

Irene Cantarero Carmona

Aportaciones originales al conocimiento de las células intersticiales de Cajal

Departamento
Anatomía e Histología Humanas

Director/es
Junquera Escribano, María Concepción

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

APORTACIONES ORIGINALES AL CONOCIMIENTO DE LAS CÉLULAS INTERSTICIALES DE CAJAL

Autor

Irene Cantarero Carmona

Director/es

Junquera Escribano, María Concepción

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía e Histología Humanas

2011



Universidad
Zaragoza

“Aportaciones originales al conocimiento de
las células intersticiales de Cajal”

Memoria de TESIS DOCTORAL presentada por **Dña. Irene Cantarero Carmona**,
Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Zaragoza.

Directora de Tesis

Dra. Concepción Junquera Escribano

Catedrática de Universidad

Departamento de Anatomía e Histología Humanas

Facultad de Medicina

Universidad de Zaragoza

En Zaragoza, a 1 de septiembre de 2011

Las células intersticiales descritas por D. Santiago Ramón y Cajal, en relación con los plexos del Sistema Nervioso Entérico, constituyen una entidad biológica específica. En la actualidad son reconocidas internacionalmente con el nombre de su descubridor, las células intersticiales de Cajal.

La memoria presentada recoge las investigaciones realizadas a lo largo de los 4 últimos años, las cuales han dado lugar a 4 publicaciones diferentes; 3 de ellas basadas en un análisis ultraestructural, que han permitido por un lado, caracterizar a las células intersticiales de Cajal localizadas en la lamina propia y establecer su relación con el sistema vascular, y por otro, definir la presencia de un cilio único como una característica especial en estas células.

El estudio inmunohistoquímico sobre la presencia de nestina en los plexos entéricos es el inicio del posible papel de estas células en los procesos de Neurogénesis en el Sistema Nervioso Entérico.

Por todo ello, como directora de este trabajo, considero que esta tesis doctoral titulada “Aportaciones originales al conocimiento de las células intersticiales de Cajal” cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Dra. Concepción Junquera Escribano



Universidad
Zaragoza

Dña. Concepción Junquera Escribano, Catedrática del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Zaragoza

INFORMA

Que Dña. Irene Cantarero Carmona ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**Aportaciones originales al conocimiento de las células intersticiales de Cajal**” y que bajo mi juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza. Una vez finalizada, autorizo su presentación en la modalidad de **compedio de publicaciones** para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en

Zaragoza, a 1 de septiembre de 2011.

Dña. Concepción Junquera Escribano

“No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz,
sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento”

Walt Whitman

Conversaciones de un día cualquiera:

“Titi, eso de la Neurogénesis debe ser algo muy difícil”

José Carmona, 78 años, mi abuelo.

“Tú, tranquila... aporta tu grano de arena que otros terminarán la montaña”

“La vida es mucho más complicada que tener que explicar montañas”

Antonia Moreno, 74 años, mi abuela.

Todo lo que te puedo aconsejar está ya en la naturaleza... o en este libro
(Reglas y consejos sobre investigación científica. Los tónicos de la voluntad.

Santiago Ramón y Cajal)

No lo está el cariño.

Comenzamos un camino...

18 de septiembre de 2007

Concepción Junquera

Agradecimientos

“Cuando se nos presenta una idea, no la debemos rechazar por la mera evidencia de que no se adapta a una teoría dominante”

Claude Bernard (1813-1878. Fisiólogo francés)

Estas podrían ser las primeras palabras de cualquier director de Tesis. *“No descartes tus resultados”*, *“Saca tus propias conclusiones de los artículos”*, me repetía una y otra vez mi directora de Tesis. He tenido el gran placer de poder *“sacar mis propias conclusiones”* rodeada de muchísima gente, de haber compartido con ellos grandes momentos de alegría, de emociones, de triunfos y desilusiones.

En primer lugar quiero dar la gracias a mi directora de Tesis, Concha, quien me ha enseñado a disfrutar de la ciencia, a trabajar duro, a esforzarme al máximo. Gracias por transmitirme no solo tu ilusión por la investigación y la Microscopía Electrónica, sino también por tu confianza, tu consejo, tu apoyo incondicional y tu cariño..., mucho cariño.

Gracias a ti también, María José, por tu amistad durante estos años, por lo momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por apoyarme en los momentos difíciles. Compartir el día a día contigo, me ha enseñado mucho a nivel personal y profesional. Ejemplo de superación y valentía.

Quiero hacer una mención especial al resto de miembros de mi grupo de investigación, Carmen, Tomás y José Miguel. Como dijo Isaac Newton, *“Si he conseguido ver más lejos es porque me he aupado en hombros de gigantes”*.

Obviamente, tengo mucho que agradecer a María Jesús y Rodolfo. Vosotros me disteis esa primera oportunidad, ese primer trabajo que esperan los recién licenciados y que nos pone a prueba a uno mismo. Mi más sincera admiración a toda una vida dedicada a la investigación.

Gracias a todos y cada uno de los compañeros y amigos del Departamento, personas con las cuales he compartido esta experiencia y han convivido conmigo cada día: M^a

Teresa Peg, Carlota Castillo, Belén, Sonia López, Carmen Pérez-Castejón, Arturo, Teresa Figols, Julia Aísa, María José Barral, Primitivo, Juan de Dios, Asunción, Pilar Parra, M^a Carmen Andrés, Pilar Jordán...; especialmente a las incombustibles, Silvia Andrés y Susana; y a los incondicionales, Manolo, Nieves y Julia Blasco.

A mis madrugadoras, Silvia Lobera, Rosa Calvo y Ana Igal. Por tantas y tantas conversaciones mañaneras y esas palabras de ánimo y cariño que siempre he recibido de vosotras.

Agradezco al Dr. José Manuel García- Verdugo y todo su equipo de investigación, en especial a Mario Soriano, por la colaboración, servicio y confianza depositada hacia mi grupo de investigación.

Una parte importante de esta tesis se la dedico a mi familia. He recibido una educación ejemplar, y desde pequeña aprendí que todo conlleva un esfuerzo, que los arboles no dan frutos sino los riegas TÚ cada día. A ellos les agradezco que me enseñaran a disfrutar de las pequeñas cosas que te da la vida: un día de pesca, el campo, la naturaleza... o simplemente, la satisfacción de haber hecho el trabajo correctamente. Sin vuestra confianza y apoyo esto no hubiera sido posible. Gracias por entender mis ausencias.

Gracias también a mi otra familia, a la parte de fuera, quienes en todo momento han estado pendientes de cada cosa que he necesitado.

No me olvido de ti, Raúl. Apareciste y te quedaste. ¡Qué maravilloso fue el día en que decidiste quedarte!. Eres la única persona que ha conocido en presente esta tesis, quien ha estado siempre a mi lado, me ha dado fuerzas en momentos de debilidad y ha creído en mí: YO CONTIGO. Gracias por dejarme compartir mis/tus sueños.

Gracias a todos.

A mi familia
A la parte de fuera
A Raúl

Lista de abreviaturas

3-PGDH: 3-fosfoglicerato deshidrogenasa.

BrdU: Bromodeoxiuridina.

CSF: Factor estimulante de colonias.

Dcx: Doblecortina.

Dil: 1,1'- dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianinaperclorato.

EGF: Factor de crecimiento epitelial.

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico 2.

GFAP: Proteína ácida gliofibrilar.

GIST: Tumores del estroma gastrointestinal.

GS: Glutamina sintetasa.

HZ4-FeSV: Sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4.

ICC: Célula intersticial de Cajal.

ICC-CM: Célula intersticial de Cajal de la capa muscular circular.

ICC-DMP: Célula intersticial de Cajal del plexo muscular profundo.

ICC- IM: Célula intersticial de Cajal intramuscular.

ICC-Like: Célula intersticial de Cajal - like.

ICC- LM: Célula intersticial de Cajal de la capa muscular longitudinal.

ICC-MP: Célula intersticial de Cajal del plexo mientérico.

ICC-SEP: Célula intersticial de Cajal asociada a los septos del tejido conectivo.

ICC-SM: Célula intersticial de Cajal de la capa submucosa.

ICC-SMP: Célula intersticial de Cajal del plexo submucoso.

ICC-SS: Célula intersticial de Cajal de la capa serosa.

ICLC: Célula intersticial de Cajal - like.

IP3: Inositol 1,4,5 trifosfato.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MET: Microscopía electrónica de transmisión.

MTOC: Centro organizador de microtúbulos.

NeU: Núcleo neuronal.

NOS: Oxido nítrico sintasa.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PSA-NCAM: Molécula de adhesión celular neural polisializada.

SCF: Factor de células madre.

SGZ: Zona subgranular.

Shh: Sonic hedgehog.

SMMHC: Cadena pesada de miosina de músculo liso.

SNA: Sistema Nervioso Autónomo.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNE: Sistema Nervioso Entérico.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

SVZ: Zona subventricular.

TUC-4: proteína 4 mediadora de respuesta a colapsina.

Tuj1: Tubulina β -III específica neuronal.

VACHT: Transportador de vesículas de acetilcolina.

VENT: Células del tubo neural que migran ventralmente.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo.

Tabla de contenidos

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.	23
I. EL Sistema Nervioso Entérico.	25
1. Estructura y organización.	26
2. Funciones.	28
3. Origen embrionario.	29
II. Las células intersticiales de Cajal.	37
1. Concepto y revisión histórica.	38
2. El receptor c-Kit.	54
3. Distribución en el tracto gastrointestinal.	57
4. Funciones.	60
4.1. Las células intersticiales de Cajal y su actividad como marcapasos.	61
4.2. Mediadoras de la neurotransmisión.	67
4.3. Sensores de estiramiento: mecano-receptoras.	70
5. Origen embrionario.	72
5.1. Precursor mesenquimal.	73
5.2. Células procedentes de la parte ventral del tubo neural.	75
5.3. Precursor común: células intersticiales de Cajal y células musculares lisas.	78
6. Ultraestructura.	81
7. Localización de las células intersticiales de Cajal fuera del tracto gastrointestinal.	85
7.1. Las células intersticiales de Cajal - Like.	85
7.2. Los telocitos.	90

III. Neurogénesis adulta.	97
1. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Central.	98
1.1. La zona Subventricular (SVZ).	99
1.2. La zona Subgranular (SGZ).	105
2. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Entérico.	109
JUSTIFICACIÓN.	113
OBJETIVOS.	117
PRESENTACIÓN DE LAS PUBLICACIONES.	121
PUBLICACIONES.	125
I. Cantarero Carmona I , Luesma Bartolomé MJ, Junquera Escribano C. Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. J Cell Mol Med. 2011; 15(1): 26-30. F.I: 4.608 (2010).	
II. Cantarero I , Luesma MJ, Junquera C. The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. J Cell Mol Med. 2011. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x. F.I: 4.608 (2010).	
III. Junquera Escribano C, Cantarero Carmona I , Luesma Bartolomé MJ, Soriano-Navarro M, Martínez-Ciriano C, Castiella Muruzábal T, García-Verdugo JM. The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. Histol Histopathol. 2011; 26(4): 461-70. F.I: 2.502 (2010).	
IV. Cantarero Carmona I , Luesma Bartolomé MJ, Lavoie-Gagnon C, Junquera Escribano C. Distribution of nestin protein: immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. Microsc Res Tech. 2011; 74(2): 148-52. F.I: 1.712 (2010).	

DISCUSIÓN.	173
CONCLUSIONES.	187
REFERENCIAS.	191

Introducción

I. El Sistema Nervioso Entérico.

El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) o Vegetativo se divide en el Sistema Nervioso Simpático, el Parasimpático y el Sistema Nervioso Entérico (SNE).

El SNE difiere tanto estructural como funcionalmente de cualquier otro componente del Sistema Nervioso Periférico (SNP) [Gershon, 1981; Gabella, 1987]. A diferencia de otros ganglios autónomos, los ganglios entéricos son avasculares y carecen en su interior de células del tejido conectivo y por tanto de fibrillas de colágeno. El apoyo estructural de las neuronas entéricas no proviene del tejido conectivo o células de Schwann, sino de una población de célula gliales con características morfológicas y fenotípicas más similares a los astrocitos del Sistema Nervioso Central (SNC), que a las células de soporte de los ganglios simpáticos y parasimpáticos [Gershon y Rothman, 1991]. Estas características morfológicas le proporcionan un entorno regulado y protegido similar al SNC [Gabella, 1987].

El SNE es la mayor subdivisión del SNP y contiene tantas neuronas como pueden encontrarse en la médula espinal [Furness y Costa, 1980; Gershon, 1981, 1993]. Por otra parte, es el SNE el componente más complejo del SNP si consideramos los diferentes subtipos de neuronas y

su conectividad. Las neuronas entéricas pueden diferir en la expresión de neurotransmisores, la morfología, la electrofisiología y la función [Costa et al., 1996; Furness, 2000; Brookes, 2001]. El gran número de neuronas presentes en los plexos entéricos y su diversidad fenotípica se refleja en circuitos complejos, que funcionan en gran medida independientemente del SNC. De hecho, a pesar que el SNE conecta con el cerebro y los núcleos de la médula espinal a través de las ramas simpáticas y parasimpáticas del SNA [Luckensmeyer y Keast, 1998; Powley, 2000], el SNE es la única región del SNP capaz de mediar una actividad refleja [Furness et al., 1995]. Por tanto, dada su autonomía y semejanza estructural y neuroquímica con el SNC, el SNE ha sido denominado el "segundo cerebro" [Gershon, 1998].

1. Estructura y organización.

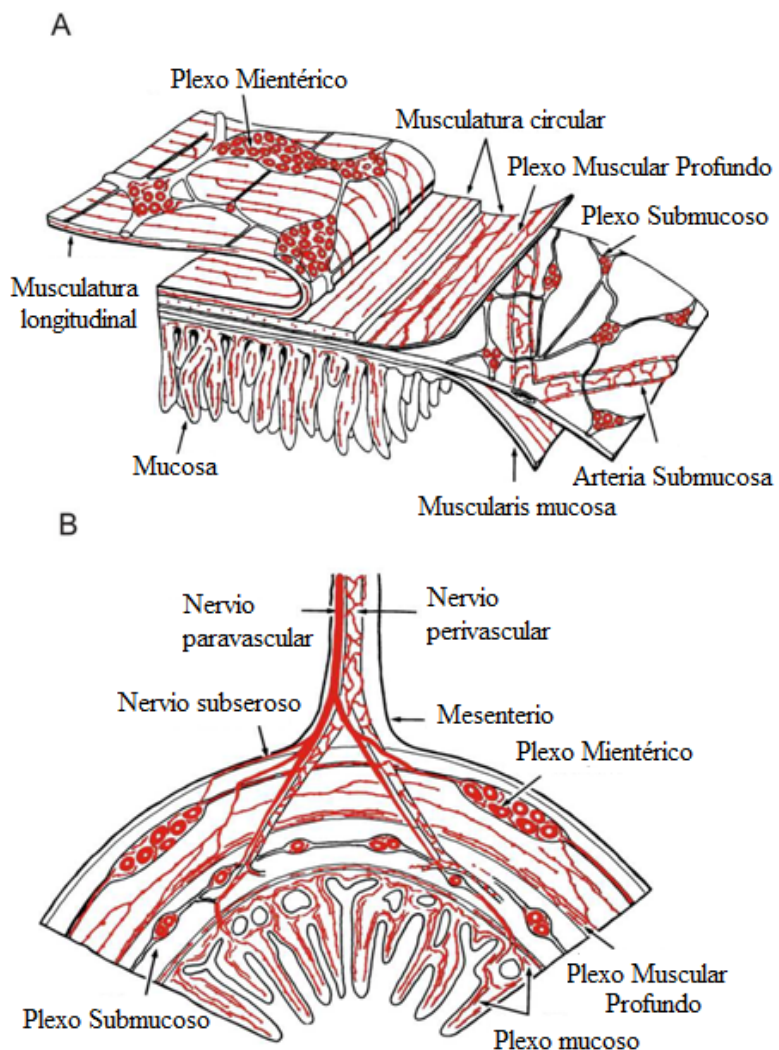
El SNE se compone de un gran número de neuronas y células gliales agrupadas en ganglios, interconectados e intercalados en la pared del intestino. Dichos ganglios entéricos se organizan en dos plexos principales: el plexo de Auerbach o mientérico situado entre la capa de musculatura lisa longitudinal y circular, y el plexo de Meissner o submucoso localizado en la propia capa submucosa (Figura 1).

En los mamíferos pequeños, el plexo submucoso se limita al intestino delgado y al intestino grueso, mientras que en los mamíferos grandes, incluyendo los seres humanos, también pueden encontrarse

ganglios submucosos en el estómago. En general, el tamaño de los ganglios del SNE varía entre los propios plexos (normalmente los ganglios mientéricos son considerablemente mayores que los ganglios submucosos), entre las regiones del intestino y según las especies consideradas [Furness, 2006].

En relación con estos plexos clásicamente establecidos, encontramos una red celular formada por las células intersticiales de Cajal analizadas en el apartado II.

