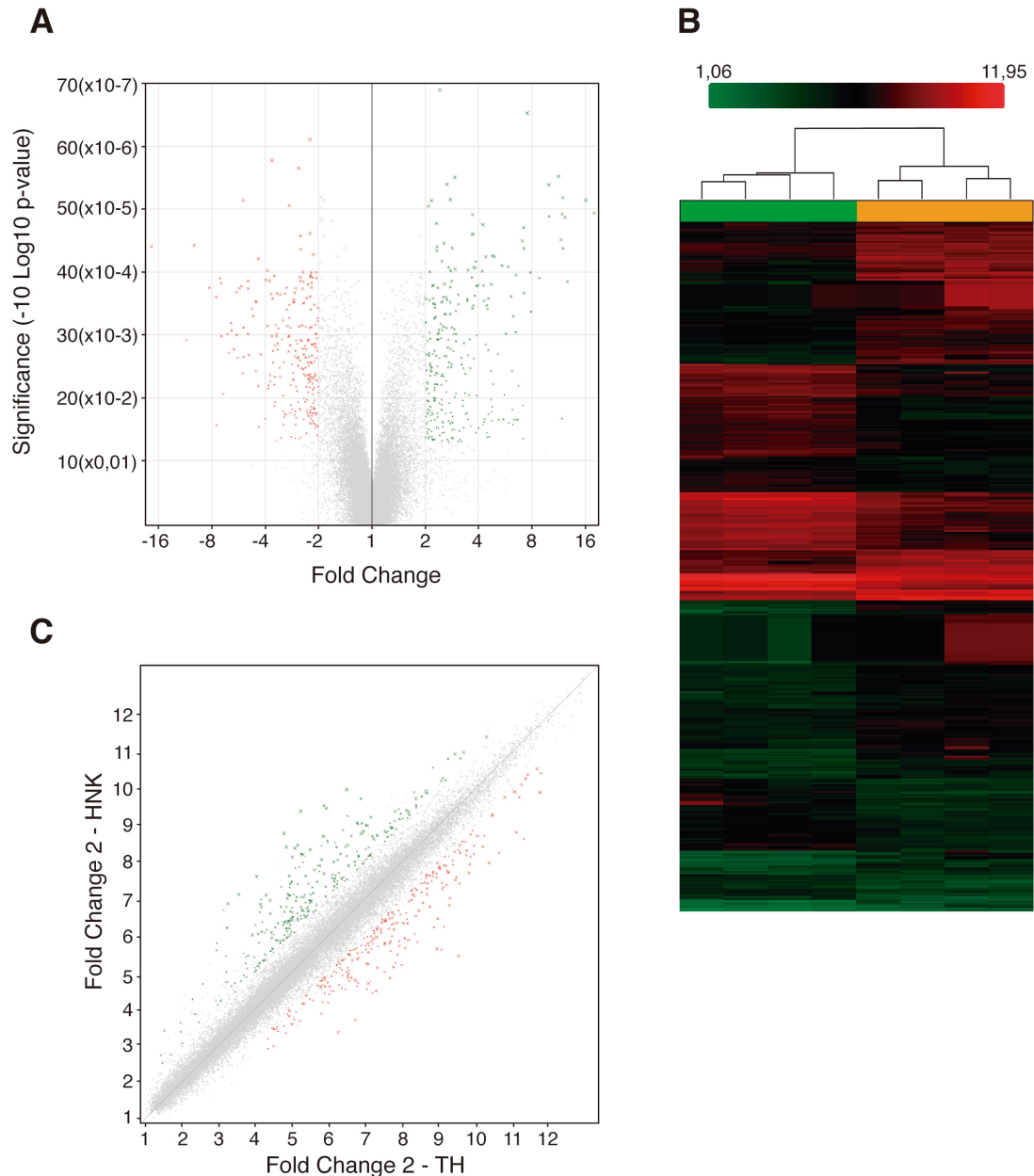


Figura 26. Distintos tipos de representación de los resultados obtenidos en el estudio de *microarray*.

A) Representación de tipo *volcano plot* realizado por el programa TAC (*Transcriptome Analysis Console*), en el que se muestra el nivel de cambio (*Fold Change*) y la significación de los genes elegidos para el análisis. **B)** Mapa de calor (*Heatmap*) donde se muestra el agrupamiento jerárquico de las réplicas para cada muestra, así como las diferencias de expresión para cada gen en ambas poblaciones. **C)** *Plot* bidimensional en el que se muestra el nivel de cambio en ambos ejes, de manera que se aprecia cómo se han elegido sólo los genes que muestran los cambios más acentuados para cada población.

madura del CC. En la Figura 26A se muestra un gráfico de tipo *volcano plot* donde se representa el *Fold Change* en el eje de ordenadas y la significación en el eje de abcisas. Este tipo de representación nos da una aproximación muy visual del número de genes seleccionados para ambas poblaciones con las

condiciones anteriormente expuestas. Aunque se observa también lo restrictivo de las condiciones escogidas para el análisis, se acaba seleccionando un número importante de genes (331 genes regulados al alza en las TH/HNK, representados en verde, y 257 genes regulados a la baja, es decir al alza en las TH, representados en rojo). La figura 26B muestra un análisis de agrupamiento jerárquico (*hierarchical clustering*), que consiste en el agrupamiento de las muestras utilizadas para el *microarray* según sus similitudes o parentesco, en base al nivel de expresión de los genes. Esto da como resultado una matriz bidimensional llamada mapa de calor (*heatmap*), en la que cada dato de cada muestra se representa en una escala de color según el nivel de expresión del gen que se encuentre en ese punto del eje de abcisas. En este caso, y según lo esperado, el agrupamiento jerárquico indica que las muestras correspondientes a un mismo tipo celular son muy parecidas entre sí, y diferentes de las correspondientes al otro tipo celular. Este resultado indica que la eficiencia del método de separación de las muestras ha sido buena, y que la elección de las réplicas biológicas fue la correcta para la realización del *microarray*. Por otro lado, el mapa de calor, al incluir todos los genes del genoma, también muestra que la expresión de genes en algunas zonas es muy similar, confirmando la cercanía genética entre ambas poblaciones celulares. Aún así, también se observan zonas con expresión bastante diferencial de genes, en las que se basó el resto de nuestro análisis. Finalmente, en la figura 26C se incluye una representación de los datos en un gráfico de tipo *scatter plot*, que sirve para visualizar los cambios de señal más significativos entre ambas poblaciones, y la dispersión de estos cambios.

En base a estos criterios de selección de genes, el programa TAC identificó en su base de datos las rutas de señalización más representadas en ambas poblaciones celulares. En la figura 27 se muestra una representación en histograma de los *pathways* o rutas más importantes identificados en nuestro análisis con TAC. Las rutas están ordenadas por significancia (*p-value*), representada por la barra amarilla. También se aportan datos sobre el número de genes que participan en la ruta, tanto los expresados por las células TH/HNK (representados por la barra verde) como los expresados por las células TH (representados por la barra roja). La longitud total de las dos barras

A

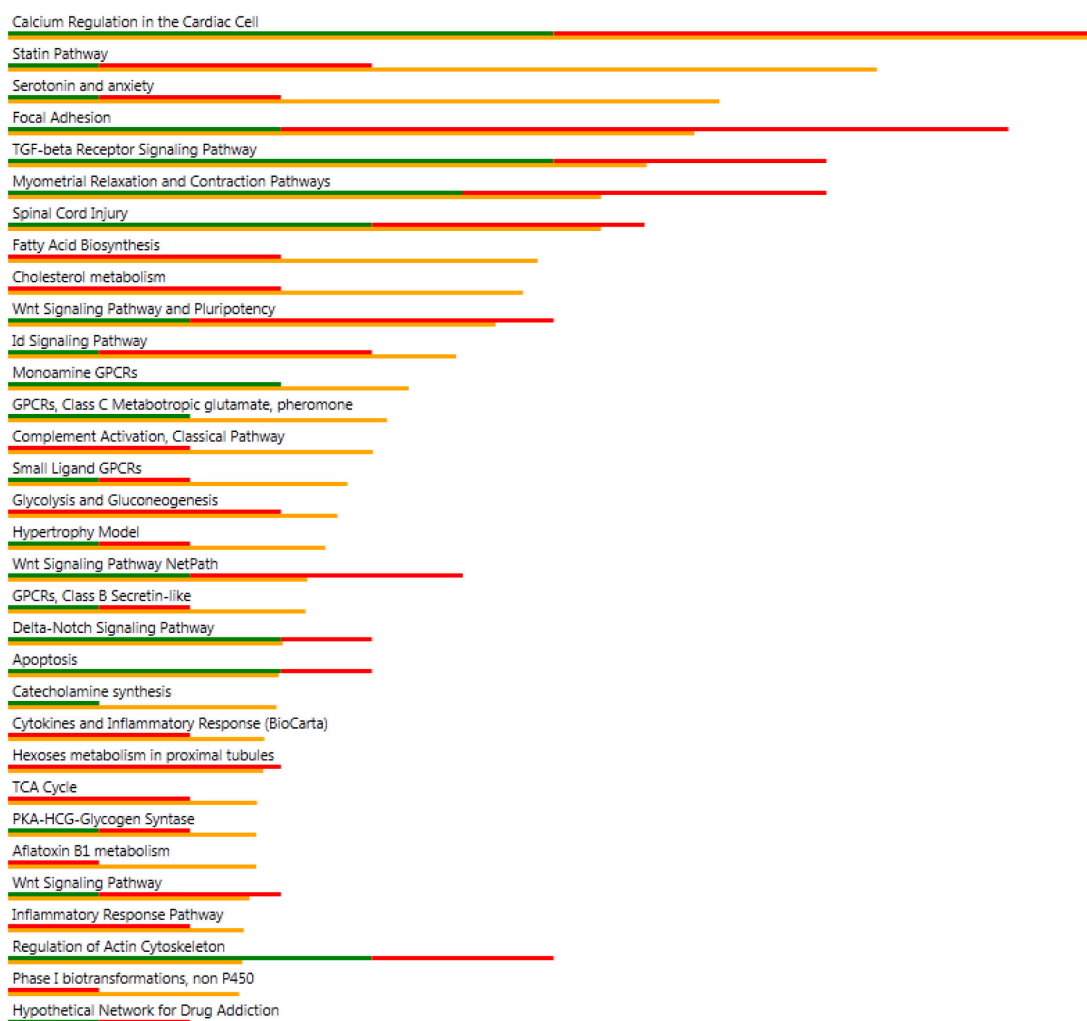


Figura 27. Rutas significativas identificadas mediante el programa TAC.

A) Listado de las rutas o *pathways* más importantes identificados con el programa TAC, ordenadas por significación (tamaño de la barra amarilla). La barra verde indica que los genes más importantes en esa ruta están expresados al alza en neuroblastos, y la barra en rojo indica que están expresados al alza en células glómicas maduras.

unidas (verde y roja) nos indica la importancia de esa ruta de señalización en cuanto al número de genes diferencialmente expresados en las muestras. En primer lugar, tanto por significancia como por número de genes que participan, se encuentra el *pathway* denominado “*Calcium regulation in the cardiac cell*” (regulación por Calcio en la célula cardíaca), en el que intervienen diversos genes sobreexpresados en ambas poblaciones, y que mostraremos con más detalle en el siguiente apartado. También se pueden apreciar numerosos casos de rutas relacionadas con neurotransmisores como el Glutamato, o con Catecolaminas y Monoaminas, rutas que aparecen principalmente como

propias de las células TH/HNK, lo que simplemente significa que están especialmente representadas en las células inmaduras, pero no necesariamente ausentes en las maduras. Por otro lado, otras rutas de señalización relacionadas con el metabolismo de las grasas y de los azúcares se encuentran principalmente en las células TH, indicando que se trata de células metabólicamente muy activas, como era de esperar. Aparecen igualmente varios *pathways* relacionados con la señalización por Wnt, coincidiendo con el análisis previo, por lo que también se hablará más adelante de la ruta de señalización “*Wnt signaling pathway and pluripotency*” (Ruta de señalización Wnt y pluripotencia) como ejemplo de nuestro análisis.