Figura 1. Disposición de los plexos entéricos en el intestino delgado. [A] Apariencia de las capas separadas. El plexo mientérico contiene numerosos ganglios y haces de fibras nerviosas conectadas. El plexo submucoso proporciona fibras nerviosas principalmente a la mucosa. [B] Sección transversal de los plexos entéricos del intestino. *Furness y Costa, 1980.*



2. Funciones.

Las neuronas entéricas realizan sinapsis con otras neuronas entéricas e inervan el músculo, el epitelio y los vasos sanguíneos del aparato digestivo.

El SNE está involucrado en la regulación de las actividades fundamentales de la pared intestinal, tales como el peristaltismo, la secreción epitelial, la absorción de nutrientes, el flujo sanguíneo e inmunológico y los procesos inflamatorios [Kunze y Furness, 1999]. En los mamíferos pequeños, el control de la motilidad intestinal se realiza principalmente por el plexo mientérico, mientras que las neuronas submucosas son las principales responsables de la regulación de la secreción, la absorción y las funciones vasculares del intestino. En cambio, en mamíferos más grandes, algunas neuronas submucosas participan directamente, junto con el plexo mientérico, en el control de los reflejos de la motilidad [Timmermans et al., 2001]. Debido a su papel crítico en las actividades fundamentales del tracto gastrointestinal, el SNE es absolutamente esencial para todas las etapas de la vida postnatal. Por lo tanto, los ratones que carecen del SNE en todo el tracto gastrointestinal [Southard-Smith et al., 1998] o en determinadas regiones, tales como el esófago [Guillemot et al., 1993] o el intestino delgado e intestino grueso [Schuchardt et al., 1994; de Graaf et al., 2001], por lo general mueren dentro de las primeras 24 horas de vida.

3. Origen embrionario.

El SNE deriva de la cresta neural, una estructura transitoria que se extiende a lo largo del eje rostro-caudal en el embrión de vertebrados en desarrollo [Yntema y Hammond, 1954; Le Douarin y Teillet, 1973]. Las células derivadas de la cresta neural comprenden una población heterogénea de células progenitoras migratorias que parten del tubo neural dorsal durante la embriogénesis. Las células de la cresta neural, que incluyen células madre de la cresta neural, siguen rutas de migración estereotípicas para colonizar lugares embrionarios específicos y generar así un rango de células derivadas diferentes, tales como, las neuronas y la glía del SNE y de los ganglios autónomos y sensoriales del SNP, las células de Schwann, los melanocitos, las células cromafines de la médula adrenal y gran parte del tejido conectivo y esquelético de las estructuras craneofaciales (Figura 2) [Le Douarin y Dupin, 2003].

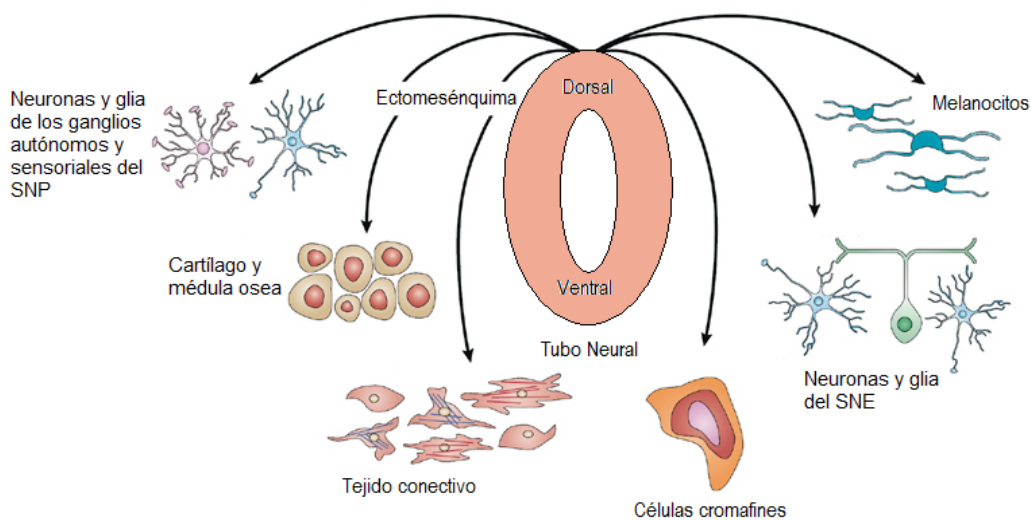


Figura 2. Migración de las células de la cresta neural hacia diferentes tipos celulares. Modificado de Knecht y Bronner-Fraser, 2002.

El origen del SNE a partir de la cresta neural fue sugerido por primera vez por Yntema y Hammond (1954). En una serie de estudios basados en la ablación, Yntema y Hammond demostraron que en ausencia de la cresta neural, el SNE no desarrolla un intestino histológicamente normal. Estos resultados fueron confirmados más tarde por Le Douarin y Teillet (1973) utilizando quimeras pollo-codorniz. Las células de la cresta neural de codorniz fueron injertadas en embriones de pollo antes de la migración, y como resultado se observaron neuronas de codorniz y células gliales en el intestino de los embriones de pollo injertados, apoyando el origen del SNE en la cresta neural [Le Douarin y Teillet, 1973]. Estudios de linaje celular revelaron un origen similar para el SNE de mamíferos (ratón) [Šerbedžija et al., 1991]. Sin embargo, a pesar que las células de la cresta neural son producidas a partir de toda la longitud del eje neural, sólo ciertas regiones bien definidas dan lugar al SNE, concretamente la región vagal y sacra (Figura 3).

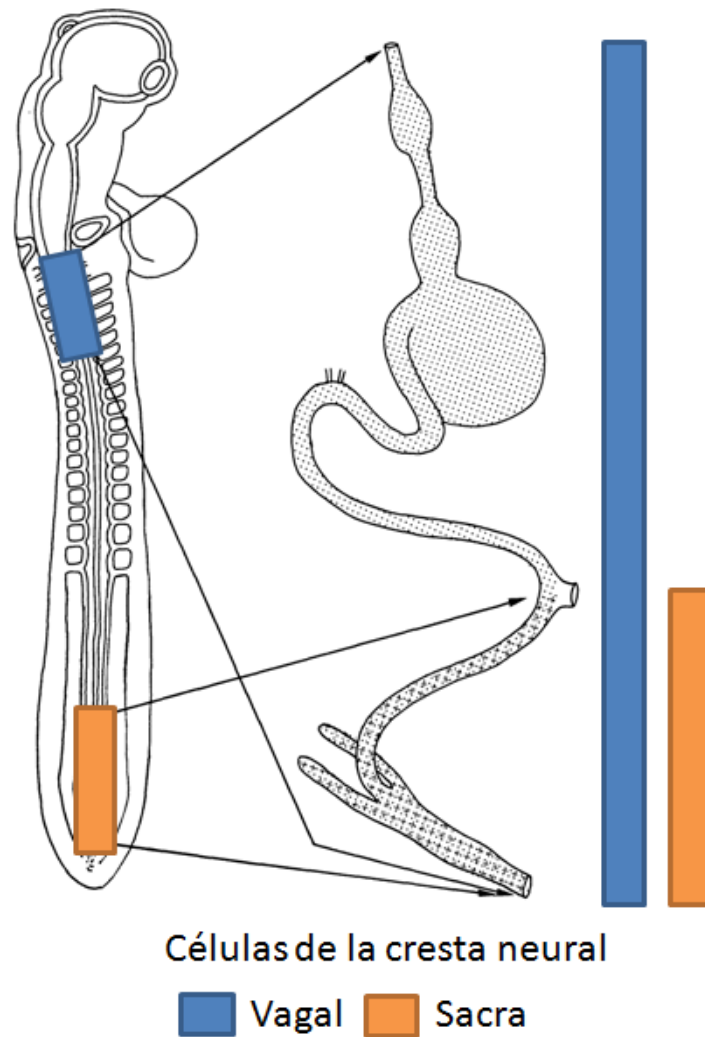


Figura 3. El diagrama muestra el nivel anterior y posterior del eje neural embrionario de pollo donde se originan las células ganglionares entéricas. Los neuroblastos que surgen del nivel anterior (comprendido entre el somita 1 y 7) colonizan la totalidad del intestino. Además, aquellos neuroblastos situados en la región posterior al somita 28, contribuyen solo a la formación de los ganglios postumbilicales. La cresta neural de la región cervical y dorsal (desde el somita 8 al 28) no proporciona células ganglionares entéricas. *Modificado de Le Douarin y Teillet, 1973.*

Contribución de la cresta neural vagal al SNE.

La identificación de la cresta neural vagal, como la principal fuente de células del SNE, se logró realizando ablaciones selectivas en embriones de pollo a diferentes niveles axiales [Yntema y Hammond, 1954].

Hoy en día se sabe que la cresta vagal es el único nivel axial que proporciona precursores para la totalidad del tracto gastrointestinal [Yntema y Hammond, 1954; Epstein et al., 1994]. Ubicados a nivel de los somitas 1-7, la cresta vagal integra las células madre de la cresta neural que dan lugar a la mayoría de las neuronas y células gliales del SNE [Yntema y Hammond, 1954; Le Douarin y Teillet, 1973; Newgreen, 1979; Durbec et al., 1996].

El tiempo de colonización del intestino embrionario por las células de la cresta neural vagal ha sido analizado usando marcadores celulares y líneas transgénicas. Estos estudios demostraron que los progenitores vagales del SNE, llamados células madre de la cresta neural pre-entérica, se desprenden del tubo neural entre el día embrionario E8.5-9 en ratones, e inician la migración, primero ventralmente y luego ventromedialmente, hasta que entran en el intestino anterior el día E9.5. Una vez dentro del intestino, las ahora denominadas células madre de la cresta neural entérica se expanden por el intestino medio y se aproximan a la unión ileocecal el día E10.5. El día E11.5 han pasado el ciego y el E12.5 han entrado en el intestino posterior. La colonización se completa

alrededor de E14.5 cuando las células de la cresta neural entérica llegan al final del intestino posterior. En este punto, las células de la cresta neural entérica vagal se mezclan con células de origen sacro que están migrando caudo-rostralmente [Kapur et al., 1992; Young et al., 1998, 1999; Druckenbrod y Epstein, 2005; Anderson et al., 2006a].

Contribución de la cresta neural sacra al SNE.

La cresta neural vagal no es la única fuente de células para el SNE. Una combinación de estudios de linaje celular utilizando injertos pollo-codorniz, el marcador retrógrado fluorescente Dil (1,1'- dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianinaperclorato) y retrovirus demostraron que algunas células que colonizan el SNE derivan de la cresta neural a nivel del sacro [Le Douarin y Teillet, 1973; Šerbedžija et al., 1991; Pomeranz et al., 1993; Burns y Douarin, 1998]. Del mismo modo, diversos estudios, utilizando modelos de animales transgénicos, revelaron que se trata de una contribución menor pero adicional [Kapur, 2000; Anderson et al., 2006b].

La cresta neural sacra se encuentra caudalmente a nivel del somita 28 en aves y el somita 24 en ratones y sólo coloniza el intestino post-umbilical [Le Douarin y Teillet, 1973; Burns y Douarin, 1998]. El tiempo de llegada de las células de la cresta neural sacra, al intestino grueso y sus fenotipos derivados, ha sido examinado tanto en embriones de pollo como de ratón. Inicialmente, las células de la cresta neural sacra migran

ventralmente para poblar el mesénquima pélvico y el nervio de Remak (único en las aves), y luego hacen una pausa en su migración fuera del intestino posterior. Tras la llegada de las células de la cresta neural entérica vagal, los progenitores sacros invaden el intestino posterior (aproximadamente el día E7.5 en aves y E13.5 en ratones) contribuyendo a la colonización de la región distal del intestino [Burns y Douarin, 1998; Kapur, 2000; Anderson et al., 2006b]. Las células de la cresta neural sacra dan lugar también a neuronas y células gliales, pero en comparación con la cresta neural vagal, la proporción es pequeña y disminuye rostralmente [Burns y Douarin, 1998].

Durante las primeras etapas de la migración, las células de la cresta neural entérica se propagan a través del mesénquima, pero poco después de colonizar una región, forman una capa estrecha entre la musculatura longitudinal y circular, el esbozo del plexo mientérico. Por el contrario, sólo 2-3 días después, surge una migración secundaria centrípeta desde células locales mientéricas para formar el plexo submucoso [Gershon et al., 1980; Kapur et al., 1992; Jiang et al., 2003].

Las células de la cresta neural entérica además de migrar lejos de los puntos de entrada del intestino y extenderse de manera uniforme a través de él, responden a fuertes señales de proliferación aumentando su número drásticamente [Gianino et al., 2003].

El desarrollo del SNE es un proceso complejo y asincrónico, basado en el control de la migración celular, la proliferación y la diferenciación de células de la cresta neural entérica y su progenie de forma controlada espacio-temporalmente. El control adecuado de estos procesos celulares es absolutamente esencial para la formación de un SNE funcional.

II. Las células intersticiales de Cajal.

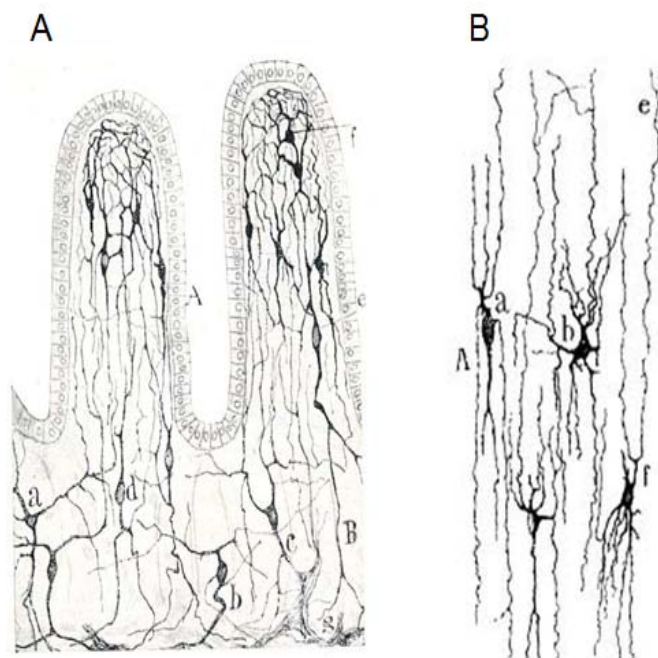
El neuroanatómico español Santiago Ramón y Cajal describió una red de células anastomosadas en la pared intestinal y examinó la posición intersticial de estas células entre las terminaciones nerviosas y las células musculares lisas [Cajal 1892, 1893], posición no casual, sino incluso estratégica. Tanto en los humanos como en el resto de mamíferos, las células intersticiales de Cajal (ICC) son unas células con largas prolongaciones ramificadas que se organizan en redes asociadas a los plexos del SNE. A lo largo de la pared intestinal, existen variaciones características en cuanto a su organización y estructura según su distribución entre las diferentes regiones del intestino y las especies [Fausone-Pellegrini, 1987a, 1987b, 1992; Christensen, 1992; Christensen et al., 1992; Komuro et al., 1996; 1999; Fausone-Pellegrini y Thuneberg 1999; Rumessen y Vanderwinden 2003].

El desarrollo de la historia de las ICC, desde 1860 hasta la actualidad, viene dado por la aplicación de métodos específicos y la elección adecuada de las muestras biológicas. A continuación, se describen en relación con las ICC, los acontecimientos más importantes ordenados cronológicamente [Pei-Lin, 1940; Thuneberg, 1999 review; Fausone-Pellegrini, 2005 review; García-López et al., 2009 review], indicando incluso comentarios textuales de los distintos autores.

1. Concepto y revisión histórica.

Entre 1889 y 1911, Santiago Ramón y Cajal (premio Nobel en 1906) publica una serie de artículos dedicados al SNE donde describe a un nuevo tipo celular, clasificado por él cómo *neuronas primitivas accesorias*. Aparte del plexo de Auerbach y el plexo de Meissner, Cajal localiza en las paredes del intestino de rana [Cajal, 1892] y mamíferos [Cajal, 1893], otros tres plexos más: el plexo muscular profundo, el plexo periglandular y los plexos intravellosos; descubrimientos de gran interés y poco destacados en la obra de Cajal (Figura 5). Primero con el método de Golgi y posteriormente con la tinción vital de azul de metileno, Cajal describe unas “*células fusiformes ó triangulares de pequeña talla, pobres en protoplasma, del cual parten varias expansiones varicosas, larguísimas y de ordinario ramificadas en ángulo recto*”.

Figura 5. Dibujos de Cajal sobre las ICC. [A] Mucosa intestinal de cobaya. Método de Golgi. Células nerviosas intersticiales (a-f) en las vellosidades y en el plexo periglandular. *Cajal, 1893*. [B] Plexo muscular profundo de rata *Cajal, 1911*.



No es hasta 1889, cuando Cajal escribe su primer artículo donde a estas neuronas primitivas accesorias las denomina *células intersticiales*. A su juicio, estas células debían ser de tal relevancia que en su biografía escribió:

"...mis estudios sobre el sistema nervioso simpático del intestino fueron tal vez no tan importantes, pero no menos importante fue haber visto a un nuevo tipo de células".

Sus contemporáneos no eran de la misma opinión, de tal manera que Van Gehuchten refirió que cuando Cajal describió estas células en la *3rd Reunión Anatomischen Geselleschaft* en Berlín (1889) *"solo provoco a su alrededor sonrisas de incredulidad"*.

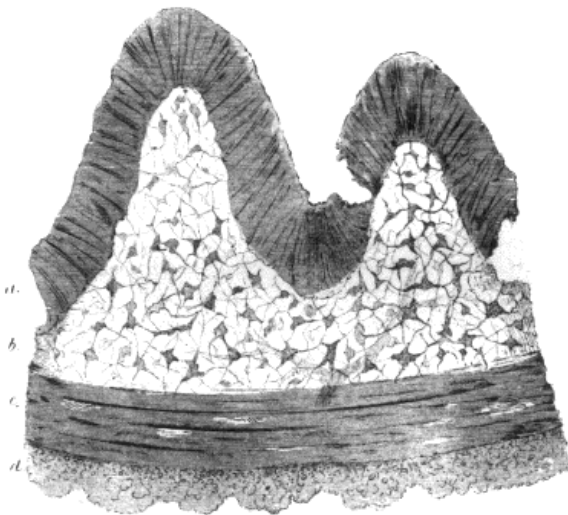
La naturaleza de las células intersticiales en este periodo de tiempo era motivo de controversia y se argumentaban dos puntos de vista contradictorios:

- Un grupo de investigadores las consideraban como *células del tejido nervioso*. En 1889, Cajal demostró la presencia de una red de neurofibrillas en estas células, con varicosidades en sus prolongaciones y un intenso marcaje al azul de metileno. Este hecho llevo a Cajal y su discípulo La Villa (1897) a considerarlas de carácter nervioso. Tras su intento fallido de demostrar alguna conexión con fibras nerviosas intrínsecas y extrínsecas, algunos autores utilizaban otros términos para denominar a estas células: según Schulz (1895)

y Müller (1920) eran células nerviosas simpáticas; para Bethe (1903) y Prentiss (1904) una red celular nerviosa periférica; o Tieggs (1925), quien describe una red de células nerviosas en la pared del intestino (aparentemente idénticas a las ICC), postula incluso que son el origen de la llamada contracción miogénica de la pared intestinal.

- Para un segundo grupo, sin embargo, las células intersticiales se correspondían con *células del tejido conectivo*. Wiegandt (1860) ya proporcionó una visión temprana de las neuronas intersticiales, más tarde descritas por Cajal (1889) en las vellosidades intestinales, bajo el nombre de células del tejido conectivo (Figura 6).

Figura 6. Dibujo de una vellosidad intestinal de rana. En el estroma veloso, células del tejido conectivo. *Wiegandt, 1860.*



Más tarde, Dogiel (1895) estaba convencido que las células intersticiales eran una clara e inequívoca confirmación de la existencia a nivel del intestino de un sincitio neuronal (Figura 7), pero por otro lado,

siendo incapaz de encontrar las neurofibrillas referidas por Cajal en estas células, y tras no observar ninguna conexión entre ellas y las fibras nerviosas del plexo entérico, al igual que Kolliker (1896), no descartaba la posibilidad que fueran células del tejido conectivo, en particular fibroblastos o macrófagos. A este mismo autor se le atribuye la denominación de célula intersticial de Cajal en honor a su descubridor.

Figura 7. Dibujo de las células intersticiales asociadas al plexo de Auerbach del intestino delgado de cobaya. Tinción con azul de metileno vital de Ehrlich. *Dogiel, 1895.*



Posteriormente, diversos autores tales como Huber (1897), Ebner (1889-1902), Heidenhain (1911), Kuntz (1922), Tello (1922), Johnson (1925) y Oshima (1929), quienes incapaces de encontrar las neurofibrillas en estas células, apoyaron el punto de vista de Dogiel, y defienden que se trata de un tipo especial de células del tejido conectivo. Es de resaltar, que los argumentos a favor de este punto de vista se basaron principalmente en resultados negativos.

Este debate paso a un segundo plano cuando por aquella época se especulaba sobre la naturaleza individual o sincitial de las neuronas. El primer artículo de Cajal sobre el Sistema Nervioso (1888) propone que las

neuronas finalizan libremente, y que ellas se conectan entre sí por contigüidad y no por continuidad. Esta observación relevante era la primera descripción de la llamada *teoría neuronal*:

“a pesar de tener una forma compleja, las neuronas son unidades independientes desde un punto de vista morfológico y fisiológico”.

Propuso que todas las células nerviosas estaban formadas por un cuerpo celular (soma), un axón y un gran número de prolongaciones (dendritas). Supuso que las neuronas se comunicaban entre sí de manera coherente y dedujo que las dendritas y los axones desempeñan un papel importante en el intercambio de información. En estos postulados se basa la denominada *teoría neuronal*, cuyos principios son totalmente opuestos a una segunda teoría vigente por aquellos entonces, la *teoría reticular*.

La teoría de la red, retículo terminal o reticular defendida por el anatómico alemán Von Gerlach (1873), y apoyada más tarde por Camilo Golgi, premio Nobel en 1906, era ampliamente aceptada por los neurólogos de la época. Según esta teoría, las prolongaciones protoplasmáticas de las células nerviosas, con sus divisiones y subdivisiones, se transforman sucesivamente en un gran número de fibrillas muy finas y delgadas que se anastomosan, primeramente entre ellas, y luego con las prolongaciones similares de las células nerviosas vecinas. De este modo resulta la formación de una red difusa y continua en toda la extensión de la sustancia gris, para cuya formación concurren todas las prolongaciones protoplasmáticas de las células nerviosas.

La primera descripción de Cajal sobre las ICC como neuronas era contradictoria con su doctrina neuronal, ya que fue incapaz de reconocer las terminaciones axonales en estas células que característicamente establecían una red típica. A este respecto, Cajal reconoció a posteriori:

“No soy ni exclusivo ni dogmático. Estoy orgulloso de mantener una flexibilidad mental que no tiene miedo de corrección. La discontinuidad neuronal, muy evidente en innumerables ejemplos, pueden sufrir algunas excepciones. Yo mismo he mencionado algunos de ellos, por ejemplo, las probablemente existentes en las glándulas, los vasos y los intestinos -mis neuronas intersticiales-”.

La mayoría de los documentos que examinan la naturaleza de las ICC en este período reflejan la lucha entre neuronistas y reticularistas. En una visión retrospectiva, el verdadero problema era que no existía un método disponible que permitiera observar los detalles necesarios para decidir si existían o no verdaderas redes sincitiales.

La única voz que dio crédito a Cajal fue la de Keith, premio Nobel en 1915 y descubridor del nodo sinoauricular, quien escribió en 1914-1915:

“Hace unos años retomé una investigación sobre la región íleo-cecal del intestino con el objetivo de arrojar más luz sobre este sistema de tejidos en los que los latidos del corazón se plantea, y por la que se propaga a lo largo de aurículas y ventrículos...”.

“...el intestino, debido a su estructura y modo de acción, parecía muy probable que revele información sobre la historia temprana de los sistemas nodales y haces de fibras del corazón...”

Keith, en sus estudios de la unión íleo-cecal del intestino de rata, puso de manifiesto la presencia de numerosas células ramificadas, no de naturaleza conectiva, cuyas prolongaciones se unían, por una parte, a las células musculares, y por otra, a las prolongaciones de las verdaderas células ganglionares. Él consideró a estas *células intermedias* “como la posible representación del tejido nodal del corazón”. Keith era, por lo tanto, el único que durante este periodo consideró a estas células de naturaleza muscular y tuvo la intuición que podrían “*constituir un sistema marcapasos en el músculo intestinal*”.

En 1925 surge el método de impregnación argéntica de Bielschowsky-Gros para el estudio de las formaciones finales del SNA. Con esta nueva técnica, en numerosas publicaciones se confunden las ICC con las células de Schwann. Woollard (1926), en su estudio sobre la inervación de los vasos sanguíneos, observó un tipo similar de red celular en los pequeños y grandes vasos. No hizo ningún comentario sobre la naturaleza de esta red celular, pero sí hincapié en el hecho que *las células ramificantes grandes* estaban estrechamente relacionadas con las fibras nerviosas amielínicas y que dichas células persistían después de la denervación por eliminación del tronco simpático.

Lawrentjew (1929) afirma haber demostrado neurofibrillas en estas células y se refiere a ellas como *lemnoblastos*. Considera a la red de células intersticiales como una estructura sincitial y sostiene que son la parte final de un tejido conductor protoplasmático del SNA (“als Endglieder einer protoplasmatischen Leitungsbahn des Autonomen Nerven systems”). Este concepto de lemnoblasto fue aceptado por muchos autores pero con algunas modificaciones. De igual manera, Lawrentjew descarta que las ICC sean células de Schwann argumentando que:

“las neurofibrillas toman complejas trayectorias desviadas alrededor de los núcleos en lugar de pegarse a un lado” y “si el citoplasma alrededor de un núcleo está lo suficiente intensamente impregnado, entonces la apariencia se convierte en una célula fusiforme o triangular con finas y largas terminaciones divergentes”.

Al mismo tiempo, Stoehr (1932) y sus alumnos Reiser (1933) y Riegele (1932) pensaban que estas células intersticiales eran idénticas a las células de Schwann y las interpretaban como un tejido (Leitgewebe) o un “plasmodio conductor” (Leitplasmodium) de fibras nerviosas periféricas, es decir, consideraban este tejido conductor junto con las fibras nerviosas embebidas en su protoplasma como un plasmodio terminal nervioso:

“Si las células pueden ser consideradas como neuronas, esta sería una cuestión de menor importancia”.

Schabadasch (1934), quien describió el plexo submucoso externo, mantiene la opinión que estas células pueden significar algo más que una mera célula de revestimiento (lemnoblasto).

Con la muerte de Cajal en 1934, la teoría neuronal pierde su principal defensor. Esto, junto con una escasez de nuevas pruebas en apoyo a la discontinuidad sináptica, hizo renacer a los reticularistas y con ello una serie de publicaciones en defensa de esta teoría. A destacar son las contribuciones de Boeke (1935), quien mientras admite la teoría lemnoblástica, compara las ICC con las células ganglionares primitivas de los invertebrados como originariamente sugirió Cajal.

La primera tesis doctoral sobre las ICC fue escrita por un discípulo de Boeke, Leeuwe en 1937, en donde se demuestra por un lado, la naturaleza ganglionar de las ICC (las células intersticiales son por lo general bien teñidas con azul de metileno, mientras que las células de Schwann no), y por otro, se revela las conexiones sincitiales de estas células, no solo con las células ganglionares ordinarias, sino también con todas las formas de transición entre las ICC y dichas células ganglionares. Meyling (1938) no solo apoya la evidencia de Leeuwe sino que además presupone su carácter sensitivo o motor.

En 1940, Li describió, claramente y por primera vez, una subdivisión en la capa muscular circular del intestino delgado, en donde dos redes celulares estaban presentes: una, entre la capa longitudinal y circular (las

ICC del plexo mientérico); y otra, situada a nivel de la capa de musculatura circular originando una subdivisión en ella (las ICC del plexo muscular profundo). En su opinión, estas redes estaban compuestas por *"una verdadera estructura sincitial formada por células intersticiales de Cajal con sus numerosas prolongaciones en anastomosis"*.

Más tarde, Nonidez (1944) en su artículo "El estado actual de la Teoría Neuronal" presenta una sobria explicación de la lucha entre ambas teorías. Defensor del reticularismo, sin embargo, escribe:

"Si bien es cierto que, sin duda, ejemplos de la continuidad de las células ganglionares se puede encontrar especialmente en los plexos entéricos, las llamadas células intersticiales..."

Después, el fisiólogo Ambache (1947) demostró que las ondas lentas eléctricas ejercían una función de regulación sobre las contracciones intestinales, es decir, existía una actividad marcapasos intestinal:

"...el tejido que tiene más probabilidad de estar involucrado es la red de nervios que se presentan rodeando al plexo de Auerbach y en los intersticios del músculo liso".

En este periodo, además de los métodos de tinción que ya se han mencionado, los métodos de Champy y Champy-Maillet (ácido ósmico/potasio y ácido ósmico/yoduro de zinc) se utilizaron ampliamente. Dado que estos métodos fueron excelentes para el tejido nervioso

periférico, muchos investigadores confirmaron que las ICC co-marcadas eran neuronas, por ejemplo, “las células intersticiales autonómicas” de Meylin en 1953. Tal vez la razón por la cual Keith en 1925 (células intermedias) y más tarde Feyrter en 1951 (células intercaladas) llegaron a una conclusión totalmente contraria, fuera el uso no específico de métodos de tinción, donde la naturaleza de células individualizadas no podía ser reconocida.

Hasta la fecha, las neuronas intersticiales de Cajal fueron consideradas de escaso interés y prácticamente olvidadas. En realidad, el verdadero problema es que hasta 1960 no llegó a existir ni los métodos ni los instrumentos que pudieran ayudar a esclarecer la naturaleza de estas células.

Hacia 1960, la realidad de las neuronas y sus conexiones sinápticas fue establecida por criterios ultraestructurales, y las células intersticiales fueron relegadas a fibroblastos o células de Schwann. Algunas razones por la cual existía esta corriente de desconocimiento era por ejemplo, la dificultad que suponía correlacionar los resultados observados en microscopía óptica y electrónica, sobre todo en aquellos tejidos donde residían tanto ICC como los auténticos fibroblastos, o bien, la incapacidad de preservar las ICC con los métodos de fijación existentes hasta el momento.

En los siguientes años son tres los nombres a destacar: el neurohistólogo francés Jacques Taxi, el neurohistólogo alemán Werner Stach, y el fisiólogo canadiense, farmacéutico y anatómico Edwin E. Daniel. La importancia de los estudios de Taxi radica en la combinación de una amplia experiencia en la identificación de las ICC al microscopio óptico con un alto nivel de conocimiento sobre microscopía electrónica. Basándose en los métodos utilizados por Cajal para la identificación de las ICC y en combinación con las pruebas ultraestructurales, Taxi distingue claramente las ICC de las neuronas, las células de Schwann, las células del músculo liso, los fibroblastos y los macrófagos. En 1965, Taxi llegó a la conclusión que las ICC eran un tipo celular separado, sugiriendo incluso una nueva designación "*célula neuronoide*", célula similar a las neuronas sólo por su tendencia a la co-tinción con los nervios. Simultáneamente, Richardson (1958) no encuentra evidencias ultraestructurales para apoyar que las ICC constituyen un vínculo definitivo entre los nervios y el músculo, y defiende que estas células son "*elementos del tejido conjuntivo, probablemente fibroblastos, en lugar de células nerviosas primitivas*".

Toda una serie de informes publicados en el período 1960-1970 apoyan esta conclusión, pero no fue hasta 1969, cuando Imaizumi y Hama estudiando la molleja del agaporni, y más tarde Yamamoto (1977) en sus estudios sobre el intestino delgado del ratón y el murciélago, se llegó a la conclusión que las ICC pueden desempeñar un papel en la transmisión de estímulos entre los axones y el músculo liso. Sugieren por tanto, que las

ICC puede estar estrechamente relacionadas con las células musculares lisas: derivándose de ellas o bien, ser células musculares lisas indiferenciadas o inmaduras.

Por el contrario, los trabajos de Stach y Daniel sirvieron de base para un renacimiento del interés por dichas células. Stach fue pionero en los estudios de las ICC en el colon y describe la organización de estas células en el borde de la submucosa con la capa de musculatura circular en la rata. En 1972, demuestra las relaciones íntimas entre los axones y las ICC del plexo submucoso, que al mismo tiempo tienen estrechos contactos con las células musculares lisas situadas en el borde de la capa muscular circular. En este mismo año manifiesta:

"Las células intersticiales de Cajal son un tipo particular de células musculares lisas...",

y más tarde especifica:

"Como células nerviosas o como células que forman parte de una formación final vegetativa, las células intersticiales de Cajal han jugado un papel muy importante en la discusión de la inervación del tejido efector. Como células de Schwann, su importancia, sin duda, paso a ser reducida; y bajo el papel de células del tejido conjuntivo (fibroblastos, macrófagos), perdió importancia casi en su totalidad. Como células específicamente inervadas y con relación inequívoca demostrada con las células musculares lisas del tracto gastrointestinal, el interés en ellas debe aumentar de nuevo".

Acerca de Eduardo Daniel, dos contribuciones en el 4th Simposio Internacional sobre motilidad gastrointestinal (1973) testificaron la participación de las ICC en los mecanismos de regulación miogénica: *“El plexo muscular profundo en el intestino delgado canino”* de Duchon, Herrera y Daniel; y *“Los mecanismos de acoplamiento”* de Oki y Daniel. En cuanto al plexo muscular profundo, algunos seguidores del laboratorio de Daniel confirmaron que, tanto la organización específica del plexo muscular profundo, como las ICC asociadas al mismo, son cruciales para la mediación de la inhibición no-adrenérgica y no-colinérgica de la capa muscular circular. A pesar del planteamiento anterior, otro investigador del grupo de Daniel, Duchon, las consideraba como *células de naturaleza híbrida*, un tipo celular separado que combina características ultraestructurales de células musculares y células de Schwann.