7.1.1. Ruta de señalización “Regulación por calcio en la célula cardíaca”

En estas rutas se representan de manera esquemática procesos biológicos o de señalización a nivel molecular, y se indica la contribución de los genes más sobreexpresados en ambas poblaciones, mediante un código de color, estando en verde los más expresados en las TH/HNK (los regulados al alza en el análisis), y en rojo los más expresados en las células TH (los regulados a la baja en el análisis) (Fig. 28). Además, se indica el nivel de expresión del gen mediante la intensidad del color, siendo el color verde más intenso cuanto mayor es el *Fold Change* del gen en las TH/HNK y más regulado al alza se encuentra en el *microarray*, y siendo el rojo más intenso cuanto mayor nivel de expresión tenga el gen en las células TH y por tanto un *Fold Change* más negativo, es decir, el gen estaría más regulado a la baja en el *microarray*. En el caso de genes que en el esquema se encuentran con el fondo de color pero con textura rayada, indica que se encuentran expresados en la población del color correspondiente pero que no cumple los criterios, o de *Fold Change* o de *p-value*, con los que se filtraron los datos al comienzo del análisis. La ruta mostrada en la figura 28 corresponde con la de mayor significancia y mayor contribución de genes de ambas poblaciones celulares. Se trata de la ruta “Regulación por calcio en la célula cardíaca” (*Calcium Regulation in the Cardiac Cell*), una ruta de señalización típica de célula excitable, con múltiples canales (de sodio, potasio, calcio), algunos de ellos dependientes de voltaje, y con varias señalizaciones intracelulares mediadas

A

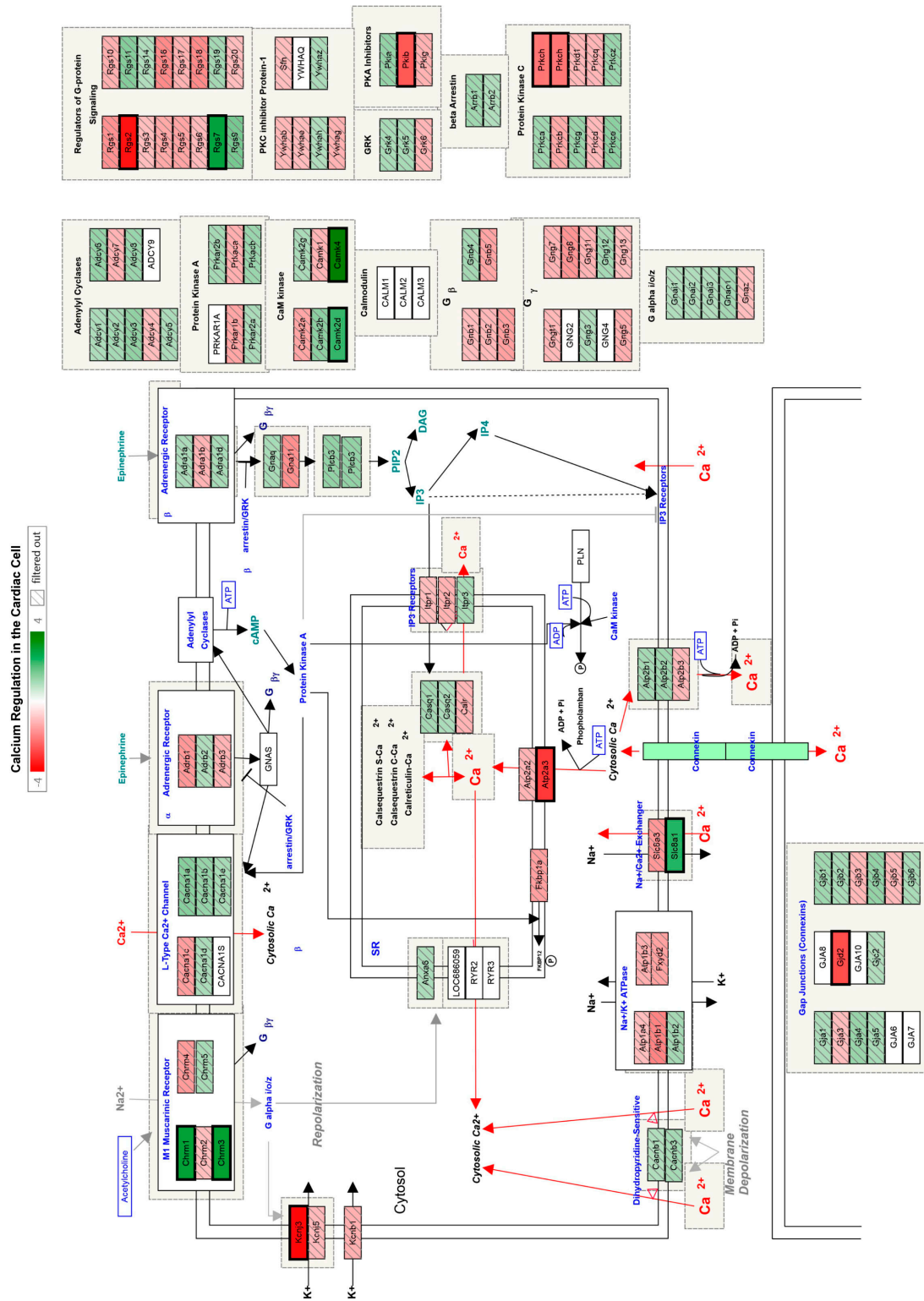


Figura 28. Ruta de “Regulación por calcio de la célula cardíaca”.
 A) El programa TAC identifica esta ruta como la más representada y significativa en el análisis de microarray.

FOLD CHANGE	GENE SYMBOL	DESCRIPTION	GO Molecular Function Term
4,79	Camk4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	calmodulin-dependent protein kinase activity; calmodulin binding; ATP binding; nucleotide binding
2,98	Chrm3	cholinergic receptor, muscarinic 3	protein binding; drug binding; G-protein coupled acetylcholine receptor activity; acetylcholine binding; signal transducer activity
2,94	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1	drug binding; G-protein coupled acetylcholine receptor activity; signal transducer activity
2,83	Rgs7	regulator of G-protein signalling 7	signal transducer activity; GTPase activator activity; protein binding
2,34	Slc8a1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	calcium:sodium antiporter activity; protein binding; calmodulin binding; cytoskeletal protein binding; ankyrin binding; ion channel binding; metal ion binding; antiporter activity
2,22	Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	protein serine/threonine kinase activity; calmodulin-dependent protein kinase activity; protein binding; calmodulin binding; ATP binding; titin binding; ion channel binding; nitric-oxide synthase binding; nucleotide binding
-2,16	Prkch	protein kinase C, eta	protein serine/threonine kinase activity; calcium-independent protein kinase C activity; ATP binding; Ral GTPase binding; enzyme binding; metal ion binding; nucleotide binding
-2,6	Pkib	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity; kinase activity; protein kinase inhibitor activity
-2,78	Gjd2	gap junction protein, delta 2	protein binding
-3,09	Atp2a3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous	calcium-transporting ATPase activity; ATP binding; metal ion binding; nucleotide binding; hydrolase activity; cation-transporting ATPase activity
-3,61	Rgs2	regulator of G-protein signalling 2	GTPase activator activity; beta-tubulin binding; molecular_function; protein binding
-3,73	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	inward rectifier potassium channel activity; protein binding; G-protein activated inward rectifier potassium channel activity; voltage-gated ion channel activity
-8,26	Gnas	GNAS complex locus	G-protein alpha-subunit binding; GTPase activity; signal transducer activity; insulin-like growth factor receptor binding; protein binding; GTP binding; protein domain specific binding; G-protein beta-subunit binding; G-protein beta/gamma-subunit complex binding; beta-2 adrenergic receptor binding; D1 dopamine receptor binding; mu-type opioid receptor binding; ionotropic glutamate receptor binding; alpha-tubulin binding; metal ion binding; corticotropin-releasing hormone receptor 1 binding; nucleotide binding; guanyl nucleotide binding

Tabla 4. Principales genes que intervienen en la ruta “Regulación por calcio de la célula cardíaca”.

por calcio. También aparecen receptores de membrana para neurotransmisores, como acetilcolina o epinefrina, y mecanismos de señalización intracelular acoplados a proteínas G. En la tabla 4 se resumen con más detalle los principales genes de ambas poblaciones celulares que intervienen en esta ruta, indicando una pequeña descripción de los mismos, así como un análisis de *Gene Ontology* (GO). Esta descripción del *Gene Ontology* es un sistema de clasificación mediante el cual los genes quedan agrupados en base a Funciones Moleculares (MF del inglés *Molecular Function*) que realizan, Procesos Biológicos (BP del inglés *Biological Process*) en los que intervienen, o Componente Celular (CC del inglés *Cellular Component*) al que pertenecen las proteínas correspondientes. En este caso hemos indicado en la tabla el GO de Función Molecular ya que nos aporta información valiosa acerca de las posibles funciones de todos estos genes, que tienen que ver por tanto con señalización por Calcio/Calmodulina, unión a ATP, señalización mediada por proteína G, canales iónicos, señalización por calcio y AMPc, actividad GTPasa, etc. Todas estas funciones moleculares aparecen muy relacionadas entre sí, y a la vez englobadas dentro de las características típicas de una célula excitable, como son las células cardíacas, las neuronas, o las propias células glómicas.

7.1.2. Ruta de señalización de Wnt y pluripotencia

En la figura 29 se representa la ruta denominada “*Wnt Signaling Pathway and Pluripotency*”, destacada por el programa TAC. Está descrito que en las células neuronales de la corteza cerebral, Wnt-Beta-catenina es una ruta de pluripotencia y diferenciación durante el desarrollo embrionario (Munji et al., 2011). En nuestro caso, genes de esta ruta se encuentran sobreexpresados en las dos poblaciones celulares en estudio. Como puede observarse en la tabla 5, algunos genes importantes y específicos de esta ruta se encuentran sobreexpresados en las células TH, incluidos el gen *Nkd1*, un factor transcripcional que regula la decisión entre diferenciación neuronal y morfogénesis o pluripotencia (ref *GeneCard*), y *Fzd5*, un receptor específico de esta ruta. Por otro lado, las células TH/HNK expresan altos niveles del gen *Myc*, perteneciente a esta ruta, que está descrito como importante para la

A

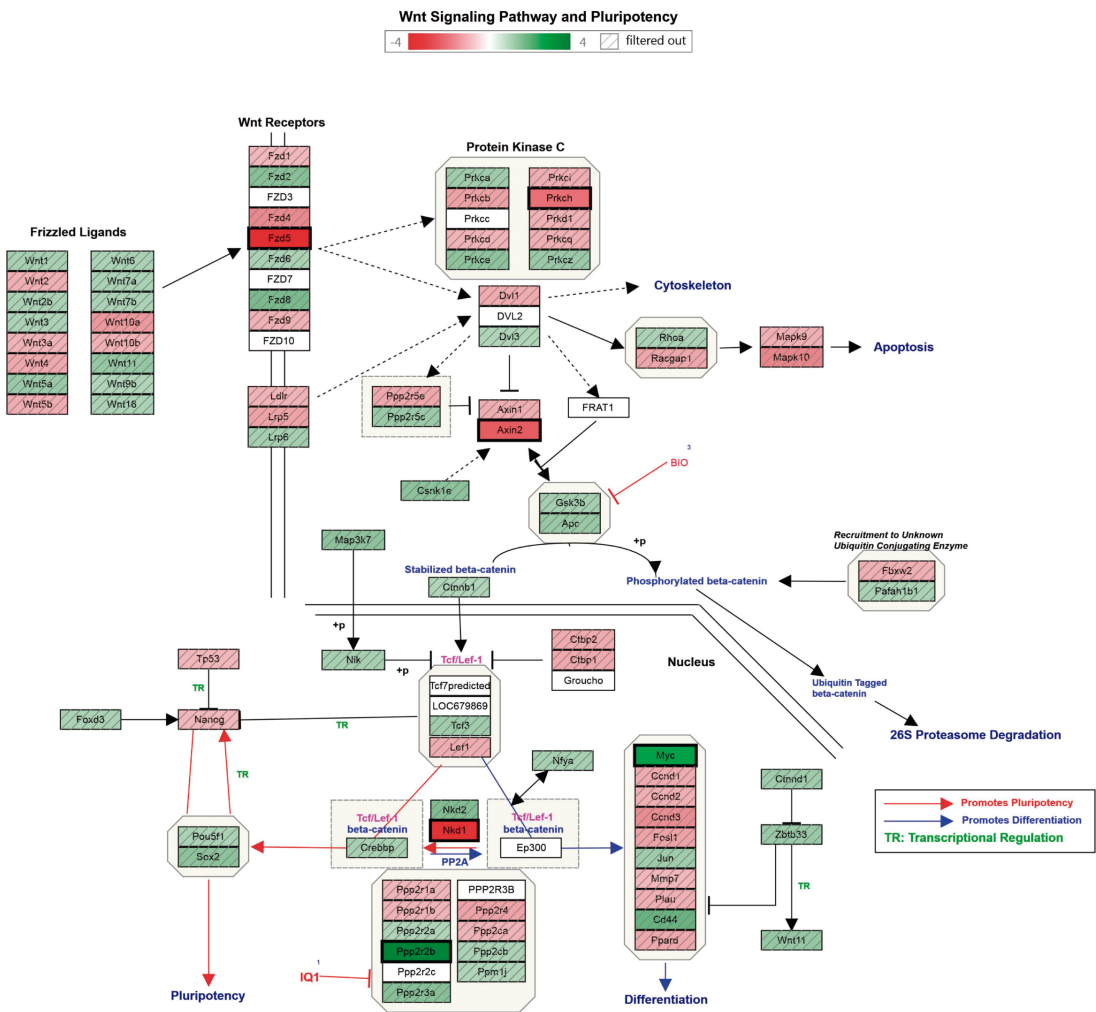


Figura 29. Ruta “Señalización por Wnt y pluripotencia”.

A) El programa TAC identifica varias rutas de señalización a través de Wnt. En este ejemplo se muestra una de ellas.

proliferación celular (Knoepfler et al., 2002). El resultado por tanto sugiere que esta ruta Wnt-Beta-catenina podría ser otro ejemplo más de señalización común entre ambos tipos celulares, en este caso en relación a la diferenciación neuronal.