En la revisión de 1977 Daniel da un paso más y sugiere que las ICC asociadas al plexo muscular profundo:

“...claramente se colocan convenientemente para transmitir información mecánica, eléctrica o química entre la musculatura circular y los nervios. Tenemos un -órgano- el cuál: 1) Se coloca estratégicamente en serie entre las capas de musculatura circular, y si hubiera distensión o contracción muscular en términos de deformación; 2) podría transmitir ondas lentas o unos picos de actividad eléctrica desde las células de la musculatura circular, vía células híbridas, a los axones nerviosos, posiblemente utilizando un transmisor químico o el flujo de corriente; 3) podría igualmente transmitir información por la deformación de la célula

híbrida hacia los nervios y el músculo, y 4) podría responder a mediadores liberados por los nervios y transmitir esta información a las células musculares...”.

De gran importancia es la evidencia electrofisiológica de Daniel y Tomita a finales de este periodo donde se demuestran ondas lentas de máxima amplitud en el intersticio, entre la capa de musculatura longitudinal y circular. En 1981, Tomita discute el lugar de origen de dichas ondas:

“...es posible que algunas células particulares, las cuales se ubican entre las capas musculares, actúen como marcapasos de las ondas lentas y activen tanto a la musculatura longitudinal como a la circular...”

argumenta, además, que:

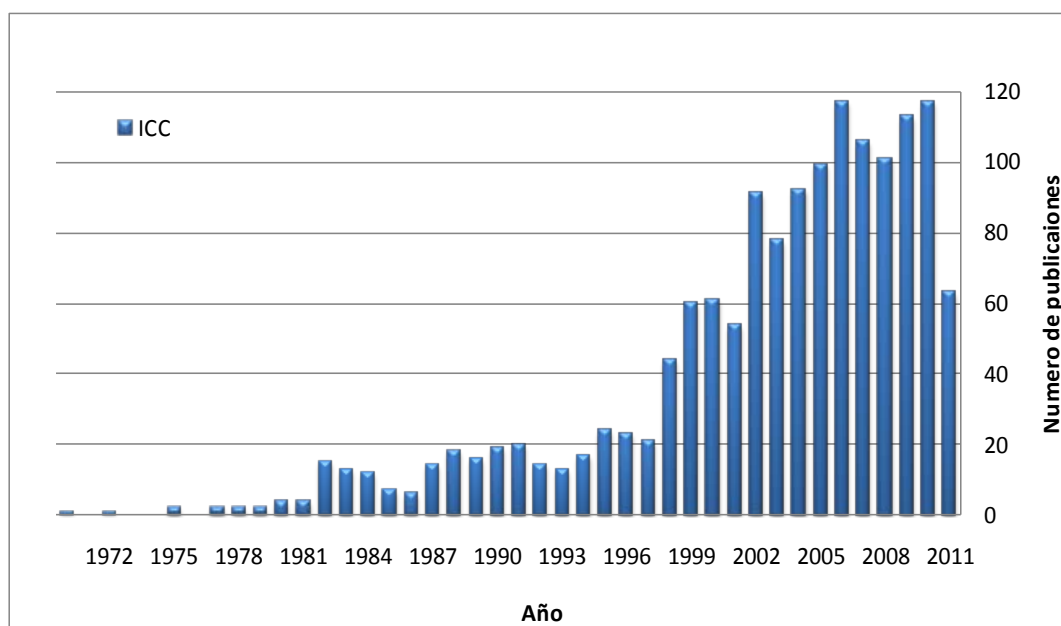
“...las discrepancias entre los resultados obtenidos con capas musculares separadas puede ser entendido, si estas células marcapasos se unen a una capa de músculo longitudinal o circular...”,

hipótesis más tarde confirmada por Suzuki en 1986 y Hara en 1986.

Paralelamente, se realizaron los primeros estudios a nivel ultraestructural de las ICC. La microscopía electrónica de transmisión (MET) aporta datos relevantes en cuanto a localización, características citoplasmáticas, contactos con otros tipos celulares o simplemente posición en el intestino [Faussonne-Pellegrini, 1987a; Thuneberg, 1982].

A pesar de la enorme división dogmática sobre la naturaleza de estas células, un hallazgo de gran trascendencia en relación con las ICC tuvo lugar en el siglo XX: el descubrimiento de la expresión del receptor tirosín-quinasa c-Kit por Maeda en 1992. El uso de este marcador específico permitió no solo identificar de forma inequívoca a las células intersticiales, sino también iniciar las investigaciones sobre el origen de estas células.

A partir del año 2000, el número de publicaciones acerca de las ICC se ha incrementado exponencialmente (Gráfica 1). El interés por estas células en los últimos años está basado en la ampliación de técnicas de análisis que permiten realizar estudios de inmunolocalización de proteínas, relacionar las ICC con patologías concretas o afianzar viejas ideas. La búsqueda de estas células fuera del tracto gastrointestinal así como el conocimiento de sus funciones en estas localizaciones son el objetivo de las actuales investigaciones.



Gráfica 1. Comparación del número de publicaciones sobre las ICC desde 1970 hasta la actualidad.

2. El receptor c-Kit.

El receptor c-Kit es esencial para el desarrollo y el mantenimiento de las ICC [Beckett et al., 2007].

En 1986, Besmer identificó un nuevo oncogén en el virus del sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4 (HZ4-FeSV) denominado v-Kit [Besmer et al., 1986]. Un año más tarde, el homólogo celular humano (c-Kit) fue identificado y caracterizado por Yarden y colaboradores [Yarden et al., 1987]. El gen c-Kit codifica el receptor c-Kit o CD117, una glicoproteína transmembrana de 145 KDa perteneciente a la clase III de los receptores tirosín-quinasa, estructuralmente similar al receptor del factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y al receptor del factor estimulante de colonias (CSF) [Pauls et al., 2005]. Este gen se localiza en el locus *white spotting* (W) del cromosoma 5 de ratón [Geissler et al., 1988] y en el brazo largo del cromosoma 4 (q12) de humanos [d'Auriol et al., 1988].

El ligando de c-Kit es el producto del locus *steel* (sl) que codifica el factor de células madre (SCF), también conocido como *stem cell factor*, ligando c-Kit, factor de crecimiento de los mastocitos o factor de acero [Martin et al., 1990]. Su gen se encuentra localizado en el extremo distal del cromosoma 10 de ratón y en el brazo largo del cromosoma 12 en humanos [Geissler et al., 1991].

El receptor c-Kit presenta un dominio extracelular responsable de la unión de su ligando específico, el SCF, y cinco motivos de repetición similar a las inmunoglobulinas; un dominio transmembrana simple y un dominio intracelular, que a su vez presenta una zona de unión al ATP y una zona catalítica (Figura 8). La unión del SCF al dominio extracelular promueve la dimerización de dos receptores, induciéndose la transfosforilación de los residuos de tirosina del dominio catalítico de ambos. Esta estimulación induce una fosforilación y una activación de diferentes rutas de señalización intracelular (como la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos -MAPK-), controlándose así la proliferación, apoptosis, diferenciación, adhesión y movilidad celular [Kitamura y Hitotab, 2004].

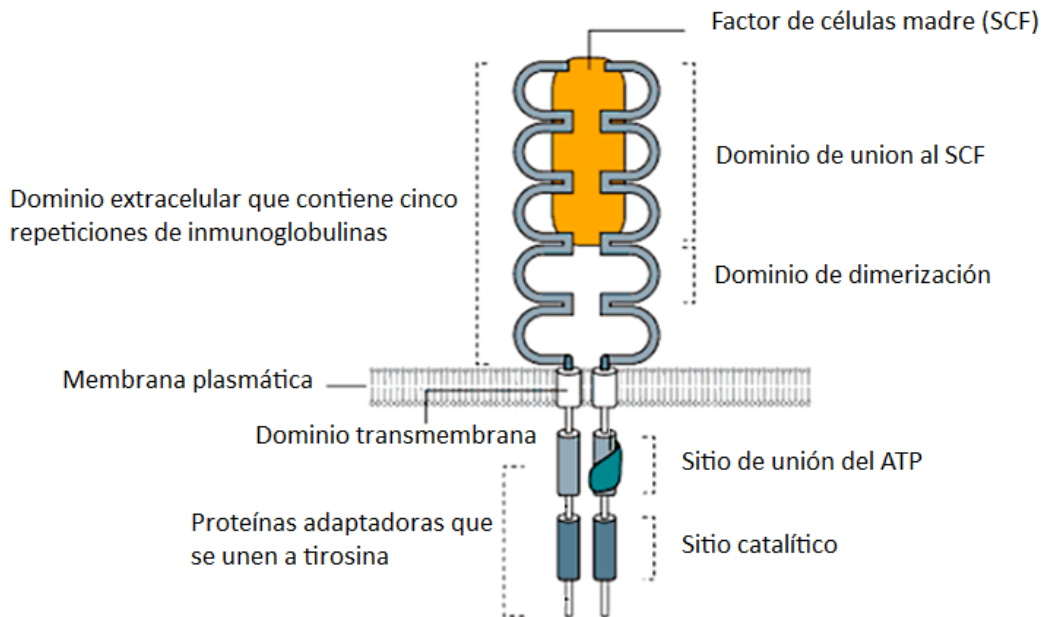


Figura 8. Estructura del receptor c-Kit. *Kierszenbaum. Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica. 2ª Edición. Elsevier. Barcelona. (2008).*

La expresión normal de c-Kit se observa en varios tejidos, incluyendo: mastocitos, células progenitoras y células madre hematopoyéticas, células intersticiales de Cajal [Maeda et al., 1992], melanocitos y células germinales [Miettinen y Lasota, 2005]. Varios tipos de mutaciones asociadas a una ganancia o pérdida de función se han asociado al locus *white spotting*, de tal manera que en el tracto gastrointestinal, la patología asociada más frecuente son los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) originados a partir de las ICC. Aparecen como resultado de una ganancia de función del receptor c-Kit, lo que provoca una activación constitutiva del receptor y de las subsiguientes vías de señalización intracelular que regulan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, lo cual confiere al clon celular las características de neoplasia [Nakahara et al., 1998].

3. Distribución en el tracto gastrointestinal.

Las ICC se han encontrado en todo el tracto gastrointestinal desde el esófago [Faussonne-Pellegrini y Cortesini, 1986; Torihashi et al., 1999] hasta el esfínter interno del ano en el hombre [Hagger et al., 1998]. Estas células muestran diferentes patrones de organización y características morfológicas dependiendo de su localización anatómica, de tal manera que de acuerdo con estos criterios se clasifican en varios subtipos (Figura 9) [Komuro, 2006]:

- a) Las ICC del plexo mientérico (ICC-MP). Se localizan entre la capa de musculatura longitudinal y circular. Son células multipolares con 3-5 prolongaciones primarias las cuales proyectan a su vez prolongaciones secundarias e incluso terciarias, que conectan con otras ICC formando una red alrededor del plexo mientérico (Figura 9A).

- b) Las ICC de la submucosa y del plexo submucoso (ICC- SM e ICC-SMP respectivamente). Se localizan en el tejido conectivo y en la capa de musculatura circular en contacto con la capa submucosa. Son células multipolares pero con pocas prolongaciones secundarias que se sitúan en paralelo con las células musculares adyacentes (Figura 9B).

- c) Las ICC del plexo muscular profundo (ICC- DMP). Se sitúan entre la capa de musculatura lisa circular interna y externa. Son células multipolares, pero la mayoría presentan unas prolongaciones unidireccionales que tienden a contactar con los haces nerviosos y las células musculares (Figura 9C).
- d) Las ICC intramusculares (ICC-IM) están localizadas en la propia capa muscular, tanto circular (ICC-CM) como longitudinal (ICC-LM). Las ICC-CM son células bipolares u ovaladas orientadas en paralelo a las células musculares lisas. Su distribución y densidad varía en función de la región del tubo digestivo en cuestión. Las ICC-CM del intestino delgado a menudo muestran prolongaciones secundarias y se localizan escasamente asociadas a los haces nerviosos. Por el contrario, las ICC-CM del estómago y el colon se presentan en forma de huso alargado y están densamente distribuidas a lo largo de los haces nerviosos. También se encuentran en los tabiques o septos del tejido conectivo donde han sido especialmente designadas como las ICC-SEP en la literatura [Horiguchi et al., 2001; Mazet y Raynier, 2004]. Las ICC-LM son similares en morfología pero generalmente menos numerosas en comparación con las anteriores (Figura 9D).

e) Las ICC de la capa serosa (ICC-SS). Este subtipo celular se restringe al tejido conectivo de la capa serosa. Son células poco numerosas y con una morfología fundamentalmente estrellada.

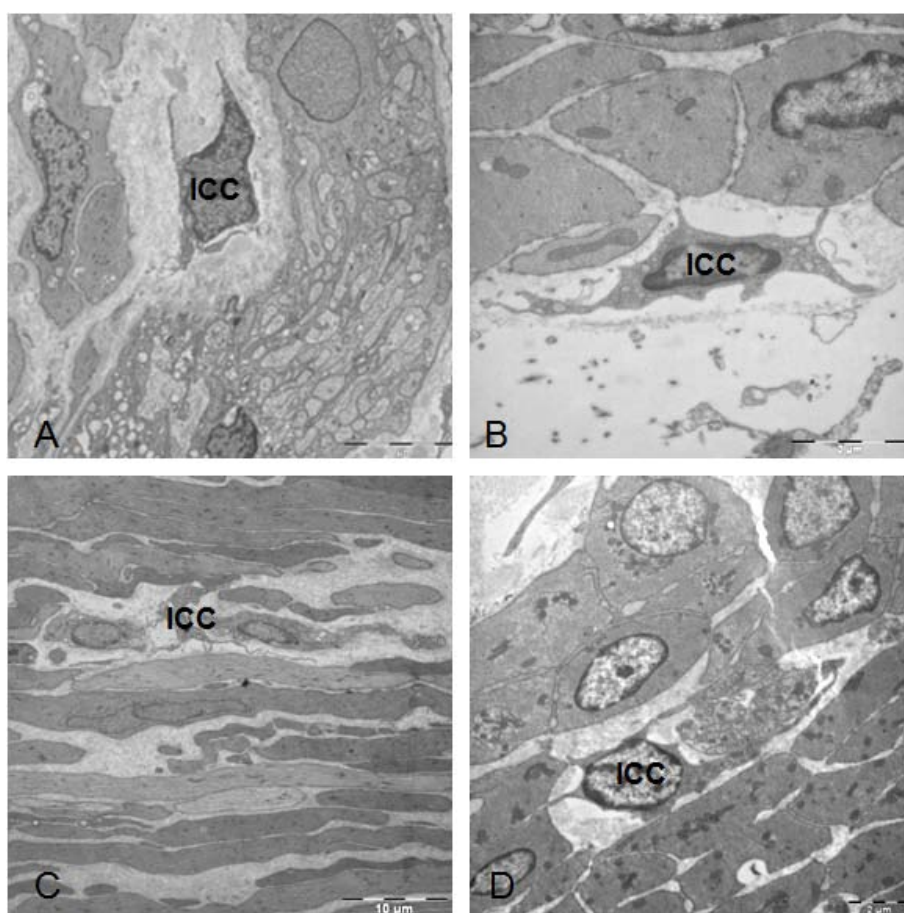
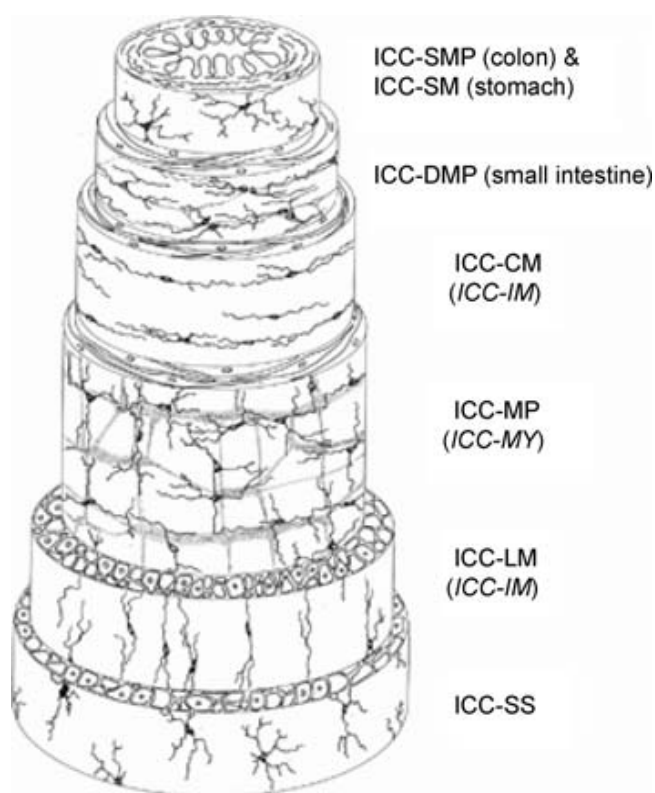


Figura 9. MET. Subtipos de ICC en función de su localización en la pared del tracto gastrointestinal. [A] ICC del plexo mientérico, [B] del plexo submucoso, [C] del plexo muscular profundo y [D] intramuscular.