7.2. Análisis de los datos mediante el software *Ingenuity Pathway Analysis*

El software de *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) constituye una herramienta muy potente para analizar los datos obtenidos en un *microarray* de expresión génica. Con este programa se puede obtener información sobre las

FOLD CHANGE	GENE SYMBOL	DESCRIPTION	GO Molecular Function Term
3,68	Ppp2r2b	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	protein binding; protein phosphatase type 2A regulator activity; protein complex binding
22,7	Myc	myelocytomatosis oncogene	RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding; transcription factor activity involved in positive regulation of transcription; DNA binding; transcription factor binding; protein complex binding; sequence-specific DNA binding; protein dimerization activity; repressing transcription factor binding; protein binding
-2,16	Prkch	protein kinase C, eta	protein serine/threonine kinase activity; calcium-independent protein kinase C activity; ATP binding; Ral GTPase binding; enzyme binding; metal ion binding; nucleotide binding
-2,52	Axin2	axin 2	signal transducer activity; GTPase activator activity; beta-catenin binding; enzyme binding; protein kinase binding; ubiquitin protein ligase binding; armadillo repeat domain binding; I-SMAD binding; protein binding
-3,63	Nkd1	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)	calcium ion binding; PDZ domain binding; protein binding
-4,52	Fzd5	frizzled class receptor 5	G-protein coupled receptor activity; Wnt-protein binding; protein kinase binding; PDZ domain binding; ubiquitin protein ligase binding; Wnt-activated receptor activity; signal transducer activity; transmembrane signaling receptor activity

Tabla 5. Principales genes que intervienen en la ruta “Señalización por Wnt y pluripotencia”.

principales rutas canónicas, genes reguladores de rutas, genes reguladores de procesos biológicos y enfermedades, redes de interacción entre moléculas y también entre rutas, y predicciones acerca de la activación o inactivación de prácticamente todas las interacciones descritas. Además, se puede hacer el análisis comparativo entre 2 o más poblaciones o muestras, así como ver los resultados de la comparación pero de manera individual, para averiguar rutas de señalización o regulación de cada población por separado, aunque siempre en relación a genes resaltados en comparación con la otra población. En este trabajo de tesis doctoral haremos una breve revisión de los resultados obtenidos de manera individual tanto en la población TH/HNK como en la población TH, y discutiremos posteriormente las diferencias y similitudes, centrándonos en las células TH/HNK, aunque mostrando en todo momento tan solo un resumen del potencial total de este tipo de análisis.

7.2.1. Canonical Pathways (Rutas Canónicas)

En la figura 30A se representan mediante un histograma las Rutas Canónicas más importantes representadas en la población TH/HNK, entre las que destaca en primer lugar la ruta de señalización mediada por AMPc. Esta molécula es un mensajero secundario muy importante para numerosos procesos biológicos, y está producido por la degradación del ATP mediante la enzima adenilato ciclasa (AC), cuya actividad está regulada por proteínas G activadoras ($G_{\alpha s}$) o inhibidoras ($G_{\alpha i}$). De hecho, las rutas de señalización mediada por proteínas G ocupan el segundo y tercer lugar en la lista de rutas canónicas más importantes para los neuroblastos del CC (Fig. 30A). La cuarta ruta de señalización según la significación corresponde a la ruta de CREB en neuronas, siendo CREB (*cAMP responsive element binding protein*) precisamente un regulador transcripcional de unión a AMPc, y cuyo tándem AMPc/CREB se ha descrito como fuertemente implicado en proliferación celular y supervivencia, así como en plasticidad sináptica. Parece que la activación de CREB lleva a procesos biológicos como excitación neuronal, formación de LTP (*Long-Term Memory*) y proliferación de células neuronales (fuente: *IPA Knowledge Database*), siendo este último punto una sugerencia a tener en cuenta en relación al papel de CREB en las células TH/HNK del CC.

En relación a las principales rutas canónicas representadas en las células maduras TH, en la figura 30B se pueden apreciar que las rutas identificadas para esta población son mucho más heterogéneas. Muchas de ellas están relacionadas con la señalización por calcio, o la producción de óxido nítrico (NO), y asociadas por tanto a funciones biológicas del sistema cardiovascular y del endotelio. Por otro lado, la producción de NO depende de la NOS (*Nitric Oxide Synthase*), cuya regulación transcripcional depende de factores muy variados entre los que se encuentran las citoquinas, que aparecen también muy representadas en varias de las rutas canónicas más significativas para las células glómicas (fuente: *IPA Knowledge Database*).

Mediante el programa IPA se puede realizar un análisis más profundo de cada una de estas rutas canónicas, desglosando la información acerca de qué

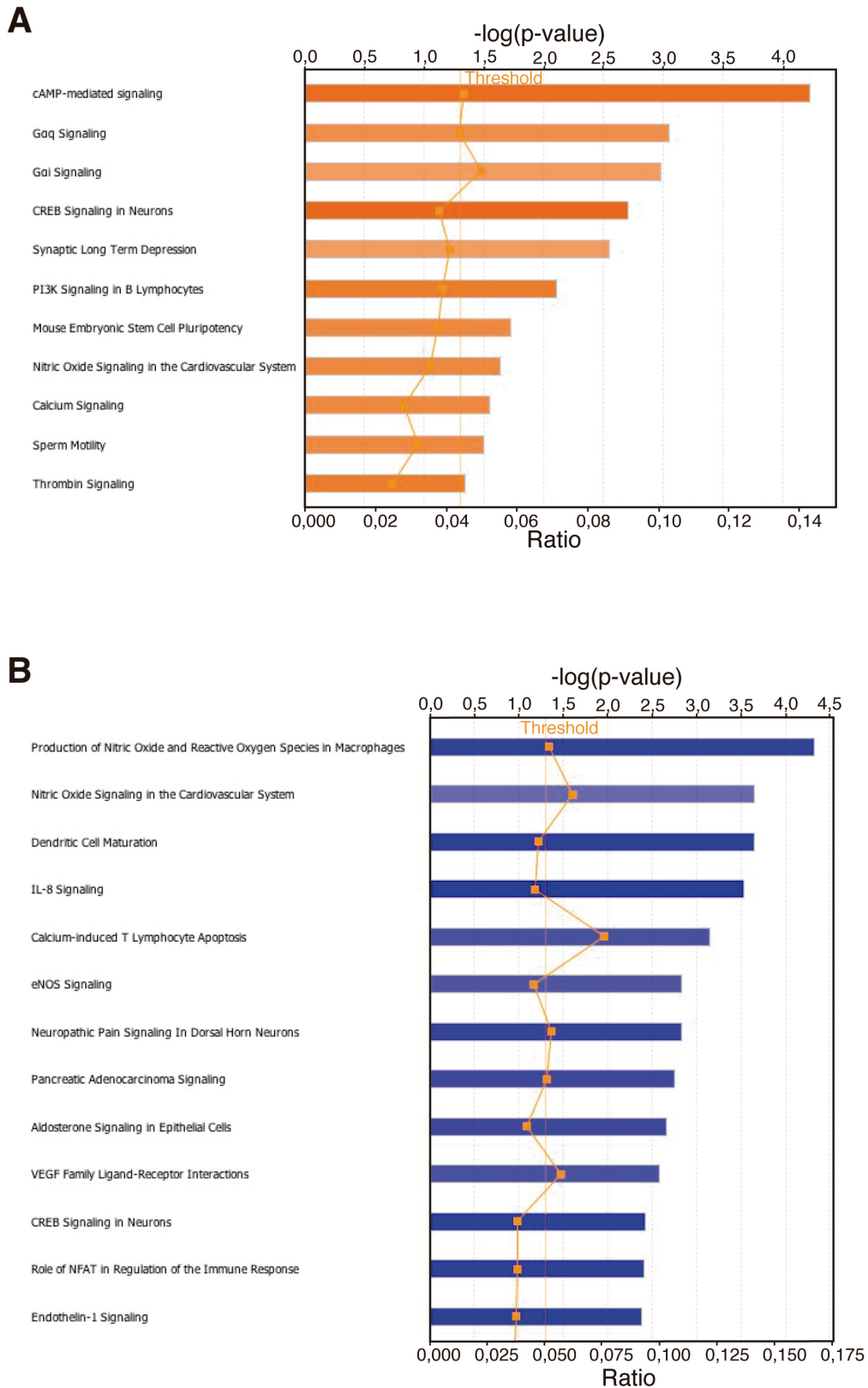


Figura 30. Identificación de rutas canónicas más significativas mediante el programa IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

A) Listado de rutas canónicas identificadas por el programa IPA como las más importantes en la población de neuroblastos. **B)** Listado de las principales rutas canónicas para la población de células glómicas, según el programa IPA.

genes la componen y si se predice que estén activados o inactivados, y obteniéndose también un esquema de la ruta canónica en cuestión. En la figura 31A se muestra un ejemplo de la ruta más significativa para las células TH/HNK, que como se ha mencionado anteriormente es “Señalización mediada por AMPc”, en la que se pueden apreciar en color verde las moléculas sobreexpresadas en esta población celular de manera más significativa. Nótese en la parte superior del esquema cómo las células TH/HNK destacan sobre todo por la expresión de multitud de receptores, tanto colinérgicos (CHRM; *CHolinergic Receptor Muscarinic*), como glutamatérgicos (GRM; *Glutamatergic Receptor Metabotropic*), GABAérgicos (GABBR; *GABAergic type B Receptor*), etc., que se asocian a proteínas G. Todos estos receptores activarían potencialmente esta ruta canónica del AMPc, que acabaría traduciendo en activación del regulador neuronal CREB anteriormente mencionado. En la figura 31B se muestra otro ejemplo de ruta canónica significativa para las células TH/HNK, en este caso la ruta de “Señalización de CREB en neuronas”, muy relacionada con la ruta descrita anteriormente pero más detallada y enfocada a poblaciones de células neuronales. Concretamente se describe un escenario de sinapsis glutamatérgica, que activa la ruta de señalización a través de Calcio/Calmodulina (CAMK, *Calcium/calModulin dependent protein Kinase*) y que produce una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de la proteína CREB. La activación de este factor pondría en marcha la maquinaria transcripcional de determinados genes, que tendría como consecuencia los procesos biológicos anteriormente descritos de proliferación de células neuronales, excitación neuronal, formación de LTP, etc. (fuente: *IPA Knowledge Database*).

7.2.2. Upstream Regulators

Otro tipo de información que se puede extraer con el programa IPA es el análisis de los *Upstream Regulators* o “reguladores aguas arriba”, que predice los reguladores transcripcionales que provocarían los cambios de expresión génica observados en una determinada población celular. En la tabla 6 se enumeran los 5 reguladores más significativos para las células TH/HNK y los 5 más significativos para las células TH, por orden de significación. En el caso de

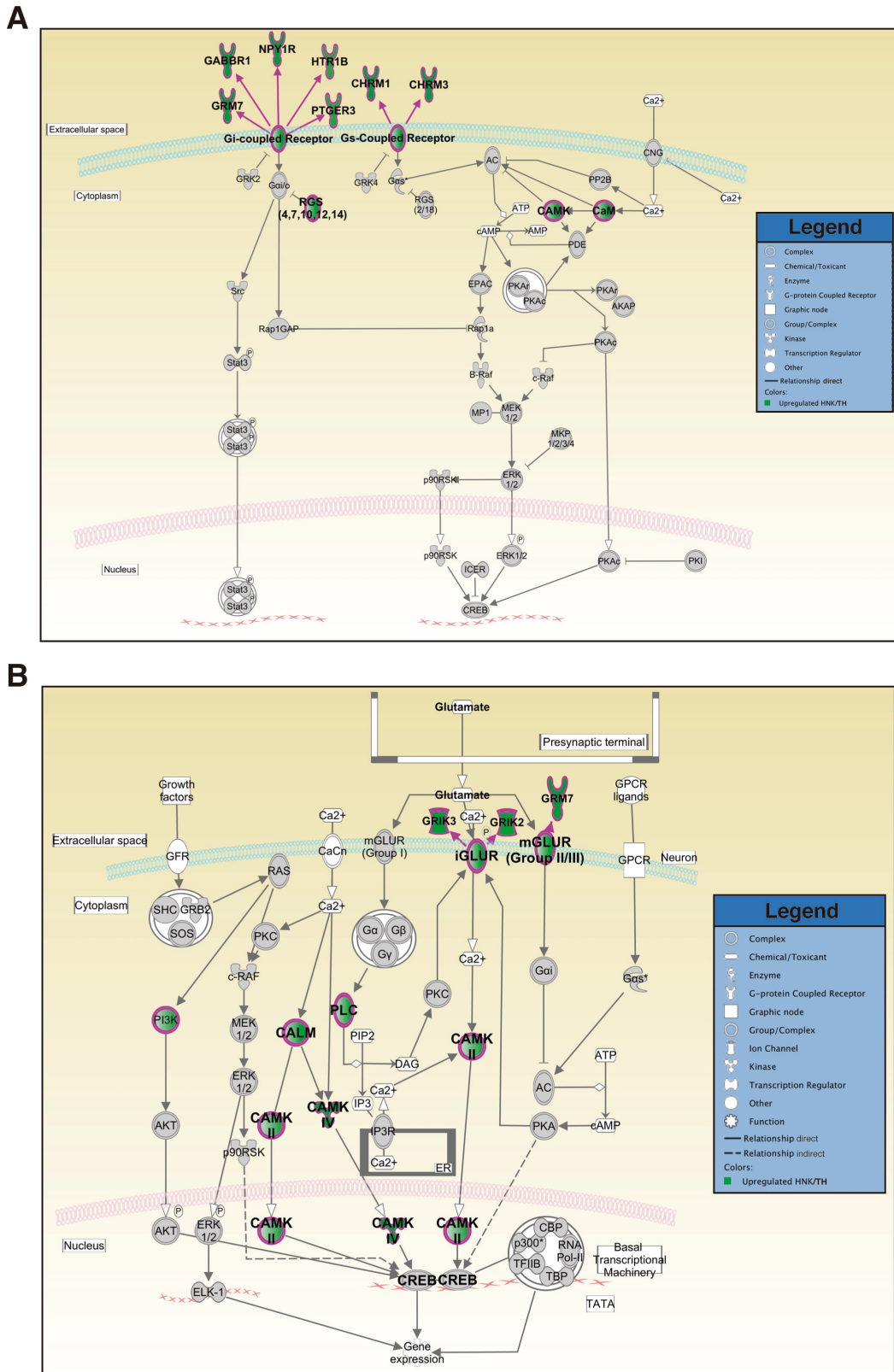


Figura 31. Ejemplos de las principales rutas canónicas identificadas en los neuroblastos del CC.

A) Representación gráfica de la ruta canónica denominada “Señalización mediada por AMPc”.
 B) Representación gráfica de la ruta canónica denominada “Señalización de CREB en neuronas”. Las proteínas coloreadas en verde aparecen expresadas en los neuroblastos.

las células TH/HNK encontramos en primer lugar el ya mencionado gen CREB1, que codifica para la proteína reguladora CREB, implicada en numerosas funciones neuronales. En segundo lugar se encuentra REST (*RE1 Silencing Transcription Factor*), que codifica para un factor de transcripción que reprime los genes neurales en tejidos no neurales. De hecho se trata de un silenciador neuronal que también se encuentra en progenitores neuronales indiferenciados (como es el caso de las células TH/HNK), y que se cree puede actuar como principal regulador negativo para la neurogénesis. En nuestro caso podría tratarse de un inhibidor de la maduración en los neuroblastos quiescentes. Otros reguladores de la lista mostrada en la tabla 6 son el PPP3CA (*Protein PhosPhatase 3 Catalitic subunit Alpha*), que interviene en la ruta de señalización de Calcio/Calmodulina, el NGF (*Nerve Growth Factor*) que codifica una factor trófico implicado en el crecimiento y diferenciación de células neuronales, y AGT (*AnGiotensinogen*), implicado en la regulación de la tensión sanguínea (fuente: *IPA Knowledge Database*). Este último puede haber aparecido por la expresión de genes relacionados con la señalización por NO.

En el caso de los principales reguladores que aparecen como significativos para las células maduras TH (tabla 6), la lista incluye en primer lugar al TNF (*Tumor Necrosis Factor*), que codifica una proteína proinflamatoria implicada en procesos biológicos tan variados como diferenciación, proliferación, apoptosis, metabolismo de lípidos y coagulación. En segundo lugar se encuentra el *Rosiglitazone*, un derivado piridínico implicado también en multitud de procesos biológicos distintos. La lista también incluye el EGR1 (*Early Growth Response 1*), factor de transcripción necesario para la diferenciación y la mitogénesis, el Beta-estradiol, implicado en la biosíntesis de estrógenos, y por último el APP (*Amiloid beta Precusor Protein*), que codifica una proteína que tras la acción de la enzima secretasa forma la proteína beta-amiloide, relacionada con la formación de placas de amiloide en patologías como el Alzheimer (fuente: *IPA Knowledge Database*).

TOP UPSTREAM REGULATORS HNK	TOP UPSTREAM REGULATORS TH
CREB1	TNF
REST	rosiglitazone
PPP3CA	EGR1
NGF	beta-estradiol
AGT	APP

TOP MOLECULAR AND CELLULAR FUNCTIONS HNK	TOP MOLECULAR AND CELLULAR FUNCTIONS TH
Cellular Development	Cell Death and Survival
Cellular Growth and Proliferation	Molecular Transport
Cellular Assembly and Organization	Lipid Metabolism
Cellular Function and Maintenance	Small Molecule Biochemistry
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	Cellular Movement

TOP NETWORKS HNK	TOP NETWORKS TH
Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Cellular Movement	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Immunological Disease
Molecular Transport, Nervous System Development and Function, Hereditary Disorder	Post-Translational Modification, Cancer, Hematological Disease
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Cellular Movement	Antigen Presentation, Inflammatory Response, Cell-To-Cell Signaling and Interaction
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Tumor Morphology	Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Molecular Transport
Behavior, Neurological Disease, Psychological Disorders	Cellular Assembly and Organization, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation

Tabla 6. Resumen de los principales reguladores, funciones celulares y moleculares, y *networks*, para los neuroblastos y células glómicas, según el programa IPA.

7.2.3. Molecular and Cellular Functions

El programa IPA ofrece la posibilidad de estudiar las “Funciones Moleculares y Celulares”, agrupando los genes más importantes para cada

población y clasificándolos según las Biofunciones en las que estén implicados. La clasificación obtenida se muestra por orden de significación en la tabla 7, destacando las funciones relacionadas con desarrollo y proliferación siempre en las células TH/HNK, y las funciones de transporte de moléculas y metabolismo en las células TH.

7.2.4. Networks

Las redes de interacción más significativas se encuentran en la tabla 8. IPA las construye haciendo predicciones de interacciones entre genes, siendo muy variables en ambos casos, aunque más neuronales y proliferativas en la población HNK inmadura, y más metabólicas y de respuesta inmune en la población TH madura.

7.2.5. Regulator effects

Para terminar este análisis con el programa IPA se quiso utilizar una herramienta muy interesante llamada “*Regulator effects*”. Con ella el programa modela, de manera automática, interacciones entre distintas rutas que podrían estar relacionadas, porque se presume que comparten expresión diferencial de genes, o reguladores, o porque estén implicadas en los mismos procesos biológicos. Además, también se predice el comportamiento que tendrán tanto los genes como los reguladores que se encuentran aguas arriba, y los efectos que todo esto tendrá sobre los procesos biológicos que se encuentran aguas abajo. Hay que tener en cuenta que estos modelos de interacción son teóricos, y se basan en la medida del *Z-score* (ver Materiales y Métodos) para calcular si cada gen está sobreexpresado (activado en las TH/HNK, coloreado en verde) o regulado a la baja (activado en las células TH, coloreado en rojo). Por otro lado, las flechas que unen las moléculas se basan en datos obtenidos de referencias bibliográficas para predecir la influencia de un gen sobre otro, es decir, si estará teniendo una acción activadora (punta de flecha) o inhibidora (barra transversal), y si se predice que esa interacción esté activada (en naranja), o inhibida (en azul). También puede no tener ninguna acción contrastada (línea en gris), o una acción poco congruente o inconsistente con lo descrito en la literatura (línea en amarillo). A continuación se comentarán

someramente algunos de los diseños de *Regulator effects* obtenidos para cada población. En la Figura 32A se puede ver un diseño de red propuesto para la población TH/HNK, en el que dos moléculas reguladoras, BMP4 e Insulina, ejercen un efecto activador sobre una batería de genes que se encuentran sobreexpresados en la población TH/HNK (la línea discontinua indica que esta acción es indirecta, es decir, con moléculas intermedias). Todos estos genes, varios de ellos típicamente expresados en células neuronales, tienen una acción activadora sobre las funciones biológicas que se encuentran aguas abajo, y además se predice que la mayoría de las rutas estén activas en la población TH/HNK, por lo que las Biofunciones llamadas “Tamaño del cuerpo” (*Size of body*), “Cantidad de células” (*Quantity of cells*), y “Diferenciación celular” (*Differentiation of cells*), se predice que estarán activas en los neuroblastos del cuerpo carotídeo. El resultado tiene sentido pues todas estas biofunciones están asociadas a las dos propiedades básicas de estas células, la proliferación y la diferenciación.

Otra red de Efectos reguladores propuesta por el programa en las células TH/HNK es la que se muestra en la figura 32B, en la que se aprecian interacciones más variadas que en el anterior ejemplo. Aguas arriba hay 4 reguladores, la mayoría de ellos con funciones de proliferación, diferenciación y factores de crecimiento, que ejercen un efecto activador (puntas de flecha) sobre los genes que tienen aguas abajo, y además (excepto en el caso del APP) todas esas rutas están activadas. Este conjunto de genes se encuentran todos sobreexpresados en la población TH/HNK. Muchos de ellos son neurales, receptores, moléculas de adhesión y de migración, y están implicados en procesos biológicos como “Pérdida de neuronas” (*Loss of neurons*), “Crecimiento de dendritas” (*Growth of dendrites*), y “Elongación de protrusiones celulares” (*Elongation of celular protusions*). En el caso del crecimiento de dendritas y la elongación de protrusiones, son funciones de tipo neuronal y típicas en neuronas inmaduras, y muy relacionadas entre si. La influencia de estos genes suele ser activadora de estas biofunciones (punta de flecha), y además son rutas que se encuentran activas en estas células (líneas de color naranja). Sin embargo, en el caso de la Biofunción de “Pérdida de neuronas”, estos genes tienen una acción inhibitoria sobre esa función (barra

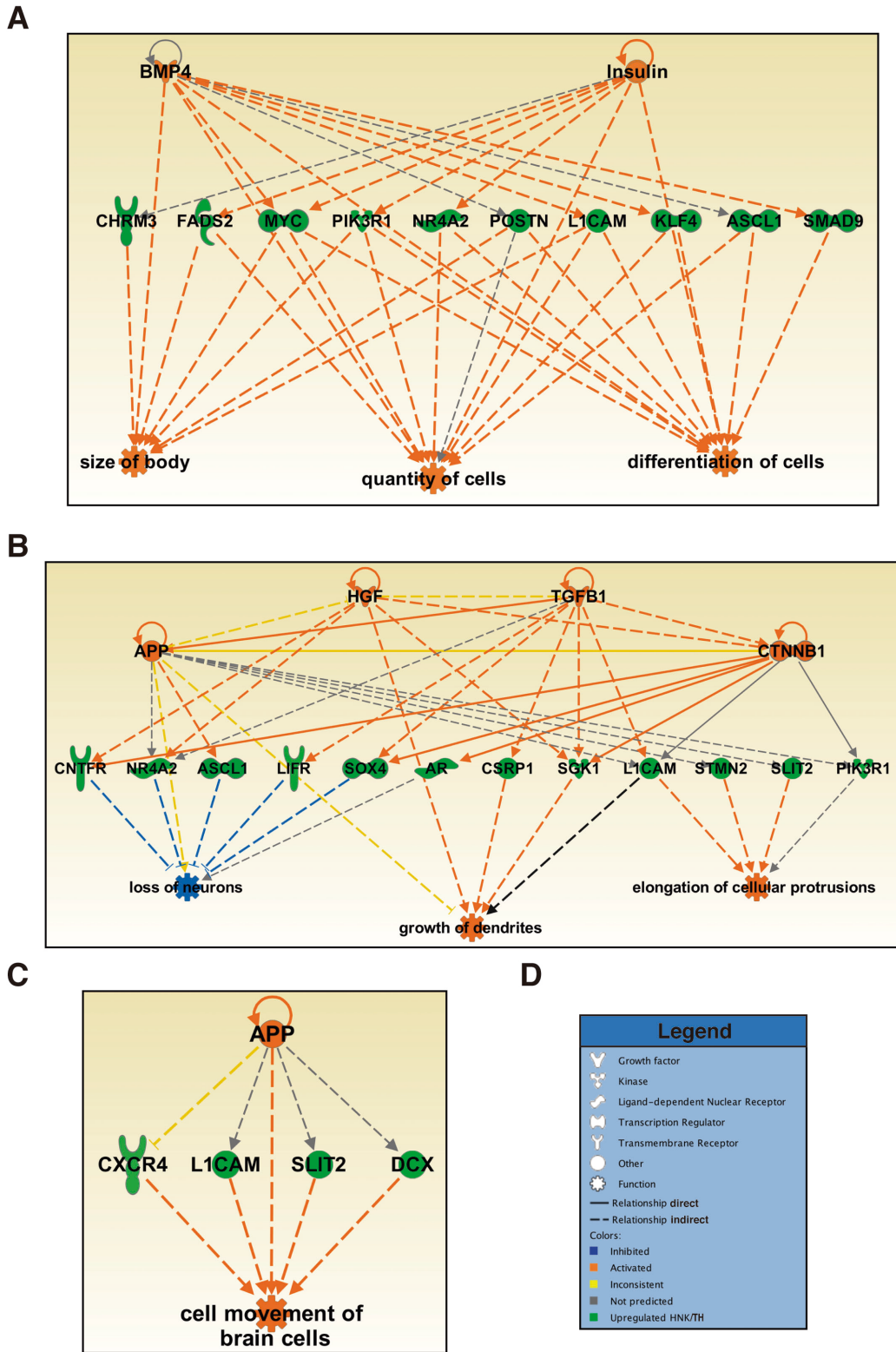


Figura 32. Ejemplos de rutas diseñadas mediante la función “Regulator effects” en la población de neuroblastos.

En **A**), **B**) y **C**) se muestran tres de los principales diseños propuestos por el programa IPA, que se adaptan a la expresión génica de los neuroblastos, e hipotetizan acerca de las funciones biológicas en las que podrían estar implicados estos genes. **D**) Leyenda explicativa de los diseños propuestos.

transversal), pero la ruta está inhibida en las TH/HNK (color azul), lo que se traduciría en que los neuroblastos del CC tendrían la maquinaria de inhibición de la apoptosis, aunque el programa predice que esta maquinaria está inhibida como ocurre en los neuroblastos de otros nichos (fuente: IPA Knowledge Database).