La ubicación de los diferentes subtipos de ICC se muestra esquemáticamente en la figura 10.

Figura 10. Representación esquemática de los subtipos de ICC que se encuentran en las diferentes capas del tracto gastrointestinal. Células intersticiales de Cajal asociadas al plexo mientérico (ICC-MP), submucoso (ICC-SMP), y muscular profundo (ICC-DMP); a la capa submucosa (ICC-SM), muscular circular (ICC-CM), muscular longitudinal (ICC-LM) y serosa (ICC-SS). *Komuro, 2006.*



4. Funciones.

En los últimos veinte años se ha establecido firmemente el papel de las ICC en el tracto gastrointestinal. Los estudios morfofuncionales ligados a ensayos con animales mutantes han permitido hacer una clara distinción funcional de los subtipos de ICC. A día de hoy, son tres las funciones atribuidas a estas células: marcapasos intestinal, intermediarias en la neurotransmisión y mecano-receptoras; funciones versátiles que sin embargo, son objeto de periódicas revisiones por la comunidad científica debido a la aparición continua de datos relevantes en este campo.

4.1 Las células intersticiales de Cajal y su actividad como marcapasos.

El músculo liso gastrointestinal presenta contracciones rítmicas espontáneas en ausencia de estimulación neuronal y hormonal, las cuales están asociadas a sus funciones fisiológicas. El potencial eléctrico del músculo gastrointestinal es el producto de las contribuciones de dos tipos celulares acoplados eléctricamente, las células musculares lisas y las ICC [Sanders, 1996].

El objetivo principal de los estudios fisiológicos en los últimos veinte años ha sido conocer la naturaleza de las células generadoras de las ondas gastrointestinales. En estudios realizados en estómago e intestino delgado, y mediante microelectrodos y colorantes fluorescentes como el amarillo lucifer, se puso de manifiesto dos tipos de ondas gastrointestinales: los potenciales marcapasos y las ondas lentas (Figura 11). Con frecuencias similares, pero con orígenes distintos, los potenciales marcapasos se ha demostrado que se generan principalmente por las ICC, mientras que las ondas lentas por las células del músculo liso [Dickens et al. 1999; Hirst y Edwards, 2001; Kito y Suzuki 2003]. A nivel electrofisiológico, los potenciales marcapasos suelen preceder a las ondas lentas y en comparación con ellas, tienen mayor amplitud y mayor duración. Las ondas lentas, generadas en las células del músculo liso, son consideradas como el resultado de la propagación electrotónica pasiva de los potenciales marcapasos de las ICC-MP fundamentalmente [Kito y Suzuki, 2003].

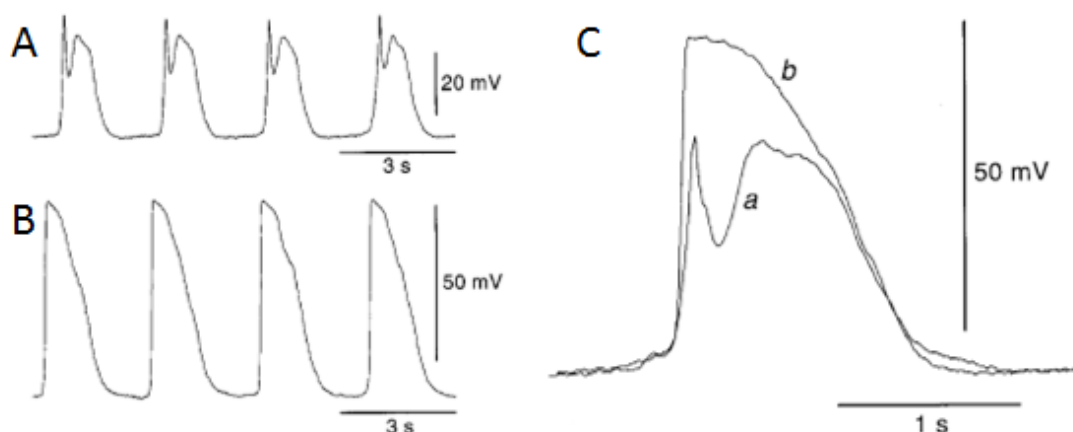


Figura 11. Ondas lentas y potenciales marcapasos registrados en el intestino delgado de ratón. [A] Sucesión de ondas lentas. [B] Sucesión de potenciales marcapasos. [C] Superposición de ondas lentas (a) y potenciales marcapasos (b) registrados a alta velocidad desde la misma preparación. *Modificado de Kito y Suzuki, 2003.*

Las ondas lentas se definen como despolarizaciones cíclicas de las células musculares lisas mediadas por mecanismos iónicos. Una onda lenta típica consiste en una despolarización rápida, una repolarización parcial y una meseta sostenida seguida de una repolarización progresiva y completa hasta restaurar el potencial de membrana en reposo. Dicho potencial, en las células musculares lisas del intestino y recogido en un baño de órganos, varía aproximadamente en el rango de -50 a -70 mV. El máximo potencial de membrana alcanzado durante una despolarización de ondas lentas varía de una especie a otra y de un tramo a otro del intestino, pero por lo general se encuentra entre -45 a -40 mV [Sarna, 2008].

La función de las ICC como generadoras de potenciales marcapasos fue sugerida por Keith en 1915, dada las similitudes con sus estudios sobre las células marcapasos en el nodo sinoatrial del corazón. Sin embargo, la primera evidencia sobre la implicación de las ICC en la generación de estos potenciales fue demostrada por Thuneberg en 1982: por medio de una ablación fotoquímica, y garantizando mediante azul de metileno la ausencia de ICC, observo un bloqueo en la actividad de los potenciales marcapasos [Thuneberg, 1982].

Otros estudios han sido fundamentales para confirmar el papel de las ICC y la implicación de cada subtipo en la generación de los potenciales marcapasos. Por ejemplo, el registro con un electrodo intracelular y la tinción con azul de metileno se usaron para confirmar que las ondas lentas sólo se observan en las células del músculo liso cuando las ICC están unidas a la capa muscular registrada [Suzuki et al., 1986]. Al mismo tiempo, el registro intracelular sobre la capa muscular longitudinal, circular interna y externa en el perro, gato, conejo, zorro y humano, demostró que las ICC-MP son la principal fuente de potenciales marcapasos en el intestino delgado [Hara et al., 1986]. Por el contrario, en el colon, la región marcapasos reside en la superficie submucosal de la capa de musculatura circular, ya que con la eliminación de las ICC-SMP se bloquea la generación de ondas lentas [Smith et al., 1987]. Sin embargo, la generación del potencial marcapasos no solo está mediada por las ICC-MP y las ICC-SMP. En el cuerpo gástrico de la cobaya, donde las ICC-MP están ausentes, la actividad marcapasos dominante, que a su vez origina

actividad en otras regiones del estómago, es proporcionada por las ICC-IM [Hashitani et al., 2005]. Con estos estudios pues, se determinó que únicamente ciertas subpoblaciones de ICC actúan como marcapasos intestinal.

Se conoce que la red de ICC responsable de la actividad marcapasos en cada región del tracto gastrointestinal está bien formada en el nacimiento. Esa ritmicidad eléctrica está claramente presente en el estómago y el intestino delgado proximal antes del nacimiento, pero se desarrolla poco después en el íleon y tras varios días en el colon. Este gradiente de desarrollo proximal-distal es difícil de explicar en base al examen microscópico, puesto que la red de células intersticiales parece estar bien desarrollada en todas las regiones al nacer. Sutiles diferencias en cuanto a la expresión de conductancias iónicas pueden ser las responsables del gradiente observado en el desarrollo de la actividad marcapasos [Ward et al., 1997].

Mecanismos responsables de la actividad marcapasos.

Los canales iónicos expresados en la membrana plasmática de las ICC e implicados en la generación de los potenciales marcapasos son fundamentalmente canales de calcio de tipo L y T [Huizinga et al., 1991; Koh et al., 1998; Lee et al., 1999; Sanders et al., 2000, Boddy y Daniel, 2005]. Otros tipos de canales los cuales también participan en este proceso son los canales de cloro activados por calcio, canales catiónicos

no selectivos que intercambian principalmente iones sodio y calcio [Farrugia, 1999; Huizinga et al., 2004] y canales de potasio activados por calcio SK3 [Fujita et al., 2001].

Aunque el mecanismo de generación de la actividad marcapasos ha sido origen de gran controversia, el papel del calcio intracelular en la generación de dicha actividad ha sido ampliamente demostrado [Nakayama et al., 2007]. Por ejemplo, en el estómago de cobaya, registros simultáneos del calcio intracelular y la actividad eléctrica en las ICC puso de manifiesto que las oscilaciones del calcio intracelular se sincronizan con los potenciales marcapasos, indicando la estrecha relación que existe entre ambos procesos. Estudios similares fueron también realizados en las ICC del estómago de ratón y en la uretra de conejo [Liu et al., 2005a, 2005b; Johnston et al., 2005].

Los niveles de calcio intracelular están regulados por la entrada de calcio extracelular y la liberación/absorción desde los reservorios intracelulares (mitocondrias y retículo sarcoplásmico). La importancia específica de este ión se ha demostrado mediante experimentos donde se ha reemplazado el calcio extracelular por magnesio, observándose un cese en las oscilaciones de calcio intracelular y con ello los potenciales marcapasos de las ICC [Torihashi et al., 2002; Johnston et al., 2005].

Sanders y colaboradores en 2006 sugieren la denominada “unidad marcapasos”, compuesta por reservorios de calcio operados por inositol

1,4,5-trifosfato (IP₃), las mitocondrias adyacentes y los canales iónicos en la membrana plasmática de las ICC; los cuales forman la estructura básica para generar la corriente marcapasos (Figura 12).

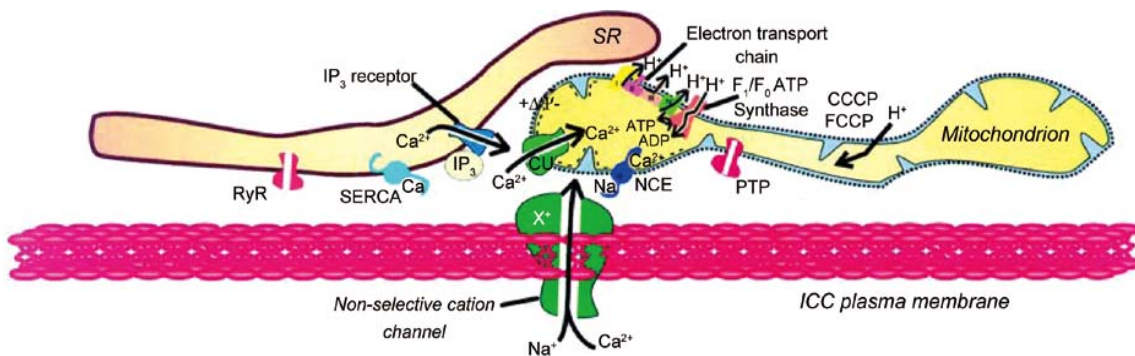


Figura 12. Mecanismo de corriente marcapasos llevado a cabo por canales de cationes no selectivos. Modelo denominado “unidad marcapasos” compuesto de retículo sarcoplásmico, mitocondrias y canales de cationes no selectivos en la membrana plasmática de las ICC. *Sanders et al., 2006.*

El origen de esta corriente se inicia por la liberación de calcio desde los reservorios operados por IP₃, por ejemplo del retículo sarcoplásmico y, a continuación, la alta concentración de calcio intracelular produce la absorción de este ión por las mitocondrias adyacentes. La depleción de calcio cercano a la membrana plasmática de las ICC activa a canales catiónicos no específicos, se crea una corriente hacia el interior y se genera entonces el potencial marcapasos. En este proceso, se considera una importante premisa el intercambio de calcio entre las reservas de calcio y las mitocondrias adyacentes [Ward, 2000].

4.2 Mediadoras de la neurotransmisión.

El *cómo* los nervios transmiten sus señales para regular la actividad del músculo liso es fundamental para la fisiología entérica. Desde el punto de vista tradicional de la neurotransmisión, las varicosidades nerviosas motoras liberan neurotransmisores que actúan sobre receptores en el músculo liso causando su contracción o relajación. Sin embargo, en los últimos años, la vieja hipótesis que ciertas ICC pueden transducir señales neuronales a las células musculares lisas ha sido resucitada. Esta hipótesis está basada en múltiples evidencias, como la cercanía y presencia de sinapsis entre las varicosidades nerviosas y las ICC, las uniones gap entre las ICC y las células musculares, y la relación entre los receptores de membrana de las ICC y las vías de señalización de los neurotransmisores [Daniel y Posey-Daniel, 1984].

Varios estudios han confirmado la relación biológica y funcional que existe entre las ICC y las fibras nerviosas entéricas [Daniel y Posey-Daniel, 1984; Ward, 2000; Ward y Sanders, 2001]. Concretamente múltiples evidencias inmunohistoquímicas y funcionales reflejan la contribución fundamental de las ICC-IM y las ICC-DMP en la neurotransmisión [Toma et al. 1999].

Evidencias inmunohistoquímicas.

Las ICC poseen una gran variedad de receptores para determinados neurotransmisores. Fibras nerviosas marcadas con neurotransmisores de neuronas motoras excitatorias, tales como el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) y la sustancia P, están estrechamente asociadas a los cuerpos celulares y a las prolongaciones de las ICC-IM en el estómago [Beckett et al., 2003; Horiguchi et al., 2003] y con las ICC-DMP en el intestino delgado [Lavin et al., 1998; Faussonne-Pellegrini, 2006]. De la misma forma, muchas neuronas motoras inhibitorias, que contienen la óxido nítrico sintasa (NOS) y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), están estrechamente vinculadas tanto con el cuerpo celular como con las prolongaciones de las ICC-IM [Ward, 2000; Beckett et al., 2003; Horiguchi et al., 2003] y las ICC-DMP [Toma et al., 1999; Wang et al., 1999]. Estos datos demuestran que las ICC están densamente inervadas por neuronas motoras entéricas excitadoras e inhibitorias. Adicionalmente, diferentes receptores para ciertos neurotransmisores son expresados por las ICC (Tabla 1).

Receptors	ICC location	References
5-HT, 5-HT ₃ , 5-HT ₄ subtypes	ICC-MY ICC-DMP	Glatzle et al. (2002); Liu et al. (2005); Poole et al. (2006);
Bombesin, subtype-3	Almost in all ICC	Porcher et al. (2005)
Cholecystokinin A	ICC	Patterson et al. (2001)
G protein-coupled, Protein Kinase A (PKA), Protein Kinase C (PKC)	ICC	Southwell (2003); Poole et al. (2004)
Muscarinic acetylcholine, M ₂ , M ₃ subtypes	ICC-IM, ICC-MY ICC-DMP	Epperson et al. (2000); Iino and Nojyo (2006)
Neurokinin, NK ₁ , NK ₃ subtypes	ICC-IM, ICC-MY ICC-DMP	Sternini et al. (1995); Grady et al. (1996); Portbury et al. (1996); Lavin et al. (1998); Epperson et al. (2000); Iino et al. (2004)
Purinergic, P ₂ Y ₁ , P ₂ Y ₄ subtypes P ₂ X ₂ , P ₂ X ₅ subtypes	ICC-IM, ICC-MY, ICC-DMP	Burnstock and Lavin (2002); Van Nassauw et al. (2006); Chen et al. (2007)
Somatostatin 2A	ICC-DMP	Sternini et al. (1997)
VIP	ICC-IM, ICC-MY	Epperson et al. (2000)
VPAC1 subtype		

Tabla 1. Receptores de diversos neurotransmisores expresados en las ICC. *García-López et al., 2009.*

Evidencias funcionales.

La prueba funcional más directa para el papel primordial de las ICC en la neurotransmisión motora entérica proviene de experimentos realizados en estómagos de ratones mutantes W/W^V que carecen de las ICC-IM. En ausencia de este subtipo de ICC, las respuestas neuronales postsinápticas a la neurotransmisión excitatoria colinérgica e inhibitoria nitrérgica estaban ausentes o muy atenuadas en las capas musculares circulares del fundus y el antro gástrico [Ward, 2000; Beckett et al., 2003; Suzuki et al., 2003].

Sin embargo, a día de hoy, existen pocos datos sobre cómo los impulsos nerviosos son transmitidos desde las ICC-IM a las células musculares lisas. Aunque inicialmente las uniones gap fueron propuestas para participar en este proceso, la investigación reciente utilizando bloqueantes de uniones gap sugiere que no son necesarias para la

transmisión o estimulación nerviosa a la musculatura circular [Daniel, 2004; Daniel et al., 2007].

4.3 Sensores de estiramiento: mecano-receptoras.

El tracto gastrointestinal sufre considerables cambios de tamaño durante el periodo digestivo e interdigestivo. Las respuestas motoras a los cambios de volumen del estómago o el intestino han sido atribuidas a respuestas neurales mediante reflejos locales y vagales, que facilitan, por ejemplo, la acomodación gástrica y el incremento de las contracciones peristálticas [Paton y Vane, 1963].

La hipótesis sobre una función mecano-receptora de las ICC ha sido propuesta en varias ocasiones, basada en la existencia de unas estructuras especiales llamadas uniones *peg and socket*, que pueden representar la parte de las células musculares más vulnerables a tal tensión [Fausson-Pellegrini y Thuneberg, 1999]. Estas uniones *peg and socket* consisten en un *gancho* de 0,5 a varios micrómetros de largo, que se extiende desde una ICC o célula del músculo liso hacia un *bolsillo* estrecho o invaginación de la membrana plasmática de otra célula muscular lisa vecina o ICC, excluyendo los componentes del tejido conjuntivo en el espacio entre las membranas fuertemente adosadas (Figura 13). La morfología y la orientación fija de estas estructuras sugiere que ellas podrían servir de sensores de estiramiento mecánico, regulando el acoplamiento del

músculo liso/célula intersticial y la sensibilidad interna de la capa muscular a tal estiramiento [Fausone-Pellegrini y Thuneberg, 1999].

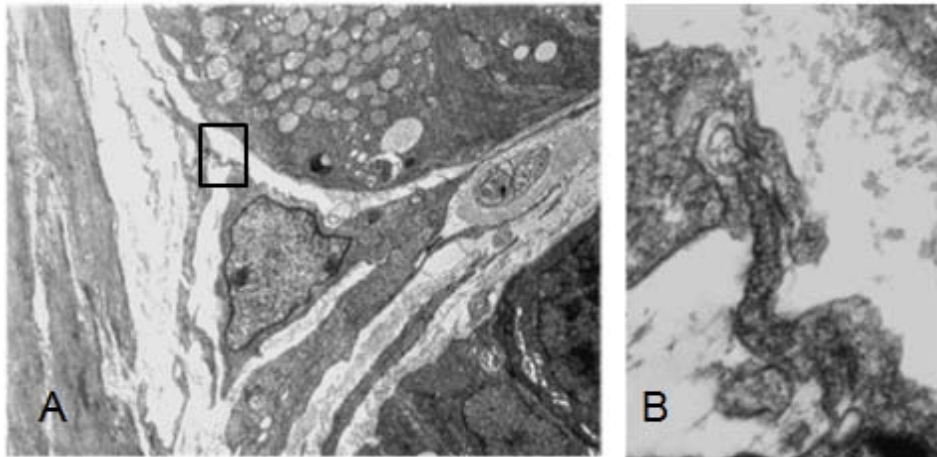


Figura 13. [A] Unión *peg and socket* entre una ICC y la prolongación de otra en la base de las criptas intestinales. [B] Detalle de la anterior.

La mayoría de los datos que apoyan el papel de las ICC como mecano-receptoras se basan en estudios morfológicos [Thuneberg, 1982, 1999]. Sin embargo, la prueba fisiológica más sólida, que apoya el funcionamiento de las ICC como sensores de estiramiento, se obtuvo mediante la aplicación de variaciones en la longitud de los músculos antrales murinos, mientras paralelamente se registraba la actividad eléctrica intracelular y la fuerza isométrica [Won et al., 2005]. La hipótesis subyacente es que la ingestión de alimento extiende el antro y por consiguiente, las ICC-IM reciben ese estiramiento. El incremento en la longitud causa una despolarización en la membrana y un incremento en la frecuencia de los potenciales marcapasos. La base de esta hipótesis es que esta respuesta no aparece en ratones mutantes W/W^V donde las ICC-IM estaban ausentes.

En resumen, estos datos sugieren que las ICC-IM parecen coordinar las respuestas mecano-receptoras en donde las uniones *peg and socket* juegan un papel fundamental.

5. Origen embrionario.

El origen de las ICC se planteaba ya en la obra de Cajal quien aventuro una naturaleza neuronal para estas células, puesto que al igual que las neuronas, se teñían con azul de metileno y cromato de plata y además, formaban relaciones íntimas con los nervios. Dicha naturaleza ha sido debatida desde el siglo pasado y hasta hace relativamente poco tiempo.

Existen dos teorías para explicar el origen embrionario de estas células: para algunos autores las ICC provienen del mesénquima esplacnopleural, mientras que para otros, de la parte ventral del tubo neural (células VENT). Existen una gran cantidad de experimentos a favor de ambas teorías y además, como las ICC poseen características comunes con las células de la cresta neural (neuronas y glía) y con células derivadas del mesénquima (fibroblastos y células musculares lisas), hacen que a día de hoy sean aceptadas ambas.

5.1 Precursor mesenquimal.

Los primeros en demostrar que las ICC en el intestino de aves no proceden de la cresta neural fueron Lecoin y colaboradores [Lecoin et al., 1996]. A partir de trabajos anteriores en los que demostraron que era posible distinguir el núcleo de una célula de codorniz y de pollo [Le Douarin, 1973], construyeron quimeras pollo-codorniz en las cuales los tubos neurales a nivel del vago de embriones de pollo eran reemplazados por tubos neurales a nivel de vago de embriones de codorniz, siempre en estados embrionarios equivalentes (Figura 14). Los embriones quimeras se dejaban crecer durante semanas, se extraía el intestino y se procedía a determinar si algunas de las células de codorniz eran positivas al c-Kit. Aunque existían numerosas células c-Kit positivas rodeando los ganglios mientéricos de las quimeras (se corresponden con las ICC), ninguna mostraba las características nucleares interfásicas de las células de codorniz, luego las células c-Kit positivas no habían derivado de la cresta neural [Lecoin et al., 1996].

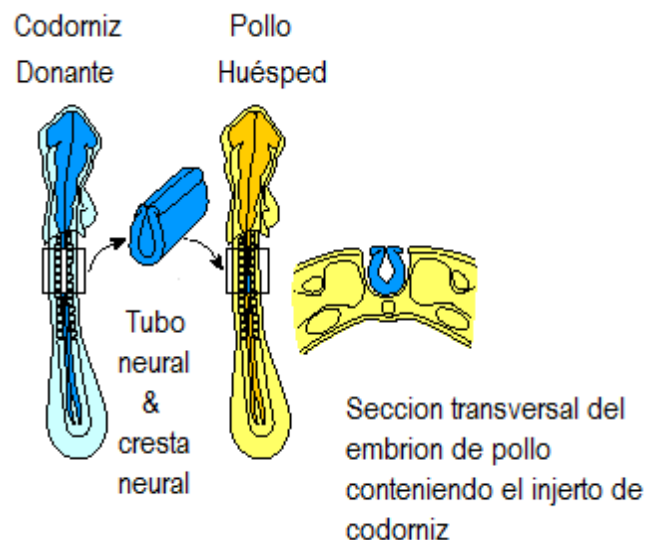


Figura 14. Modelo embriológico experimental de la quimera pollo-codorniz. *Le Douarin, 1980.*

Más tarde, Lecoin realizó una segunda serie de experimentos basándose en que las células derivadas de la cresta neural alcanzan el intestino posterior, 2-3 días después de colonizar el intestino anterior y medio. Mientras tales células estaban migrando por el mesénquima intestinal, las células derivadas de la cresta neural no expresaban un fenotipo neuronal o glial, por lo tanto, para determinar si los precursores neuronales o gliales estaban presentes en un segmento particular del intestino embrionario, éstos debían ser extraídos y puestos a cultivar aisladamente durante varios días antes de analizar la presencia de neuronas y glía. Por ello, Lecoin y sus colaboradores separaron segmentos de intestino posterior en embriones de pollo de 3.5 días, antes de la llegada de las células de la cresta neural, y los cultivó sobre la membrana corioalantoidea en un embrión de pollo huésped de 7 días. Como resultado, obtuvo células c-Kit positivas y células con características ultraestructurales de ICC en explantes que a su vez carecían de neuronas entéricas. Esto confirma los resultados previos de este autor, quien afirma que las ICC no provienen de la cresta neural, y por tanto, les confiere un origen mesodérmico [Lecoin et al., 1996].

Experimentos similares a los de Lecoin en aves fueron realizados por Young en ratones. Segmentos intestinales de embriones de ratón son extraídos antes y después de la llegada de las células de la cresta neural. Estos explantes son puestos a crecer en el espacio subcapsular del riñón de un ratón hospedador durante 3-6 semanas, el cual habilita un ambiente favorable para el crecimiento de una gran variedad de tejidos

embrionarios [Buyse, 1935; Nicholas, 1942], y posteriormente, se analiza la positividad al c-Kit y la existencia de neuronas. La presencia de ICC en explantes de intestino, obtenidos antes de la llegada de las células de la cresta neural vagal y sacra, indica que las ICC de ratón no provienen de la cresta neural, y por tanto, concluyen que derivan del mesénquima local [Young et al., 1996]. No obstante, a pesar de sus resultados, Young fue permisivo en sus conclusiones y sugirió que tal vez, las ICC en sus diferentes localizaciones pueden no necesariamente tener el mismo origen embrionario [Young et al., 1996].

5.2 Células procedentes de la parte ventral del tubo neural.

Después de la migración de la cresta neural, una segunda población se expande desde el tubo neural. Estas células se originan concretamente de la región ventral del tubo neural y parten desde la entrada/salida de los nervios craneales del cerebro medio (nervios craneales III y IV) y cerebro posterior (nervios craneales V-XII), para colonizar una gran variedad de estructuras en desarrollo incluyendo el tracto gastrointestinal [Dickinson et al., 2004] (Figura 15). Una segunda evidencia es que estas células no expresan un marcador característico de la cresta neural, el HNK-1. Basado en su origen y ruta de migración, dichas células son referidas como células del tubo neural migrando ventralmente o células VENT (*Ventrally Emigrating Neural Tube cells*) [Sohal et al., 2002, Dickinson et al., 2004].

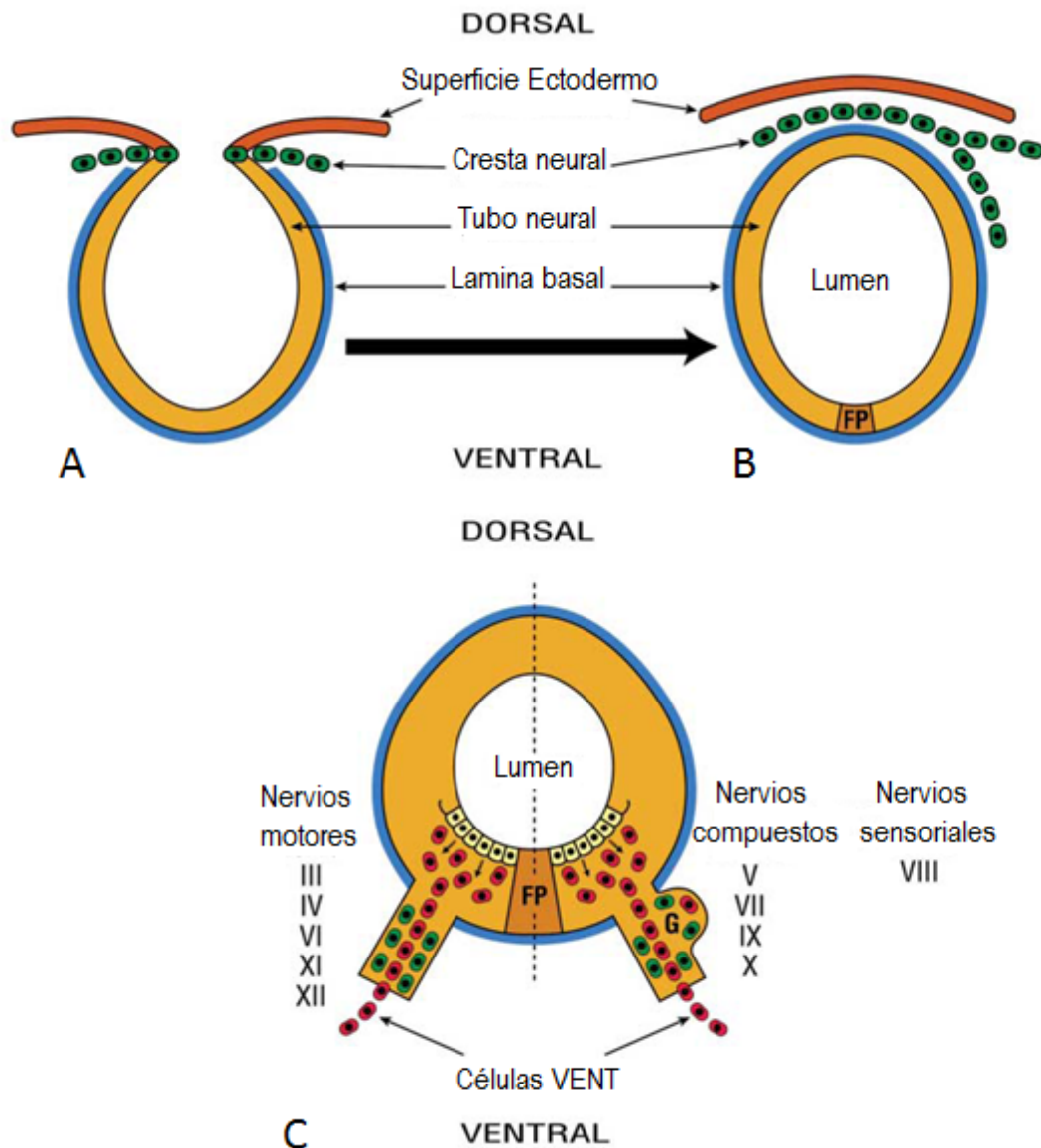


Figura 15. Rutas de migración de dos poblaciones distintas derivadas del tubo neural: las células de la cresta neural y las células VENT. [A] Células de la cresta neural (verde) surgen desde la región dorsal del tubo neural en desarrollo. Son positivas al HNK-1. [B] Células de la cresta neural migran desde la línea media dorsal y contribuyen al desarrollo del SNP y una gran variedad de tejidos neurales y no neurales. [C] Células VENT (rojo) surgen desde la región ventral del tubo neural. Son negativas al HNK-1. Las células VENT migran por los sitios de entrada/salida de los nervios craneales atravesando una brecha transitoria en la lámina basal (azul) que rodea el tubo neural. *Modificado de Dickinson et al., 2004.*

La investigación sobre el origen de las ICC y su relación con las células VENT proviene principalmente de Sohal y sus estudios de seguimiento celular en el tracto gastrointestinal. Células del tubo neural en embriones de pollo fueron marcadas con vectores retrovirales deficientes en replicación que contienen el gen LacZ, después de la migración de la cresta neural de esta región. Durante los días embrionarios 3-12, los embriones fueron sacrificados y procesados para la detección de células VENT positivas a LacZ. Como resultado se obtuvo que estas células colonizan el intestino anterior, específicamente el estómago y el duodeno. La inmunotinción con el marcador HNK-1 demostró que no se derivan de la cresta neural. Estas células se detectaron en tres lugares: (1) en el plexo mientérico y submucoso, (2) en la capa de musculatura lisa circular y (3) en las células que revisten la mucosa en contacto con el lumen. A continuación, se aplicaron una variedad de marcadores específicos para identificar la naturaleza de estas células: algunas de ellas se diferencian hacia neuronas y células gliales, lo cual indica que el SNE en el intestino anterior se desarrolla a partir de una fuente adicional de células precursoras; otras se diferencian en ICC y otras hacia epitelio. En conjunto, estos resultados indican que las células VENT son células multipotenciales y que las ICC, al menos una población, se originan a partir de estas células [Sohal et al., 2002].

5.3 Precursor común: células intersticiales de Cajal y células musculares lisas.

Aparte de apostar por un origen mesenquimal para las ICC, diversos autores tales como Torihashi [Torihashi et al., 1997] o Kluppel [Kluppel et al., 1998] sugieren un precursor común con las células musculares lisas.

Torihashi y colaboradores estudiaron en el intestino delgado de embriones de ratón y neonatos la inmunoreactividad al marcador de las ICC (c-Kit), a marcadores de musculo liso (actina, miosina y desmina) y a marcadores de células derivadas de la cresta neural (c-Ret). Ellos encontraron que células inmunoreactivas al c-Kit eran primeramente detectadas en las capas externas del intestino de ratones embrionarios de 12 días, y que estas células eran aparentemente indiferenciadas y carentes de las características morfológicas propias tanto de las ICC como de las células musculares lisas. Las células positivas al c-Kit se localizaban periféricamente y no coincidentes con las células ganglionares mientéricas inmunoreactivas al c-Ret. En el día embrionario 15 (E15), la supuesta capa de musculatura circular (interna al plexo mientérico) comenzó a mostrar inmunoreactividad a la actina y miosina, mientras que en la localización de la futura capa muscular longitudinal positividad al c-Kit, pero negatividad a la actina y miosina. Después de los estadios embrionarios, parece que una subpoblación de células positivas al c-Kit se desarrolla hacia células musculares lisas: muestran inmunoreactividad a proteínas miofilamentosas y subsecuentemente niveles indetectables de expresión

al c-Kit. Por todo ello, los autores especulan que las ICC y las células musculares lisas longitudinales proceden de un precursor común, c-Kit positivo y c-Ret negativo. Aquellos precursores, en los cuales el receptor c-Kit es activado por contacto con células neurales que expresan el SCF, se diferenciarán hacia ICC, mientras que en estas otras, donde no exista contacto directo, serán diferenciadas hacia células musculares lisas longitudinales (Figura 16) [Torihashi et al., 1997].