El último modelo que se mostrará para la población TH/HNK se encuentra en la figura 32C. Se trata de un modelo más simple que los anteriores, donde un único regulador *upstream*, el receptor de membrana APP descrito anteriormente, ejerce un efecto activador sobre 4 genes sobreexpresados en la población TH/HNK, aunque no se predice si las rutas están activadas o inhibidas (líneas mayoritariamente en gris). Estos genes, que están relacionados siempre con neuroblastos, señalización y quimiotaxis, están activando la Biofunción denominada “Movimiento de las células del cerebro” (*Cell movement of brain cells*). Además, el programa predice que esta función biológica esté activa en las células TH/HNK del CC, por lo que una vez más, esta predicción sugiere que los neuroblastos del CC tienen en el movimiento celular y la migración una de sus propiedades esenciales. Este tema del movimiento celular, como muchos otros señalados por el análisis de *microarray*, podrán ser objeto de estudio en investigaciones futuras.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Presencia de neuroblastos quiescentes en el CC adulto

El CC se conoce desde hace mucho tiempo por su función quimiorreceptora, pero sólo en la última década se ha caracterizado su funcionamiento como nicho neurogénico del SNP adulto. En respuesta a un estímulo hipóxico mantenido, el parénquima del CC inicia un proceso de neurogénesis desde célula madre hasta neurona diferenciada (Annese et al., 2017; Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014). Este proceso de neurogénesis a partir de células madre multipotentes se completa en aproximadamente unos 7 días (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014), y va acompañado de un aumento no sólo del número de células neuronales sino también del volumen del órgano. Este aumento de tamaño en respuesta a hipoxia crónica está descrito en estudios clásicos de hace décadas (Arias-Stella and Valcarcel, 1976; McGregor et al., 1984), cuando aún no se conocía la existencia del nicho germinal, por lo que no existía una explicación celular a este fenómeno. Posteriormente, la caracterización de las CBSCs por parte de nuestro grupo ofreció una explicación, al menos parcial, desde el punto de vista celular. Sin embargo, quedaba un fenómeno, descrito clásicamente, que continuaba sin una explicación clara: la presencia de células TH positivas en ciclo celular en el CC hipóxico, muchas de ellas detectadas ya desde los primeros días de hipoxia (Chen et al., 2007; Paciga et al., 1999; Wang et al., 2008). Los autores de estos trabajos interpretaron que las células glómicas tenían la capacidad de dividirse, una característica que sería insólita para una célula neuronal madura. Los datos recogidos en esta tesis doctoral aportan una explicación factible a este fenómeno. La presencia en el nicho de una población de neuroblastos, que expresan marcadores de células glómicas como la TH, pero también poseen características de inmadurez como su capacidad proliferativa, aceleraría el proceso neurogénico. En condiciones basales, estos neuroblastos permanecen en estado quiescente, pero en respuesta al estímulo hipóxico esta población de células activa masivamente su proliferación, para seguidamente completar su maduración terminal hacia

célula glómica. Este proceso de generación de nuevas células glómicas a partir de neuroblastos parece ocurrir de una forma rápida y paralela al progreso de la neurogénesis a partir de células madre.

Nuestras conclusiones se ven apoyadas también por varios estudios clásicos de microscopía electrónica en el CC, en los que se definen dos tipos distintos de células glómicas (Chen and Yates, 1984; Hellström, 1975; McDonald and Mitchell, 1975), las células tipo A y las tipo B (Fig. 33). Estos trabajos describen cómo uno de estos tipos celulares es más pequeño y con menos vesículas que el otro, y también posee menos mitocondrias e incluso un menor volumen nuclear. Los citados trabajos también estudian la localización diferencial de ambos tipos celulares en el glomérulo, e incluso su diferente sinaptología, ya que un tipo celular muestra sinapsis con los nervios aferentes y el otro no. Todos estos datos son consistentes con nuestra caracterización morfológica, ultraestructural y funcional de dos tipos de células TH+ en el CC adulto, y por tanto nos inducen a pensar que las células identificadas como tipo B serían los neuroblastos del CC, mientras que las tipo A serían las células glómicas maduras.

La caracterización de este nuevo tipo celular de neurona inmadura en el CC, con capacidad rápida de proliferación y maduración en respuesta al estímulo hipóxico, también permite una mejor comprensión de la adaptación fisiológica del CC durante la hipoxia crónica. El crecimiento adaptativo del órgano en respuesta al estímulo hipóxico crónico tiene lugar de forma más rápida y eficiente probablemente gracias a la presencia de estos neuroblastos inmaduros, que se dividen una o quizás dos veces, y posteriormente maduran hasta célula glómica funcional.

Una cuestión que podría resolverse gracias al estudio de estos neuroblastos inmaduros, sería el mecanismo celular que subyace al proceso de vuelta a la normoxia. En esta vuelta a las condiciones basales, el órgano recupera su tamaño y número de células glómicas original, y se sabe que aproximadamente el 50% de las células glómicas han sido reemplazadas por células nuevas, en el transcurso del estímulo hipóxico (Pardal et al., 2007).

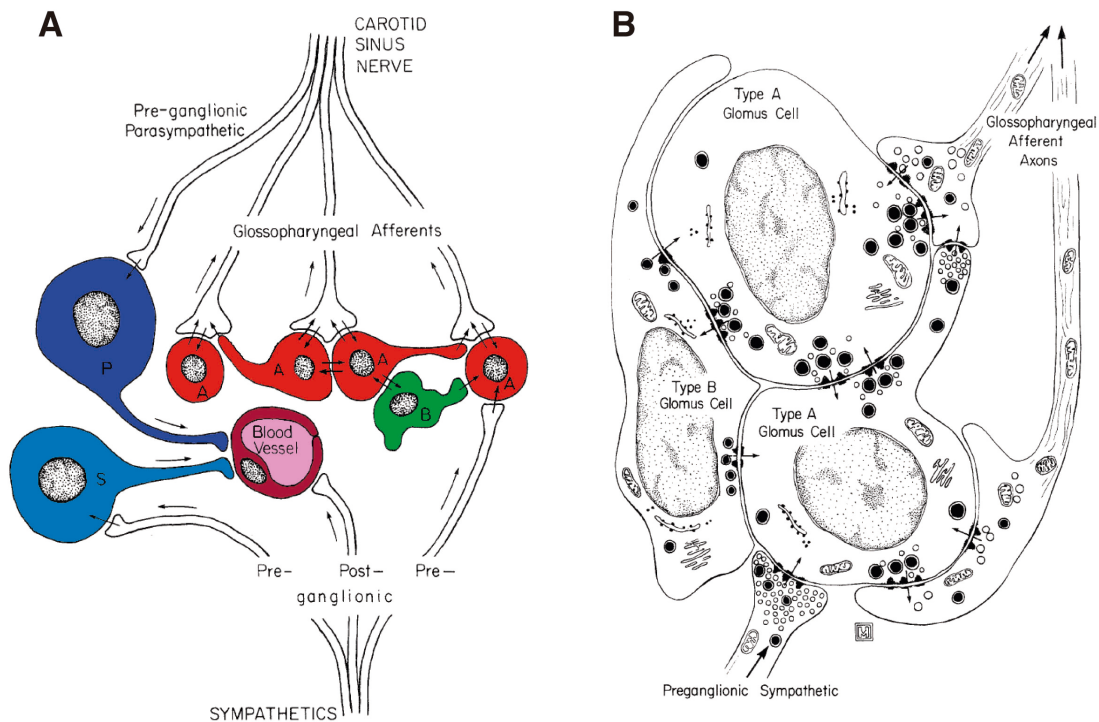


Figura 33. Modelo clásico de los dos tipos de células glómicas propuesto en el CC.

Modelos propuestos por D. McDonald y R. Mitchell en 1975, para explicar los dos tipos de células glómicas (células A y células B) descritas en el CC de rata adulta. **A)** Dibujo coloreado que muestra las interacciones entre los distintos tipos celulares del CC, y la inervación del órgano. (P, neuronas parasimpáticas; S, neuronas simpáticas) **B)** Dibujo original que muestra un glomérulo del CC de rata, donde se aprecia la diferente morfología de los dos tipos de células glómicas descritos. Nótese en la célula tipo B el menor tamaño, menor número de vesículas y de mitocondrias, y las prolongaciones del citoplasma que abrazan a las células tipo A, características identificadas en este trabajo de tesis doctoral en los neuroblastos del CC. Modificado de McDonald and Mitchell, 1975.

Tenemos indicios, como se ha reflejado en los Resultados de esta tesis doctoral, de cierta capacidad de las células glómicas para revertir el fenotipo maduro y volver al fenotipo inmaduro (HNK-1+) al desaparecer el estímulo. De esta forma podría recuperarse, al menos parcialmente, la población de neuroblastos quiescentes en el órgano. Desconocemos si las células madre multipotentes del órgano contribuyen a la recuperación de la población de neuroblastos quiescentes durante la vuelta a la normoxia, aunque sospechamos que podría ser así puesto que, como se ha mostrado en los ensayos de neuroesferas, parece que las CBSCs son capaces de generar neuroesferas que contienen neuroblastos. Serán necesarios estudios adicionales para poder elaborar una hipótesis sólida acerca del mecanismo

celular de la recuperación del parénquima neurosecretor del CC tras la desaparición del estímulo hipóxico.

2. Los neuroblastos del CC se identifican y aíslan gracias al antígeno de membrana HNK-1

El antígeno de membrana HNK-1 es un glicoeptopo de la membrana celular que suele ir unido a glicoproteínas de membrana como laminina, NCAM o Tenascina-C. HNK-1 se ha descrito como un marcador de progenitores neurales durante el desarrollo embrionario (Yagi et al., 2010; Yanagisawa and Yu, 2007), y se le ha implicado incluso en el mantenimiento de esas células madre neurales en el cerebro embrionario. Pero también ha sido muy estudiado y utilizado como marcador de células de la cresta neural durante el desarrollo de esta estructura en la mayoría de las especies de aves y mamíferos, incluida la especie humana (Huang et al., 2016; Kerosuo et al., 2015; Tucker et al., 1988). El papel funcional de HNK-1 en las células de la cresta neural está relacionado con el movimiento, el guiado y la adhesión de estas células durante su migración hasta los órganos diana (Bronner-Fraser, 1987; Nagase et al., 2003).

El CC se ha descrito como órgano diana de las células de la cresta neural, formándose a partir de progenitores de la cresta neural provenientes del GCS, que invaden el primordio del CC durante el desarrollo embrionario (Le Douarin et al., 1972; Kameda, 2014; Kameda et al., 1994). Está descrito que estos progenitores de las células glómicas están marcados por el antígeno HNK-1, entre otros marcadores neurales (Le Douarin et al., 1972; Kameda et al., 1994), por lo que podrían ser células muy similares a los neuroblastos que describimos en este trabajo. Curiosamente, en el caso del ratón, este antígeno se encuentra ausente, tanto en las células embrionarias que forman el CC, como en la cresta neural en su totalidad (Huang et al., 2016; Kameda, 2014). De forma consistente, en nuestro caso tampoco encontramos una población de neuroblastos HNK-1+ en el CC de ratón adulto. Es difícil concluir si esta especie no tiene neuroblastos, o los tiene pero no expresan este marcador de

membrana. La ausencia de neuroblastos en este modelo animal explicaría las diferencias observadas en la velocidad de crecimiento del CC en hipoxia crónica entre el ratón y la rata (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014). El marcador HNK-1 sí está descrito en la cresta neural humana, motivo por el que hemos intentado confirmar la presencia de células HNK-1 positivas en el CC de humano adulto. Las dificultades técnicas han impedido que podamos mostrar un resultado claro a este respecto, a pesar de que se intuye la presencia del antígeno, por lo que necesitaríamos realizar otro tipo de estudios para determinar si nuestros resultados con el CC de rata podrían ser extrapolables a los seres humanos.

En el trabajo original de nuestro grupo sobre el nicho neurogénico del CC (Pardal et al., 2007), se intentó utilizar el antígeno HNK-1 para aislar prospectivamente a las células madre del órgano, ya que se trataba de un marcador típico de células madre de la cresta neural durante el desarrollo. Rápidamente se comprobó, al separar las células con niveles altos de expresión de HNK-1 (HNK *high*), que expresaban en su mayoría el marcador TH propio de las células glómicas, por lo que se pensó que era una subpoblación de células dopaminérgicas (Pardal et al., 2007). En el presente trabajo de tesis doctoral se aportan datos que resuelven la caracterización de estas células HNK-1 *high*, indicando que efectivamente son una población de células TH+ pero inmaduras. Estas células presentan características tanto de células glómicas como de células progenitoras, lo que les confiere una identidad típica de neuroblastos, similares a los de otros sistemas (Lim and Alvarez-buylla, 2016). El origen de estos neuroblastos del CC es muy posiblemente las células progenitoras HNK-1+ de la cresta neural, conservándose el marcador HNK-1 en los blastos, un marcador que, como hemos descrito en este trabajo, acabará perdiéndose durante el proceso de maduración y diferenciación. Los datos aportados por el análisis de *microarray* confirman que efectivamente los neuroblastos del CC expresan genes típicos de neuroblastos, como por ejemplo reguladores de la neurogénesis y del desarrollo neural como CREB1 y REST. También se deriva del *microarray* que estas células tienen rutas activadas típicas de neuroblastos, como la señalización por calcio/calmodulina, y que expresan marcadores típicos de

neuroblastos proliferativos como la DCX, ambas características típicas de neuroblastos de la SGZ (Beckervordersandforth et al., 2015).

Algunas de las moléculas señaladas por el *microarray*, sobreexpresadas en la población neuroblástica, tienen funciones de migración, señalización y adhesión celular, como L1CAM, SLIT2, NCAM, etc., y se considera que podrían estar implicadas en Biofunciones como “Movimiento de células del cerebro”. Por otro lado, el antígeno HNK-1 también se cree que es importante para la migración de las células madre de la cresta neural, así como para la adhesión al sustrato diana (Bronner-Fraser, 1987; Nagase et al., 2003). Además, en los estudios morfométricos clásicos del CC, mencionados anteriormente, se distinguían dos tipos de células glómicas, A y B, y se localizaba siempre a las células B (presumiblemente los neuroblastos) en la periferia de los glomérulos, rodeando a las células tipo A (Chen and Yates, 1984). Esta posición periférica típica de los neuroblastos en los glomérulos la hemos sugerido igualmente en el presente trabajo tras el análisis de la ultraestructura por Microscopía Electrónica. En conjunto, todos estos datos nos inducen a pensar que posiblemente el neuroblasto HNK-1+ podría conservar aún cierta capacidad migratoria, que facilitaría la formación de nuevos glomérulos durante el crecimiento del órgano en hipoxia crónica. Esta hipótesis necesitará ser contrastada con estudios de movilidad celular, para poder elaborar una teoría con fundamento sólido y poder estudiar el mecanismo molecular implicado.

Otra cuestión que se ha abordado en este trabajo con respecto al marcador HNK-1, aunque de manera preliminar, ha sido el estudio de la naturaleza de otras células HNK-1+ presentes en el nicho del CC adulto. Hemos dividido la población de células positivas en dos: las que expresan altos niveles del marcador (HNK H), y que sabemos es una población enriquecida en neuroblastos, y las que lo expresan a niveles bajos (HNK L), aunque esta población sabemos que es una mezcla de tipos celulares distintos. En ensayos de diferenciación *in vitro* hemos observado una mayor potencialidad en las células HNK L con respecto a las HNK H, o incluso en comparación con las células negativas para el marcador HNK-1. Este resultado nos induce a pensar que esta población que expresa bajos niveles de HNK-1 podría ser aún más

precursora que los neuroblastos, tal vez podría contener a la población de progenitores intermedios e incluso a las células madre multipotentes del nicho, aunque sería necesario un estudio más detallado para corroborar esta conclusión. La posible expresión de bajos niveles del marcador HNK-1 por parte de las células madre del CC (células tipo II) explicaría las dificultades encontradas anteriormente en el grupo para utilizar este marcador en la separación prospectiva de las CBSCs (Pardal et al., 2007).

3. La principal diferencia funcional entre los neuroblastos y las células glómicas del CC es la capacidad para detectar el estímulo hipóxico

Uno de los aspectos principales que distinguen a las células glómicas del CC es su enorme capacidad para detectar variaciones en los niveles de oxígeno en el medio de manera continuada. Esta característica las distingue incluso en comparación con otros derivados del mismo linaje simpatoadrenal, como las células cromafines de la médula adrenal adulta, que son mucho menos sensibles al estímulo hipóxico (López-Barneo et al., 2016c; Weir et al., 2005). En el caso de los neuroblastos del CC, resulta interesante su capacidad para responder a estímulos como alto potasio o baja glucosa, sin embargo no poseen la capacidad de responder al estímulo hipóxico, lo que sugiere que el mecanismo sensor del oxígeno es totalmente independiente de otros mecanismos quimiotransductores. Recientemente se ha publicado que el mecanismo sensor de hipoxia de las células glómicas reside en el complejo I mitocondrial (Fernández-Agüera et al., 2015). Los neuroblastos del CC por tanto constituirían un interesante modelo para estudiar la maduración del mecanismo sensor de hipoxia, la evolución de las mitocondrias desde insensibles hasta sensibles a hipoxia, así como la señalización que provoca estos cambios.

4. Factores que regulan la neurogénesis a partir de neuroblastos

Una de las principales características que hemos descrito en los neuroblastos del CC es su rápida activación proliferativa, seguida de una también rápida maduración. En un periodo de 1 a 3 días bajo el estímulo hipóxico se completa el proceso mediante el cual se producen neuronas glómicas maduras y plenamente funcionales a partir de los neuroblastos quiescentes del nicho. Esta “neurogénesis rápida” se produce en paralelo a la neurogénesis a partir de células madre o “neurogénesis lenta”, anteriormente descrita en el CC. La “neurogénesis lenta” tendría lugar de forma muy similar a la neurogénesis de otros nichos, comenzando con la salida de quiescencia de la célula madre, y requiriendo unos 7 a 10 días para completar la formación de neuronas plenamente maduras (Pardal et al., 2007; Platero-Luengo et al., 2014). Los neuroblastos de la SVZ tardan varios días o semanas en realizar la migración rostro-caudal y completar su maduración en el bulbo olfatorio (Lim and Alvarez-buylla, 2016), mientras que los de la SGZ requieren también semanas para completar el proceso de maduración (Beckervordersandforth et al., 2015). La doble velocidad de neurogénesis descrita en el CC, gracias a la existencia de esta población de neuroblastos prediferenciados quiescentes, no tiene descrito paralelismo en otros nichos neurogénicos de mamíferos adultos, y tiene el efecto de incrementar de manera muy relevante la velocidad y eficiencia de producción de nuevas neuronas en respuesta a un estímulo. Tiene sentido evolutivo que la respuesta fisiológica del organismo a la falta de oxígeno haya seleccionado un mecanismo de neurogénesis más sencillo y rápido que otras funciones del sistema nervioso como la memoria, el aprendizaje, o la plasticidad olfativa.

Uno de los factores que podría estar regulando la actividad de los neuroblastos del CC es la propia hipoxia, una variable con efectos muy diversos en otros nichos neurales descritos. Se sabe que la tensión de oxígeno en el cerebro es muy variable dependiendo del organismo y del nicho estudiado. En unos casos se ha descrito que una condición hipóxica del nicho

puede suponer un mecanismo de mantenimiento de la quiescencia y del estado indiferenciado (Mohyeldin et al., 2010), mientras que en otros sistemas la hipoxia promueve la proliferación (Panchision, 2009). Es más, en algunos casos, como en la SVZ, se ha demostrado que un estímulo hipóxico sistémico no afecta drásticamente ni a células madre ni a progenitores intermedios (D'Anglemont de Tassigny et al., 2015; Hameed et al., 2015). En NCSCs del sistema nervioso autónomo de rata se ha demostrado que la baja tensión de oxígeno promueve la diferenciación dopaminérgica (Morrison et al., 2000), mientras que en NCSCs del folículo piloso de los bigotes de rata tiene un efecto de aumento de la proliferación (Chen et al., 2016). En cualquier caso, en el CC la situación es muy especial dado que la concentración de oxígeno en situación basal es mucho más alta que en los nichos centrales, y el estímulo hipóxico es más sutil que en esos otros nichos. Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que la hipoxia crónica *per se* no ejerce un efecto proliferativo sobre las células madre multipotentes (Platero-Luengo et al., 2014), pero sí tiene un efecto claro de proliferación y diferenciación sobre progenitores restringidos hacia linaje mesectodérmico presentes en el nicho (Annese et al., 2017; Navarro-Guerrero et al., 2016). En el caso de los neuroblastos, nuestros datos indican que la hipoxia por sí sola puede inducir proliferación, seguida siempre de una rápida y completa maduración que confiere a las células todas las características de células glómicas funcionales. Estos resultados, que se han observado tanto *in vivo* en el animal completo como *in vitro* en células aisladas, indican que debe existir un mecanismo intrínseco, probablemente dependiente de los factores de respuesta a hipoxia HIFs, que desarrolle todo el proceso de proliferación y diferenciación a nivel de célula aislada. En el CC se ha descrito que las células glómicas y las sustentaculares expresan la isoforma Hif1- α , pero sólo las células glómicas contienen la isoforma Hif2- α (Prabhakar and Semenza, 2015). Estudios recientes han demostrado varios aspectos importantes para la comprensión de la regulación del nicho del CC por HIFs: por un lado se sabe que es el tándem Hif2- α /PHD2 el que podría estar implicado en la regulación de la respuesta ventilatoria del CC así como de la proliferación celular del órgano (Bishop et al., 2013; Hodson et al., 2016). Por otro lado se ha descrito muy recientemente en nuestro grupo que la

diferenciación hacia endotelio de las CBSCs depende de regulación por Hif2- α y EPO (Annese et al., 2017). Otro dato interesante que se ha demostrado es que las proteínas VHL son necesarias para la supervivencia de las células glómicas, aunque este sistema parece no estar regulado por HIF (Macias et al., 2014). En resumen, los datos de la literatura apuntan a que el sistema HIF/PHDs es importante para algunos aspectos del funcionamiento del nicho germinal del CC, lo que nos permite hipotetizar que probablemente Hif2- α esté implicado en la respuesta directa a la hipoxia de los neuroblastos del órgano. Esta hipótesis por supuesto tendrá que ser contrastada con experimentación futura.

Por otro lado sabemos, gracias a experimentos como los de inyección sistémica de cadmio, que en el contexto del órgano completo la acción paracrina de las células glómicas maduras es esencial para el proceso de activación neuroblástica. En este trabajo de tesis doctoral se describe un posible mecanismo que mediaría en la proliferación y maduración de los neuroblastos del CC, a través de ATP y acetilcolina, ambas moléculas liberadas por las células glómicas. Si bien es cierto que estos datos sólo se han podido mostrar *in vitro*, existen varias publicaciones caracterizando estas rutas de señalización purinérgicas y colinérgicas como importantes para otras funciones del CC: la sinapsis quimiotransductora o la comunicación con otras células del nicho (Murali and Nurse, 2015; Nurse, 2014; Prasad et al., 2001; Zhang et al., 2012). Serán necesarios más experimentos para determinar el verdadero alcance de esta señalización en la regulación de la proliferación y maduración de los neuroblastos presentes en el nicho neurogénico del CC.

El análisis de *microarray* llevado a cabo en esta tesis doctoral es también una fuente importante de información para obtener indicios acerca de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la actividad de los neuroblastos. El *array* ha desvelado similitudes importantes entre los neuroblastos del CC y los de otros nichos del SNC en cuanto a la expresión de receptores y otras proteínas implicadas en señalización. Uno de los marcadores más característicos de neuroblastos de la SVZ es PSA-NCAM (*PolySiAlylated-Neural Cell Adhesion Molecule*) (Doetsch et al., 1997). Se trata

de una molécula de superficie que aporta estabilidad migratoria a los neuroblastos, por lo que es crítica para la migración rostro-caudal en el ratón adulto (Lim and Alvarez-buylla, 2016). Los neuroblastos del CC expresan muy altos niveles del gen NCAM2, que podría estar ejerciendo una función similar. Esta señalización constituiría un nuevo indicio de capacidad migratoria en los neuroblastos del CC, que podrían desplazarse para formar nuevos glomérulos durante la hipoxia crónica.

Siguiendo con ejemplos obtenidos del análisis por *microarray*, el gen *Rbfox1* y su homólogo *Rbfox3* codifican proteínas implicadas en la homeostasis y control de la excitabilidad neuronal (Lal et al., 2013), entre otras funciones. *Rbfox1* es el gen más diferencialmente sobreexpresado en los neuroblastos del CC, mientras que *Rbfox3*, también conocido como NeuN, se utiliza como marcador postmitótico para neuronas jóvenes recién formadas en la SGZ (Kempermann et al., 2017). Ambos marcadores podrían por tanto estar implicados en el mecanismo de maduración neuronal en los neuroblastos del CC. Por otro lado, el factor de transcripción *Ascl1* (también conocido como *Mash1*), otro de los más sobreexpresados en la población de neuroblastos del CC, se ha descrito en el nicho de la SVZ como marcador de las células tipo C o progenitores intermedios (Lim and Alvarez-buylla, 2016). Este gen además, está descrito como un gen fundamental para el desarrollo embrionario del CC (Kameda, 2005), ya que en el mutante nulo para *Mash1* no se llegan a formar nunca las células glómicas. Parece de nuevo un claro ejemplo de factor implicado en el proceso de maduración neuronal en este nicho del SNP.

Una señalización que se repite en los resultados del *microarray*, y que nos hace pensar de nuevo en similitudes entre los neuroblastos del CC y los de otros nichos, es la señalización de Glutamato y también de GABA. Los neuroblastos de la SVZ se ha descrito que reciben señalización de Glutamato de los astrocitos del nicho, necesaria para la supervivencia y migración hacia el bulbo olfatorio (Platel et al., 2010; Sultan et al., 2015). Mientras que en la SGZ existen señalizaciones de Glutamato y GABA implicadas en la maduración de las neuronas recién formadas y en un aumento de su plasticidad (Beckervordersandforth et al., 2015; Kempermann et al., 2017). Los

neuroblastos del CC expresan altos niveles de los receptores para estos moduladores, por lo que con mucha probabilidad utilizarán este tipo de señalización para regular su función.

5. Implicaciones clínicas del estudio de los neuroblastos del CC

El CC está implicado en varios tipos de patologías, algunos de cuyos síntomas se sabe que están causados por una hipersensibilización de las células glómicas, que lleva a una sobreactivación del sistema nervioso simpático. Ejemplo de estos síntomas lo constituyen situaciones tan graves como la hipertensión arterial o determinados problemas cardíacos. Un ejemplo de estas patologías sería el caso de la EPOC, donde se ha demostrado que los episodios de hipoxia intermitente que sufren los pacientes no producen hipertrofia del CC, pero sí cambios plásticos en las células glómicas que llevan a sobreactivación del órgano (Cutler et al., 2004; Peng et al., 2003; Del Rio et al., 2016). Los neuroblastos del CC son células prediferenciadas, con capacidad de diferenciación rápida a célula glómica madura. En este tipo de patologías, donde el CC se vuelve más sensible al estímulo hipóxico pero sin incremento del tamaño del órgano, sería de interés clínico identificar si se está produciendo una maduración de los neuroblastos, que aumente el número de células glómicas funcionales sin aumentar la densidad celular. Podría ser que las señalizaciones que se producen en el CC en este tipo de patología den lugar a la maduración de los neuroblastos sin proliferación previa, puesto que estos dos procesos podrían ser independientes.