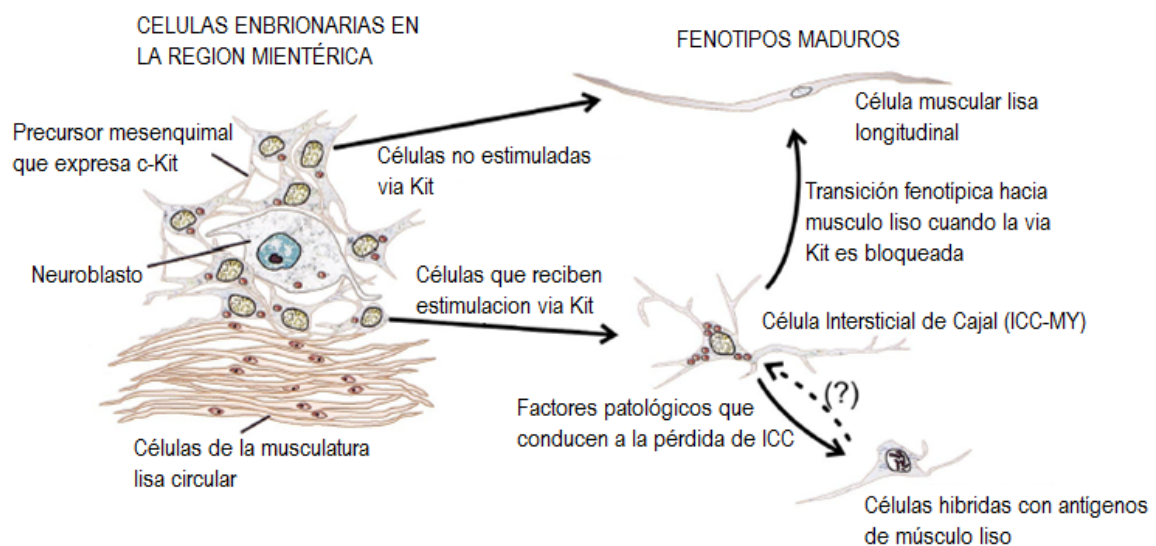


Figura 16. Esquema que representa el desarrollo y la plasticidad de las ICC. Las ICC y las células musculares lisas proceden de un precursor mesenquimal común que expresa c-Kit. La estimulación o no de la vía Kit determina la diferenciación hacia un fenotipo maduro: ICC o célula muscular lisa respectivamente. En la propia ICC, el bloqueo de la señalización Kit en un momento determinado conduce a una transición fenotípica hacia células de músculo liso o bien, hacia células híbridas con antígenos de músculo liso. *Torihashi et al., 1997.*

El estudio de Kluppel también sugiere que las ICC y las células musculares lisas provienen de un precursor común. En este estudio, se analiza la expresión del ARNm para el c-Kit y para la cadena pesada de miosina de músculo liso (SMMHC) en el intestino de ratón embrionario y postnatal. A diferencia de Torihashi, ellos encontraron co-expresión de c-Kit y de SMMHC en las células de la futura capa de musculatura lisa circular y longitudinal. Posteriormente, la expresión de c-Kit se disipa primeramente en las células de músculo liso circular y longitudinal, manteniendo la expresión de SMMHC; mientras que las células destinadas a convertirse en ICC retienen la expresión de c-Kit y suprimen la expresión de SMMHC (Figura 17) [Kluppel et al., 1998].

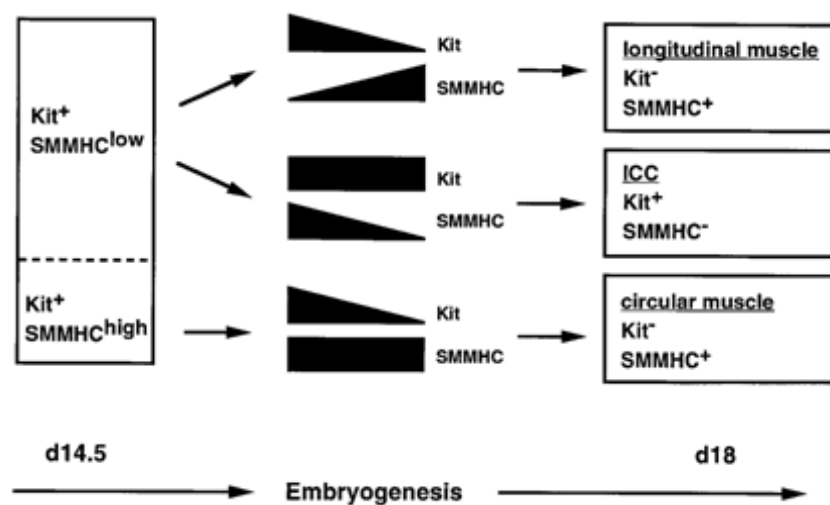


Figura 17. Desarrollo y linaje de las ICC y las células musculares lisas en el intestino delgado de ratón. El precursor común Kit⁺/SMMHC⁺, localizado en las capas exteriores del intestino en desarrollo, da lugar a dos linajes de células: ICC (Kit⁺/SMMHC⁻) y células musculares lisas (Kit⁻/SMMHC⁺). Kluppel et al., 1998.

Por tanto, aunque los resultados de los estudios de Torishahi y Kluppel no son totalmente idénticos, probablemente debido al uso de técnicas diferentes, la principal conclusión era la misma, las ICC tienen un precursor común con las células musculares lisas.

6. Ultraestructura.

Aunque Cajal reconoció las ICC utilizando un microscopio óptico, y a pesar que hasta el día de hoy, la demostración de la expresión del c-Kit mediante inmunohistoquímica es el método más utilizado para estudiar las ICC, la MET ha sido la técnica definitiva para identificar inequívocamente a las ICC en el tracto gastrointestinal.

Las primeras descripciones ultraestructurales fueron realizadas por Vajda, Rumessen y Faussonne-Pellegrini en el intestino delgado del gato, el ratón y el colon de rata respectivamente [Vajda y Free, 1980; Rumessen et al., 1982; Faussonne-Pellegrini, 1982]. De manera concluyente, las ICC se pueden diferenciar de los otros tipos celulares con los que constantemente se habían confundido: fibroblastos o células gliales [Faussonne-Pellegrini, 1987a]. Las características definitorias se pueden dividir en especializaciones citoplasmáticas y distinciones morfológicas.

Las especializaciones citoplasmáticas se agrupan bajo el llamado "*patrón de oro*" propuesto por Huizinga, Thuneberg, Vanderwinden y

Rumessen en 1997 [Huizinga et al., 1997] e integrado por ocho características esenciales. En realidad, esta guía incluye a los seis distintivos sugeridos por Fausone-Pellegrini y Thuneberg [Fausone-Pellegrini y Thuneberg, 1999] y los dos atributos formulados por Komuro [Komuro et al., 1999] (Figura 18):

1. Numerosas mitocondrias de gran tamaño presentes en todas las partes del citoplasma, pero acumuladas fundamentalmente en el inicio de las prolongaciones.
2. Haces de filamentos intermedios y algunos microtúbulos aislados localizados a lo largo del eje principal de las prolongaciones. Ausencia de filamentos gruesos.
3. Abundantes caveolas y escasas invaginaciones de membrana.
4. Lámina basal de desarrollo variable, a menudo incompleta.
5. Un elaborado sistema de cisternas del retículo endoplásmico liso interconectadas.
6. Abundantes ribosomas libres y escasez de cisternas del retículo endoplásmico rugoso. Discreto aparato de Golgi y lisosomas.
7. Variable contenido de glucógeno. Gotas lipídicas ocasionalmente presentes.
8. Contactos estrechos con los haces nerviosos y uniones gap con células musculares lisas u otros tipos celulares.

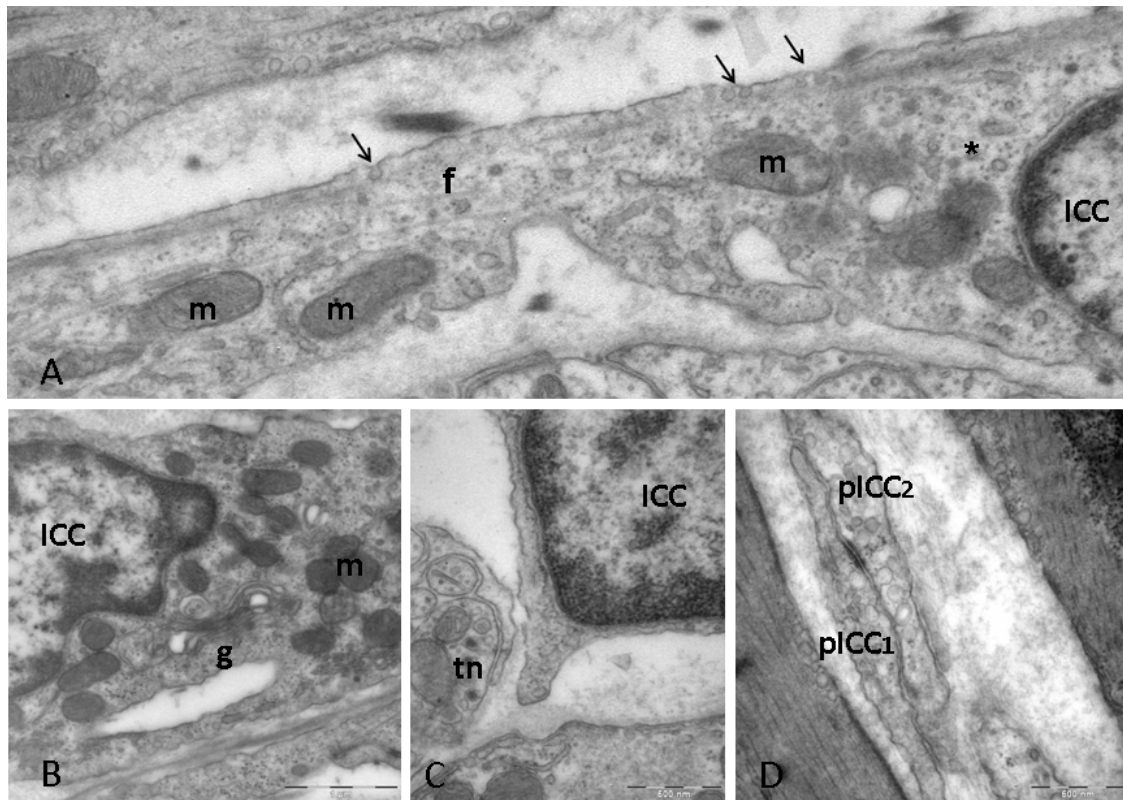
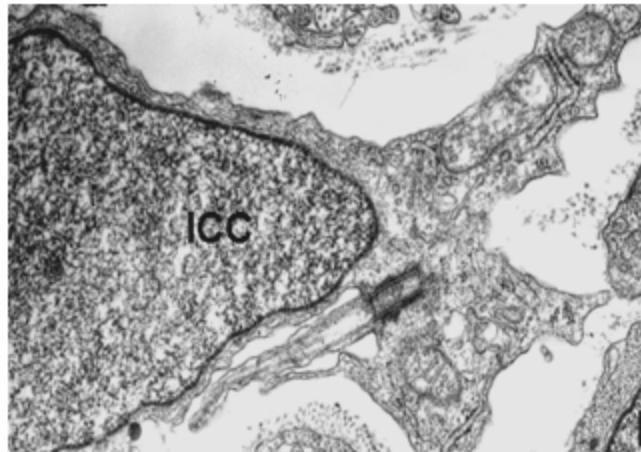


Figura 18. Orgánulos citoplasmáticos característicos de un prototipo de ICC [A] Presencia de filamentos intermedios (f), polirribosomas (asterisco), caveolas (flechas) y abundantes mitocondrias (m). [B] Aparato de golgi (g) cercano al núcleo celular. [C] Cercanía entre una ICC y un tronco nervioso (tn). [D] Contacto entre dos prolongaciones de una ICC (pICC).

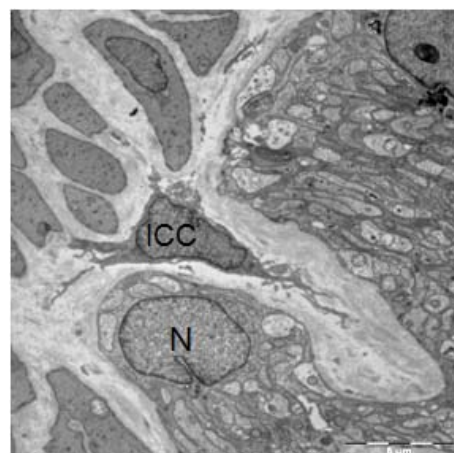
Nuestro grupo de investigación ha contribuido a la caracterización ultraestructural de estas células al poner de manifiesto la presencia de un cilio primario de estructura 9+0 en las ICC (Figura 19) [Junquera et al., 2007; Junquera Escribano et al., 2011].

Figura 19. Célula intersticial de Cajal mostrando un cilio único con estructura 9+0. Obsérvese la ausencia del par central de microtúbulos.



En cuanto a la morfología típica de las ICC, generalmente estas células tienen un cuerpo fusiforme o triangular, con varias prolongaciones y un núcleo grande con uno o más nucléolos, que presenta una estrecha franja de heterocromatina marginal. El citoplasma aparece como un anillo perinuclear delgado que se ensancha en el origen de las prolongaciones primarias, de longitud superior o igual a 100 micras, que originan a su vez numerosas prolongaciones secundarias y terciarias (Figura 20) [Fausson-Pellegrini y Thuneberg, 1999]. Sin embargo, las ICC muestran un cierto rango de heterogeneidad morfológica en función de las especies, la región del tracto gastrointestinal y la localización [Rumessen, 1994; Komuro, 1999; Fausson-Pellegrini, 1992].

Figura 20. Morfología típica de una ICC. Ganglio del plexo mientérico de humano. N: neurona.



7. Localización de las células intersticiales de Cajal fuera del tracto gastrointestinal.

Las ICC están íntimamente relacionadas con el SNE del tracto gastrointestinal. Cajal describió las células que él consideraba como “neuronas intersticiales” no sólo en el intestino, sino también alrededor de los acinos y los vasos sanguíneos del páncreas [Cajal y Sala, 1891] e informó de su presencia en el miocardio [Berkley, 1893]. Además sugirió que, del mismo modo, se encontrarían presentes en aquellas localizaciones en las que confluyan músculo liso e inervación autónoma, como posteriormente se ha demostrado.

7.1. Las células intersticiales de Cajal - Like.

Durante los últimos 10 años, la búsqueda de las ICC fuera del tracto gastrointestinal ha sido el objeto de muchos grupos de investigación. Tales células, ahora más conocidas como células intersticiales de Cajal-like (ICLC, ICC-Like), se les dieron nombres diferentes y confusos. Las ICC-like han sido encontradas en una gran diversidad de órganos. Cronológicamente, han sido identificadas en los vasos linfáticos [McCloskey, 2002], el uréter del ratón [Pezzone et al., 2003], la próstata [Van der Aa, et al., 2003], la arteria mesentérica [Pucovsky et al., 2003], el uréter humano [Metzger et al., 2004], la vejiga humana [Shafik, 2004], el pene [Hashitani y Suzuki, 2004], la arteria aorta y carótida [Bobryshev, 2005], en el páncreas [Popescu et al., 2005b], en el miometrio [Duquette et al., 2005], las

trompas de Falopio [Popescu et al., 2005a], la vagina [Shafik et al., 2005], el estroma de la glándula mamaria [Radu et al., 2005], el miocardio [Hinescu y Popescu, 2005], en la vena porta [Harhun et al., 2006], el útero humano [Popescu et al., 2007], la placenta humana [Suciu et al., 2007], en el mesenterio [Hinescu et al., 2008], la vena pulmonar [Gherghineceau et al., 2008], el conducto biliar extrahepático y la vejiga de cobaya [Huang et al., 2009], el músculo detrusor [Rasmussen et al., 2009], en el epicardio [Suciu et al., 2009] y la arteria mesentérica de rata [Formey et al., 2011].

La identificación de las ICC-Like se basa en un conjunto de criterios en función de la localización, sus características morfológicas y antigénicas; que excluyen con bastante precisión a otros tipos celulares [Popescu et al., 2005a]: (1) Localización en el intersticio, frecuentemente unidas a estructuras histológicas adyacentes (células del músculo liso, nervios o vasos sanguíneos) a través de (2) sus prolongaciones características y (3) positividad al c-Kit/CD117.