En otras enfermedades relacionadas con la hipoxia y con la sobreactivación del simpático, como la hipertensión refractaria, o la insuficiencia cardíaca crónica, se ha llegado a estudiar la implicación del CC. Se sabe que parte de la sintomatología en estas enfermedades se debe también a una sobreactivación del CC, algunas veces incluso con crecimiento del órgano. Para paliar los síntomas de estas patologías se ha intentado la denervación del CC, o incluso la resección completa del órgano (Narkiewicz et

al., 2016; Ribeiro et al., 2013; Del Rio et al., 2013). Este tipo de terapias han resultado bastante efectivas pero resultan muy agresivas para los pacientes. Recientemente, se ha intentado una alternativa farmacológica en un modelo de rata hipertensa, consistente en la inhibición de la respuesta quimiosensora del órgano con inhibidores de los receptores purinérgicos que intervienen en la quimiotransducción (Pijacka et al., 2016). Sería interesante combinar este tipo de tratamientos, con otras drogas que bloqueen el suministro de nuevas células glómicas a partir de maduración de los neuroblastos del órgano. Para ello, será necesario profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el proceso de maduración y diferenciación de estas células, para poder desarrollar así un tratamiento farmacológico efectivo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.** El cuerpo carotídeo de rata contiene una población de neuroblastos quiescentes que se identifican por los marcadores TH y HNK-1, expresando niveles bajos de TH y niveles altos de HNK-1, facilitando este último marcador el aislamiento de estas células por citometría de flujo.
- 2.** La población de neuroblastos del cuerpo carotídeo tiene capacidad proliferativa, que se activa en respuesta al estímulo hipóxico, consiguiéndose una “neurogénesis rápida” en los primeros 3-4 días de estímulo.
- 3.** Los neuroblastos del CC tienen ciertas características de inmadurez a nivel morfológico: menor número de mitocondrias, menor número de vesículas, menor tamaño celular, y núcleo más pequeño.
- 4.** El análisis funcional muestra que los neuroblastos tienen canales iónicos de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , como la célula madura, y que estos canales son funcionales. También contienen vesículas y liberan catecolaminas en respuesta a estímulos, aunque en menor cantidad que las neuronas maduras.
- 5.** La mayor diferencia funcional entre los neuroblastos y la neurona madura, es la incapacidad de los blastos para responder a hipoxia aguda, característica distintiva de las células glómicas maduras y funcionales. Los ensayos funcionales parecen indicar que la inmadurez del sistema sensor de hipoxia del neuroblasto se encuentra a nivel mitocondrial.
- 6.** El mecanismo molecular de activación proliferativa y maduración del neuroblasto del CC parece estar mediado o facilitado por señalización purinérgica y colinérgica. Esta señalización proviene, al menos en parte, de la liberación de vesículas de las células glómicas maduras en respuesta a hipoxia aguda.

- 7.** En el CC hay una subpoblación de células que expresan niveles bajos del marcador HNK-1 y altos del marcador nestina. Esta subpoblación parece tener capacidad proliferativa y mayor potencialidad de diferenciación que el resto de células del cuerpo carotídeo, por lo que podría incluir a los progenitores intermedios del nicho, e incluso a las células madre multipotentes.

- 8.** Durante la vuelta a la normoxia, algunas células glómicas parecen mostrar capacidad de desdiferenciación hacia neuroblastos HNK-1+.

- 9.** El estudio de expresión diferencial de genes entre la población de neuroblastos y la de células glómicas maduras del CC muestra que los neuroblastos tienen activas rutas de proliferación, migración, maduración, y formación de dendritas, mientras que las células glómicas tienen activas rutas de metabolismo de grasas y azúcares, y otras características de neuronas maduras como el transporte de vesículas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Buylla, A., and Lim, D.A. (2004). For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683–686.
- Annese, V., Navarro-guerrero, E., and Pardal, R. (2017). Physiological Plasticity of Neural-Crest-Derived Stem Cells in the Adult Mammalian Carotid Body Report Physiological Plasticity of Neural-Crest-Derived Stem Cells in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell Rep.* 19, 471–478.
- Arias-Stella, J., and Valcarcel, J. (1976). Chief cell hyperplasia in the human carotid body at high altitudes: Physiologic and pathologic significance. *Hum. Pathol.* 7, 361–373.
- Bautista, L., Castro, M.J., López-Barneo, J., and Castellano, A. (2009). Hypoxia inducible factor-2 α stabilization and maxi-K⁺ channel β 1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: Role in preconditioning. *Circ. Res.* 104, 1364–1372.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., et al. (2010). In vivo fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 744–758.
- Beckervordersandforth, R., Zhang, C.-L., and Lie, D.C. (2015). Transcription-Factor-Dependent Control of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018879.
- Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., and LoTurco, J.J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 23, 10411–10418.
- Biscoe, T.J. (1971). Carotid body: structure and function. *Physiol. Rev.* 51, 437–495.
- Bisgard, G.E. (2000). Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *J. Physiol.* 531, 237–246.
- Bishop, T., Talbot, N.P., Turner, P.J., Nicholls, L.G., Pascual, A., Hodson, E.J., Douglas, G., Fielding, J.W., Smith, T.G., Demetriades, M., et al. (2013). Carotid body hyperplasia and enhanced ventilatory responses to hypoxia in mice with heterozygous deficiency of PHD2. *J. Physiol.* 591, 3565–3577.
- Boatman, S., Barrett, F., Satishchandran, S., Jing, L., Shestopalov, I., and Zon, L.I. (2013). Assaying hematopoiesis using zebrafish. *Blood Cells, Mol. Dis.* 51, 271–276.
- Bronner-Fraser, M. (1987). Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody. *Dev. Biol.* 123, 321–331.
- De Caro, R., Macchi, V., Sfriso, M.M., and Porzionato, A. (2012). Structural and neurochemical changes in the maturation of the carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 9–19.
- de Castro, F. (2009). Towards the sensory nature of the carotid body: Hering, De Castro and Heymans. *Front. Neuroanat.* 3, 23.

- Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *5*, 640–658.
- Chen, I.L., and Yates, R.D. (1984). Two types of glomus cell in the rat carotid body as revealed by alpha-bungarotoxin binding. *J Neurocytol* *13*, 281–302.
- Chen, C.-C., Hsia, C.-W., Ho, C.-W., Liang, C.-M., Chen, C.-M., Huang, K.-L., Kang, B.-H., and Chen, Y.-H. (2016). Hypoxia and Hyperoxia Differentially Control Proliferation of Rat Neural Crest Stem Cells via Distinct Regulatory Pathways of the HIF1 α -CXCR4 and TP53-TPM1 Proteins. *Dev. Dyn.* *246*, 162–185.
- Chen, J., He, L., Liu, X., Dinger, B., Stensaas, L., and Fidone, S. (2007). Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on chronic hypoxia-induced morphological and physiological changes in rat carotid body. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *292*, L1257–L1262.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., DeLeo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* *82*, 545–559.
- Cutler, M.J., Swift, N.M., Keller, D.M., Wasmund, W.L., and Smith, M.L. (2004). Hypoxia-mediated prolonged elevation of sympathetic nerve activity after periods of intermittent hypoxic apnea. *J. Appl. Physiol.* *96*, 754–761.
- Cutz, E., Ma, T.K.F., Perrin, D.G., Moore, A.M., and Becker, L.E. (1997). Peripheral chemoreceptors in congenital central hypoventilation syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *155*, 358–363.
- D'Anglemon de Tassigny, X., Pardal, R., Gomez-pinedo, U., and Capilla-gonzalez, V. (2015). Resistance of subventricular neural stem cells to chronic hypoxemia despite structural disorganization of the germinal center and impairment of neuronal and oligodendrocyte Resistance of subventricular neural stem cells to chronic hypoxemia despite struct. *Hypoxia* *3*, 15–33.
- Daynac, M., Tirou, L., Faure, H., Mouthon, M.-A., Gauthier, L.R., Hahn, H., Boussin, F.D., and Ruat, M. (2016). Hedgehog Controls Quiescence and Activation of Neural Stem Cells in the Adult Ventricular-Subventricular Zone. *Stem Cell Reports* *7*, 735–748.
- Dias, G.P., Cavegn, N., Nix, A., Do Nascimento Bevilaqua, M.C., Stangl, D., Zainuddin, M.S.A., Nardi, A.E., Gardino, P.F., and Thuret, S. (2012). The role of dietary polyphenols on adult hippocampal neurogenesis: Molecular mechanisms and behavioural effects on depression and anxiety. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2012*.
- Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14895–14900.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and 3-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* *17*, 5046–5061.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia, J.M., and Alvarez-buylla, A. (1999).

Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. *97*, 703–716.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**, 1021–1034.

Dorward, D. a, Lucas, C.D., Alessandri, A.L., Marwick, J. a, Rossi, F., Dransfield, I., Haslett, C., Dhaliwal, K., and Rossi, A.G. (2013). Technical Advance: Autofluorescence-based sorting: rapid and nonperturbing isolation of ultrapure neutrophils to determine cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 1–10.

Le Douarin, N., Le Lièvre, C., and Fontaine, J. (1972). Experimental research on the embryologic origin of the carotid body in birds. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **275**, 583–586.

Le Douarin, N.M., Cruzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* **131**, 4637–4650.

Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. *Dev. Biol.* **366**, 83–95.

Encinas, J.M., Michurina, T. V, Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., and Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **8**, 566–579.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313–1317.

Fernández-Agüera, M.C., Gao, L., González-Rodríguez, P., Pintado, C.O., Arias-Mayenco, I., García-Flores, P., García-Pergañeda, A., Pascual, A., Ortega-Sáenz, P., and López-Barneo, J. (2015). Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling. *Cell Metab.* **22**, 1–13.

Fidone, S.J., and Gonzalez, C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. *Handb. Physiol. Respir. N.C.a.J.G.W.*

Fitzgerald, R.S., and Lahiri, S. (1986). Reflex responses to chemoreceptor stimulation. *Handb. Physiol. Sect. 3 Respir. Syst. Vol. II Control Breathing, Part 2.* 313–362.

Fuchs, E., Tumber, T., and Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* **116**, 769–778.

Gage, F.H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science* **287**, 1433–1438.

Gammill, L.S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 795–805.

Ganformina, M.D., and López-Barneo, J. (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2927–2930.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. 97, 13625–13630.

Hameed, L.S., Berg, D.A., Belnoue, L., Jensen, L.D., Cao, Y., and Simon, A. (2015). Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain. *Elife* 4, 1–16.

Hansen, J.T. (1985). Ultrastructure of the primate carotid body: a morphometric study of the glomus cells and nerve endings in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Neurocytol.* 14, 13–32.

Hellström, S. (1975). Morphometric studies of dense-cored vesicles in Type I cells of rat carotid body. *J. Neurocytol.* 4, 77–86.

Hempleman, S.C., and Warburton, S.J. (2012). Comparative embryology of the carotid body. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 3–8.

Hodson, E.J., Nicholls, L.G., Turner, P.J., Llyr, R., Fielding, J.W., Douglas, G., Ratnayaka, I., Robbins, P.A., Pugh, C.W., Buckler, K.J., et al. (2016). Regulation of ventilatory sensitivity and carotid body proliferation in hypoxia by the PHD2/HIF-2 pathway. *J. Physiol.* 594, 1179–1195.

Hu, R.G., Suzuki-Kerr, H., Webb, K.F., Rhodes, J.D., Collison, D.J., Duncan, G., and Donaldson, P.J. (2008). Molecular and functional mapping of regional differences in P2Y receptor expression in the rat lens. *Exp. Eye Res.* 87, 137–146.

Huang, M., Miller, M.L., McHenry, L.K., Zheng, T., Zhen, Q., Ilkhanizadeh, S., Conklin, B.R., Bronner, M.E., and Weiss, W.A. (2016). Generating trunk neural crest from human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* 6, 19727.

Huber, K. (2006). The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol.* 298, 335–343.

Ihrle, R. a., and Álvarez-Buylla, A. (2011). Lake-Front Property: A Unique Germinal Niche by the Lateral Ventricles of the Adult Brain. *Neuron* 70, 674–686.

Jenner, P., and Katzenschlager, R. (2016). Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 33, S13–S21.

Jiang, M., Stanke, J., and Lahti, J.M. (2011). The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma.

Kameda, Y. (2002). Carotid body and glomus cells distributed in the wall of the common carotid artery in the bird. *Microsc. Res. Tech.* 59, 196–206.

Kameda, Y. (2005). Mash1 is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. *Dev. Biol.* 283, 128–139.

Kameda, Y. (2006). Dual origins of the mouse carotid body revealed by targeted disruption of *Hoxa3* and *Mash1*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 580, 93–97.

Kameda, Y. (2014). Signaling molecules and transcription factors involved in the development of the sympathetic nervous system, with special emphasis on the superior cervical ganglion. *Cell Tissue Res.* 357, 527–548.

Kameda, Y., Yamatsu, Y., and Kameya, T. (1994). Glomus Cell Differentiation in the Carotid Body Region of Chick Embryos Studied by Neuron-Specific Class III β -Tubulin Isotype and Leu-7 Monoclonal Antibodies. *J. Comp. Neurol.* 543,

531–543.

Kameda, Y., Nishimaki, T., Takeichi, M., and Chisaka, O. (2002). Homeobox gene *hoxa3* is essential for the formation of the carotid body in the mouse embryos. *Dev. Biol.* *247*, 197–209.

Kameda, Y., Ito, M., Nishimaki, T., and Gotoh, N. (2008). *FRS2* alpha 2F/2F mice lack carotid body and exhibit abnormalities of the superior cervical sympathetic ganglion and carotid sinus nerve. *Dev. Biol.* *314*, 236–247.

Kameda, Y., Saitoh, T., Nemoto, N., Katoh, T., and Iseki, S. (2012). *Hes1* is required for the development of the superior cervical ganglion of sympathetic trunk and the carotid body. *Dev. Dyn.* *241*, 1289–1300.

Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* *27*, 447–452.

Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. (2017). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a018812.

Kerosuo, L., Nie, S., Bajpai, R., and Bronner, M.E. (2015). Crestospheres: Long-Term Maintenance of Multipotent, Premigratory Neural Crest Stem Cells. *Stem Cell Reports* *5*, 499–507.

Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). *N-myc* is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.* *16*, 2699–2712.

Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. (2002). Neural Crest Stem Cells Persist in the Adult Gut but Undergo Changes in Self-Renewal, Neuronal Subtype Potential, and Factor Responsiveness. *Neuron* *35*, 657–669.

Kusakabe, T. (2002). Carotid labyrinth of amphibians. *Microsc. Res. Tech.* *59*, 207–226.

Lal, D., Reinthaler, E.M., Altmüller, J., Toliat, M.R., Thiele, H., Nürnberg, P., Lerche, H., Hahn, A., Møller, R.S., Muhle, H., et al. (2013). *RBFOX1* and *RBFOX3* Mutations in Rolandic Epilepsy. *PLoS One* *8*, e73323.

Langley, K., and Grant, N.J. (1999). Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res.* *298*, 185–206.

Li, H.-Y., Say, E.H.M., and Zhou, X.-F. (2007). Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells* *25*, 2053–2065.

Lim, D.A., and Alvarez-buylla, A. (2016). The Adult Ventricular – Subventricular Zone. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–34.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci.* *37*, 563–571.

López-Barneo, J., Pardal, R., and Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular mechanisms of oxygen sensing. *Annu. Rev. Physiol.* *63*, 259–287.

López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Pascual, A., and Piruat, J.I. (2008). Carotid body oxygen sensing. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *32*, 1386–1398.

- López-Barneo, J., Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., Villadiego, J., and Toledo-Aral, J.J. (2009). The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *J. Neural Transm.* *116*, 975–982.
- López-Barneo, J., Macías, D., Platero-Luengo, A., Ortega-Sáenz, P., and Pardal, R. (2016a). Carotid body oxygen sensing and adaptation to hypoxia. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* *468*, 59–70.
- López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., González-Rodríguez, P., Fernández-Agüera, M.C., Macías, D., Pardal, R., and Gao, L. (2016b). Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. *Mol. Aspects Med.* *47–48*, 90–108.
- López-Barneo, J., González-Rodríguez, P., Gao, L., Fernández-Agüera, M.C., Pardal, R., and Ortega-Sáenz, P. (2016c). Oxygen Sensing By the Carotid Body: Mechanisms and Role in Adaptation To Hypoxia. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 629–642.
- López-Barneo J., J., L.-L., J, U., and C, G. (1988). Chemotransduction in the Carotid Body: K⁺ Current Modulated by Po₂ in Type I Chemoreceptor Cells. *Science* *241*, 580–582.
- MacFarlane, P.M., Ribeiro, A.P., and Martin, R.J. (2012). Carotid chemoreceptor development and neonatal apnea. *Respir. Physiol. Neurobiol.* *185*, 170–176.
- Macias, D., Fernandez-Aguera, M.C., Bonilla-Henao, V., and López-Barneo, J. (2014). Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol. Med.* *6*, 1577–1592.
- McBryde, F.D., Abdala, A.P., Hendy, E.B., Pijacka, W., Marvar, P., Moraes, D.J.A., Sobotka, P.A., and Paton, J.F.R. (2013). The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat. Commun.* *4*, 63–68.
- McDonald, M. (1981). Peripheral chemoreceptors: structure–function relationships of the carotid body. *Regul. Breathing. Lung Biol. Heal. Dis. Vol.* *17*, 105–320.
- McDonald, D.M., and Mitchell, R.A. (1975). The innervation of glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: A quantitative ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* *4*, 177–230.
- McGregor, K.H., Gil, J., and Lahiri, S. (1984). A morphometric study of the carotid body in chronically hypoxic rats. *J. Appl. Physiol.* *57*, 1430–1438.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-navarro, M., Garcia-verdugo, J.M., and Álvarez-Buylla, A. (2008). Article Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell* *3*, 265–278.
- Mirzadeh, Z., Kusne, Y., Duran-Moreno, M., Cabrales, E., Gil-Perotin, S., Ortiz, C., Chen, B., Garcia-Verdugo, J.M., Sanai, N., and Alvarez-Buylla, A. (2017). Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat. Commun.* *8*, 13759.
- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in

- stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150–161.
- Montoro, R.J., Urena, J., Fernandez-Chacón, R., Alvarez, G., Toledo, D., and López-Barneo, J. (1996). Oxygen Sensing by Ion Channels and Chemotransduction in Single Glomus Cells. *J. Gen. Physiol.* 107, 133–143.
- Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 96, 737–749.
- Morrison, S.J., Csete, M., Groves, A.K., Melega, W., Wold, B., and Anderson, D.J. (2000). Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci.* 20, 7370–7376.
- Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J. Neurosci.* 31, 1676–1687.
- Muñoz-Manchado, A.B., Villadiego, J., Suárez-Luna, N., Bermejo-Navas, A., Garrido-Gil, P., Labandeira-García, J.L., Echevarría, M., López-Barneo, J., and Toledo-Aral, J.J. (2013). Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 34, 902–915.
- Murali, S., and Nurse, C.A. (2015). Purinergic signaling mediates bidirectional crosstalk between chemoreceptor type I and glial-like type II cells of the rat carotid body. *J. Physiol.* 2, 391–406.
- Nagase, T., Sanai, Y., Nakamura, S., Asato, H., Harii, K., and Osumi, N. (2003). Roles of HNK-1 carbohydrate epitope and its synthetic glucuronyltransferase genes on migration of rat neural crest cells. *J. Anat.* 203, 77–88.
- Narkiewicz, K., Ratcliffe, L.E.K., Hart, E.C., Briant, L.J.B., Chrostowska, M., Wolf, J., Szyndler, A., Hering, D., Abdala, A.P., Manghat, N., et al. (2016). Unilateral Carotid Body Resection in Resistant Hypertension. *JACC Basic to Transl. Sci.* 1, 313–324.
- Navarro-Guerrero, E., Platero-Luengo, A., Linares-Clemente, P., Cases, I., López-Barneo, J., and Pardal, R. (2016). Gene Expression Profiling Supports the Neural Crest Origin of Adult Rodent Carotid Body Stem Cells and Identifies CD10 as a Marker for Mesectoderm-Committed Progenitors. *Stem Cells* 34, 1637–1650.
- Nurse, C.A. (2014). Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *J. Physiol.* 16, 3419–3426.
- Nurse, C.A., and Fearon, I.M. (2002). Carotid body chemoreceptors in dissociated cell culture. *Microsc. Res. Tech.* 59, 249–255.
- Nurse, C.A., and Piskuric, N.A. (2013). Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 22–30.
- Nurse, C.A., Gonzalez, C., Peers, C., and Prabhakar, N.R. (2012). Arterial Chemoreception.
- Ortega, F., Berninger, B., and Costa, M.R. (2013a). Primary Culture and Live Imaging of Adult Neural Stem Cells and Their Progeny. 1–11.

- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., and Berninger, B. (2013b). Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* *15*, 602–613.
- Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Levitsky, K., Villadiego, J., Muñoz-Manchado, A.B., Durán, R., Bonilla-Henao, V., Arias-Mayenco, I., Sobrino, V., Ordóñez, A., et al. (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J. Physiol.* *591*, 6157–6173.
- Paciga, M., Vollmer, C., and Nurse, C. (1999). Role of ET-1 in hypoxia-induced mitosis of cultured rat carotid body chemoreceptors. *Neuroreport* *10*, 3739–3744.
- Panchision, D.M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J. Cell. Physiol.* *220*, 562–568.
- Pardal, R., and López-Barneo, J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat. Neurosci.* *5*, 197–198.
- Pardal, R., and López-Barneo, J. (2016). Mature neurons modulate neurogenesis through chemical signals acting on neural stem cells. *Dev. Growth Differ.*
- Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., and López-Barneo, J. (2007). Glia-like Stem Cells Sustain Physiologic Neurogenesis in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell* *131*, 364–377.
- Pascual, A., Hidalgo-Figueroa, M., Piruat, J.I., Pintado, C.O., Gómez-Díaz, R., and López-Barneo, J. (2008). Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nat. Neurosci.* *11*, 755–761.
- Pastrana, E., Cheng, L.-C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 6387–6392.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* *8*, 486–498.
- Peng, Y.-J., Overholt, J.L., Kline, D., Kumar, G.K., and Prabhakar, N.R. (2003). Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10073–10078.
- Pijacka, W., Moraes, D.J.A., Ratcliffe, L.E.K., Nightingale, A.K., Hart, E.C., da Silva, M.P., Machado, B.H., McBryde, F.D., Abdala, A.P., Ford, A.P., et al. (2016). Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat. Med.* *22*(10), 1151–1159.
- Piskuric, N.A., and Nurse, C.A. (2013). Expanding role of ATP as a versatile messenger at carotid and aortic body chemoreceptors. *J. Physiol.* *591*, 415–422.
- Platel, J.-C., Dave, K.A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M.E., and Bordey, A. (2010). NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*

65, 859–872.

Platero-Luengo, A., González-Granero, S., Durán, R., Díaz-Castro, B., Piruat, J.I., García-Verdugo, J.M., Pardal, R., and López-Barneo, J. (2014). An O₂-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell* 156, 291–303.

Ponikowski, P., Chua, T.P., Anker, S.D., Francis, D.P., Doehner, W., Banasiak, W., Poole-Wilson, P.A., Piepoli, M.F., and Coats, A.J.S. (2001). Peripheral Chemoreceptor Hypersensitivity. *Circulation* 104.

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., and Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1045-54.

Porzionato, A., Macchi, V., Stecco, C., and De Caro, R. (2013). The carotid body in Sudden Infant Death Syndrome. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 194–201.

Prabhakar, N.R., and Semenza, G.L. (2015). Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 30, 340–348.

Prasad, M., Fearon, I.M., Zhang, M., Laing, M., Vollmer, C., and Nurse, C.A. (2001). Expression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *J. Physiol.* 537, 667–677.

Ribeiro, M.J., Sacramento, J.F., Gonzalez, C., Guarino, M.P., Monteiro, E.C., and Conde, S. V (2013). Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes* 62, 2905–2916.

Del Rio, R., Marcus, N.J., and Schultz, H.D. (2013). Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: Rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 2422–2430.

Del Rio, R., Andrade, D.C., Lucero, C., Arias, P., and Iturriaga, R. (2016). Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertension* 68, 436–445.

Romero, A., Caride, A., Pereiro, N., and Lafuente, A. (2011). Modulatory effects of melatonin on cadmium-induced changes in biogenic amines in rat hypothalamus. *Neurotox. Res.* 20, 240–249.

Saito, D., Takase, Y., Murai, H., and Takahashi, Y. (2012). The Dorsal Aorta Initiates a Molecular Cascade That Instructs Sympatho-Adrenal Specification. *Science (80-)*. 336, 3–7.

Sauka-Spengler, T., and Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 557–568.

Schlenker, E.H. (2007). In hamsters dopamine D₂ receptors affect ventilation during and following intermittent hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 674–680.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine.

Cell 148, 399–408.

Sesar, Á., Fernández-Pajarín, G., Ares, B., Rivas, M.T., and Castro, A. (2017). Continuous subcutaneous apomorphine infusion in advanced Parkinson's disease: 10-year experience with 230 patients. *J. Neurol.*

Shah, A.T., Cannon, T.M., Higginbotham, J.N., Coffey, R.J., and Skala, M.C. (2016). Autofluorescence flow sorting of breast cancer cell metabolism. *J. Biophotonics* 8, 1–8.

Silva-Vargas, V., Crouch, E.E., and Doetsch, F. (2013). Adult neural stem cells and their niche: A dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 935–942.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219–1227.

Sultan, S., Li, L., Moss, J., Petrelli, F., Cassé, F., Gebara, E., Lopatar, J., Pfrieger, F.W., Bezzi, P., Bischofberger, J., et al. (2015). Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* 88, 957–972.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112–117.

Toledo-Aral, J.J., Méndez-Ferrer, S., Pardal, R., Echevarría, M., and López-Barneo, J. (2003). Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J. Neurosci.* 23, 141–148.

Tomita, Y., Matsumura, K., Wakamatsu, Y., Matsuzaki, Y., Shibuya, I., Kawaguchi, H., Ieda, M., Kanakubo, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., et al. (2005). Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J. Cell Biol.* 170, 1135–1146.

Tucker, G.C., Delarue, M., Zada, S., Boucaut, J.C., and Thiery, J.P. (1988). Expression of the HNK-1/NC-1 epitope in early vertebrate neurogenesis. *Cell Tissue Res.* 251, 457–465.

Urbán, N., and Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

Ureña, J., Fernández-Chacón, R., Benot, A.R., Alvarez de Toledo, G.A., and López-Barneo, J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10208–10211.

Villadiego, J., Méndez-Ferrer, S., Valdés-Sánchez, T., Silos-Santiago, I., Fariñas, I., López-Barneo, J., and Toledo-Aral, J.J. (2005). Selective glial cell line-derived neurotrophic factor production in adult dopaminergic carotid body cells in situ and after intrastriatal transplantation. *J. Neurosci.* 25, 4091–4098.

Wang, Z.Y., and Bisgard, G.E. (2002). Chronic hypoxia-induced morphological and neurochemical changes in the carotid body. *Microsc. Res. Tech.* 59, 168–177.

Wang, Z., Jr, E.B.O., Bjorling, D.E., Mitchell, G.S., and Bisgard, G.E. (2008). Sustained hypoxia-induced proliferation of carotid body type I cells in rats. 803–808.

- Watt, F.M., and Hogan, B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427–1430.
- Weil, G.J., and Chused, T.M. (1981). Eosinophil autofluorescence and its use in isolation and analysis of human eosinophils using flow microfluorometry. *Blood* 57, 1099–1104.
- Weir, E.K., López-Barneo, J., Buckler, K.J., and Archer, S.L. (2005). MECHANISMS OF DISEASE Acute Oxygen-Sensing Mechanisms. *N Engl J Med* 353, 2042–2055.
- Yagi, H., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., Nakatani, Y., Ariga, T., Kato, K., and Yu, R.K. (2010). HNK-1 epitope-carrying tenascin-C spliced variant regulates the proliferation of mouse embryonic neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 285, 37293–37301.
- Yanagisawa, M., and Yu, R.K. (2007). The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. *Glycobiology* 17, 57–74.
- Yu, D.X., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2014). How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. 2366–2375.
- Zhang, M., Piskuric, N.A., Vollmer, C., and Nurse, C.A. (2012). P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP. *J. Physiol.* 590, 4335–4350.