Con respecto a esta última premisa hay que destacar que la mayoría de las ICC-like son positivas al c-Kit, por ejemplo en el tracto urinario y órganos genitales masculinos [Hashitani y Lang, 2010], el conducto biliar extrahepático de cobaya [Huang et al., 2009] o en la vena pulmonar [Gherghiceanu et al., 2008], aunque a veces pueden ser negativas a este marcador, como es el caso de las ICC-Like de la arteria mesentérica [Pucovsky et al., 2003]. También es habitual encontrar, al igual que en las prototipadas ICC, una positividad a otros marcadores como son el CD34 en

el páncreas [Popescu et al., 2005b] y en el epicardio [Suciu et al., 2009] o la vimentina en el estroma de la glándula mamaria [Radu et al., 2005], la placenta humana [Suciu et al., 2007] y la arteria mesentérica [Formey et al., 2011].

Las ICC-Like en los distintos órganos desempeñan funciones similares a las ICC en el intestino. Se ha descrito su participación como marcapasos e intermediarias de la transmisión neuromuscular en el tracto urinario [Hashitani y Lang, 2010], pueden contribuir a la contracción rítmica espontánea de la vejiga [Huang et al., 2009] o actuar como mecano-receptoras y sensores químicos (hormonales) en la placenta [Suciu et al., 2007]. Así, en el miometrio [Cretoiu et al., 2006] y en las trompas de Falopio [Popescu et al., 2005a] se ha especificado que expresan receptores de hormonas esteroideas. Funciones distintas a éstas se le han sido asignadas por ejemplo en el epicardio, donde pueden ser una fuente de progenitores cardiacos [Suciu et al., 2009], o en el páncreas, donde desempeñan funciones yuxtacrina y paracrina sobre las células acinares, los vasos sanguíneos o las células de Ito del hígado [Popescu et al., 2005b].

Criterios de identificación de las ICC-Like.

I. Criterios a nivel del microscopio óptico.

La primera indicación de la existencia de ICC en un tejido es la aparición de células positivas al c-Kit. Obviamente, no es una evidencia suficiente para asegurar inequívocamente su presencia, puesto que existen células positivas al c-Kit tales como las células cebadas o los melanocitos [Zhang y Fedoroff, 1997]. Si observamos entonces, una red de células positivas al c-Kit, con dos o más prolongaciones citoplasmáticas en contacto estrecho con células dianas (células del músculo liso, células epiteliales) y con troncos nerviosos, entonces existe una gran posibilidad de encontrarnos con las ICC-like. Ahora es cuando el examen ultraestructural es esencial.

II. Criterios a nivel del microscopio electrónico de transmisión.

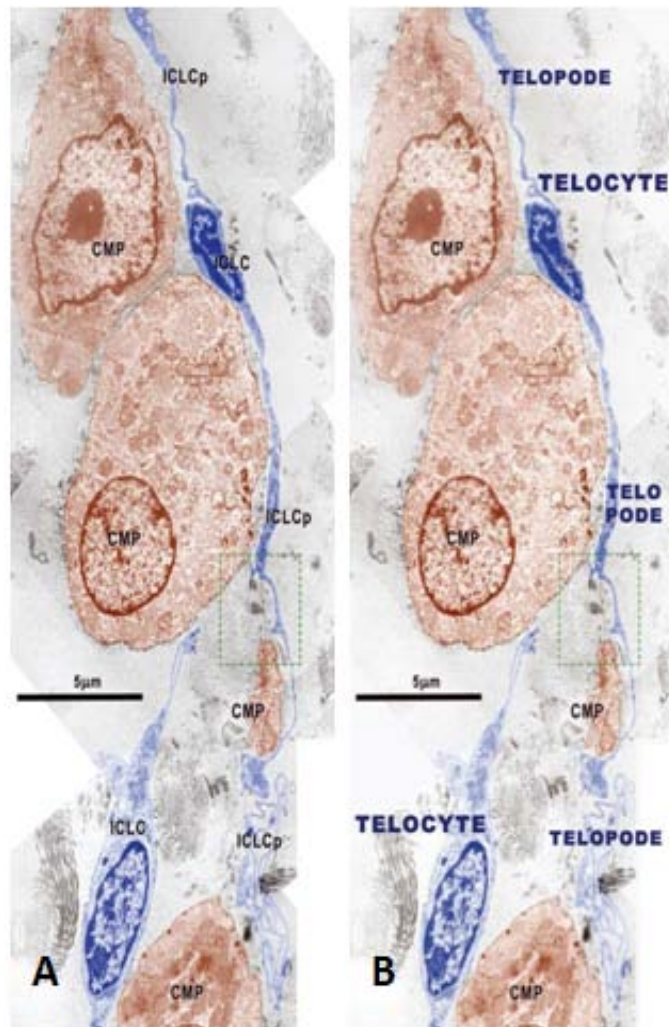
Para facilitar el diagnóstico de las ICC-like al MET se propone el siguiente conjunto de criterios ultraestructurales denominados como “patrón de platino”, que no es más que el “patrón de oro” de las ICC más 2 criterios adicionales. En cualquier caso, los primeros seis criterios podrían ser suficientes para diagnosticar las ICC-like en cualquier tejido [Popescu et al., 2005a]:

1. Ubicación en el espacio no epitelial.
2. Contactos cercanos con sus dianas: haces nerviosos, epitelios, capilares y células musculares lisas.
3. Prolongaciones citoplasmáticas características:
 - a. Número: 1-5, aunque es frecuente 2-3.
 - b. Longitud: desde decenas hasta cientos de micras.
 - c. Espesor: calibre irregular, $\leq 0,5$ micras.
 - d. Aspecto moniliforme, es decir, con una serie de estrangulamientos y por tanto de dilataciones donde por lo general suelen acomodar mitocondrias.
 - e. Bifurcación: diseño dicotómico.
 - f. Organización en red formando un sistema laberintiforme.
4. Uniones gap con células musculares lisas o con otros tipos celulares.
5. Lámina basal ocasionalmente presente.
6. Numerosas caveolas.
7. Abundantes mitocondrias.
8. Moderado retículo endoplásmico liso y rugoso.
9. Presencia de filamentos intermedios, así como de microtúbulos aislados.
10. Indetectables filamentos gruesos de miosina.

7.2. Los telocitos.

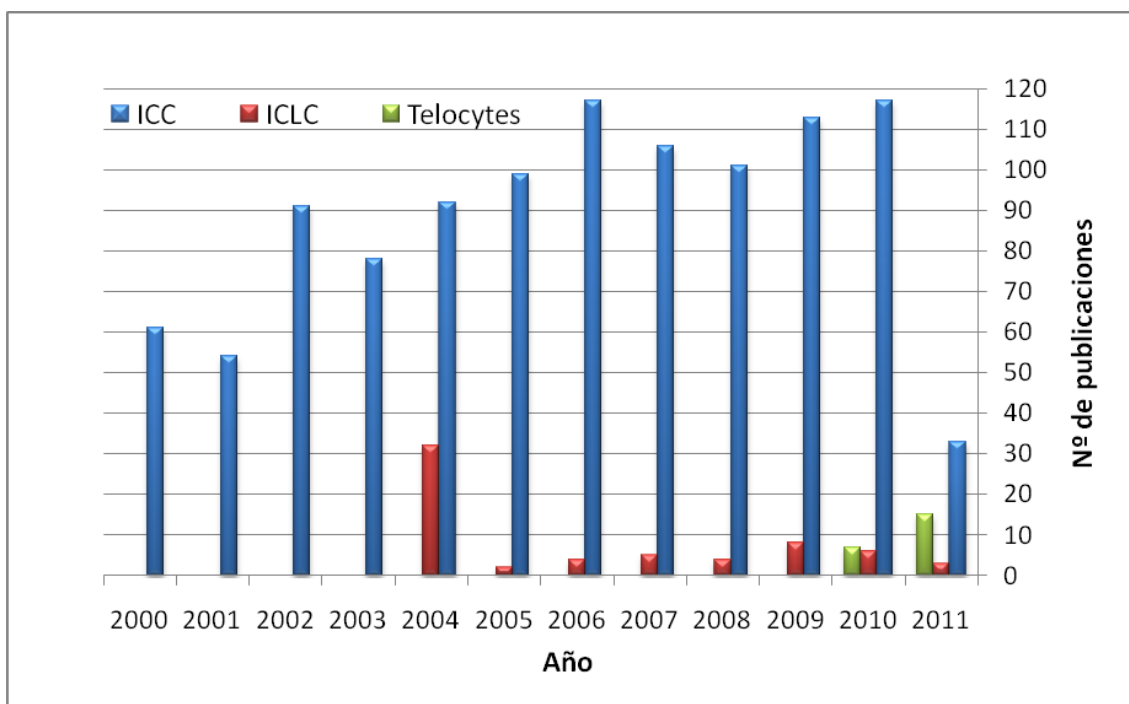
Hace aproximadamente dos años, el mismo autor, quien se atribuye haber usado por primera vez la nomenclatura de ICC-like, propone que estas mismas células pasen a llamarse Telocitos (*telocytes*), dadas las dimensiones únicas de sus prolongaciones (telopodos, *telopodes*) y para evitar confusión con otros tipos de células intersticiales, por ejemplo, los fibroblastos o los fibroblastos-like [Popescu y Faussone-Pellegrini, 2010] (Figura 21).

Figura 21. Imágenes de MET de ICC-Like [A] y telocito [B] extraídas de “*Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches*” y “*TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES*” respectivamente. La misma imagen es utilizada por el mismo autor en dos artículos distintos, en las que las ICC-Like pasan a denominarse telocitos.



La definición más breve posible para los telocitos es “*células con proyecciones celulares que se extiende a largas distancias*”. Los telocitos son células pequeñas de forma ovalada de cuyo soma surgen largas (de decenas a cientos de micras), tortuosas y muy delgadas prolongaciones en su mayoría por debajo de 0,2 micras [Popescu y Faussonne-Pellegrini, 2010].

Hasta la presente fecha, los telocitos han sido recientemente encontrados en el epicardio [Popescu et al., 2010], el miocardio [Faussonne-Pellegrini y Bani, 2010], el endocardio [Gherghiceanu et al., 2010], la placenta humana a término [Suciu et al., 2010], en la lamina propia del duodeno [Cantarero Carmona et al., 2011b], relacionados con la vasculatura duodenal [Cantarero et al., 2011], en la pleura [Hinescu et al., 2011], en el intersticio del músculo esquelético [Popescu et al., 2011], en la tráquea y el pulmón [Zheng et al., 2011]. Una comparación sobre el número de publicaciones acerca de los telocitos en relación con las ICC-Like y las ICC queda reflejada en la gráfica 2. Aunque existen publicaciones sobre las ICC-Like y los telocitos, las prototipadas ICC siguen siendo el objetivo principal de las investigaciones actuales.



Gráfica 2. Comparación del número de publicaciones sobre las ICC, las ICC- Like y los telocitos a partir del año 2000 hasta la actualidad.

Por el momento, no existe un grupo de anticuerpos especiales para identificar a los telocitos, de tal manera, que las investigaciones se centran en determinar las características inmunocitoquímicas de esta entidad celular (Tabla 2).

Antibody	Source	Catalogue number	Clone	Dilution	TC positivity in cell culture	TC positivity in tissue sections
CD117/c-kit ¹	Dako	A4502	polyclonal	1:100		++
CD117/c-kit ¹	Santa Cruz	Sc-13508	Ab81	1:100	++	
CD34 ¹	Dako	M7165	QBEnd-10	1:25		+/-
CD34 ¹	BD Biosciences	550760	563	1:50	+	
Vimentin	Dako	M7020	V9	1:100	++	++
Caveolin-1	Santa Cruz	Sc-894	polyclonal	1:50	++	++
CD44	Dako	M7082	DF 1485	1:25	+	+
CD45	BD Biosciences	347460	2D1	1:100	-	NT
CD90	BD Biosciences	555593	5E10	1:100	-	NT
Cytokeratin 7	Santa Cruz	Sc-52322	OVTL 12-30	1:10	-	-
Desmin	Dako	M0760	D33	1:50	-	+/-
Nestin	Santa Cruz	Sc-23927	10c2	1:200	+	+/-
NOS2	Santa Cruz	Sc-651	polyclonal	1:50	+	+/-
NSE	Dako	M0873	BBS/NC/VI-H14	1:75	+	+/-
S-100	Dako	Z 0311	polyclonal	1:100	+	+
SMM	Dako	M3558	SMMS-1	1:100	-	-
VEGF	Santa Cruz	Sc-152	polyclonal	1:100	+	+
αSMA	NeoMarkers	MS-113-P1	Ab1	1:100	+	+

The intensity of TC reactivity was assessed semiquantitatively: - negative; +/- occasionally/weakly positive; + positive; ++ strongly positive; NT = not tested.

¹ Different antibodies against the same antigen were used for different applications (IF/IHC).

Tabla 2. Inmunofenotipado de telocitos. *Suciu et al., 2010.*

Pero no se intenta únicamente deducir la características inmunocitoquímicas de los telocitos, sino también las funciones que podrían desarrollar estas células. De nuevo, se parte de las funciones clásicamente desempeñados por las ICC, como por ejemplo mecanoreceptoras, y a partir de ahí, se amplía el campo de investigación: participantes en la señalización intercelular y en la regeneración y reparación cardíaca [Kostin, 2010] e incluso, han llegado a considerarse como una subpoblación de células progenitoras entre las células del estroma de la placenta humana [Suciu et al., 2010].

Características ultraestructurales de los telocitos.

Esta es sin duda la parte más ampliamente estudiada en este momento. Como se ha mencionado anteriormente, los telocitos son células de pequeño tamaño, de forma ovalada, con un núcleo rodeado por

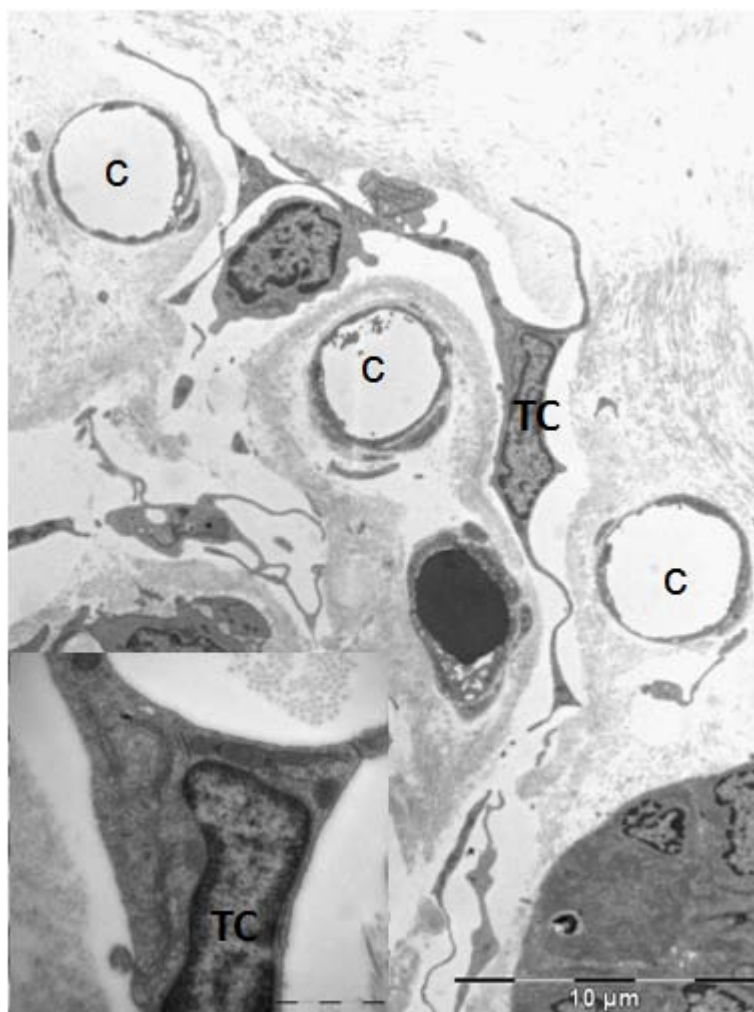
una pequeña cantidad de citoplasma. Este núcleo ocupa cerca del 25% del volumen de la célula y presenta grupos de heterocromatina marginal. Por su parte, el citoplasma perinuclear es rico en mitocondrias (que ocupan aproximadamente el 5% del cuerpo de la célula), contiene un pequeño aparato de Golgi, así como retículo endoplásmico liso y rugoso y elementos del citoesqueleto (filamentos finos e intermedios). La periferia de la célula está representada por un plasmalema habitual, con ausencia de lámina basal (o delgada y discontinua) y muchas caveolas (alrededor de 2-3% del volumen citoplasmático). La forma de los telocitos está en función del número de sus telopodos: piriforme para una prolongación; en forma de huso, para dos telopodos; triangular, si son tres; estrelladas, etc [Popescu y Faussonne-Pellegrini, 2010] (Figura 22).

De la misma manera que en las ICC o en las ICC-like, se establece un patrón ultraestructural para la región más distintiva de estas células, sus prolongaciones o telopodos. Por consiguiente, se enfatiza en aportar datos relacionados con dichas prolongaciones [Popescu y Faussonne-Pellegrini, 2010]:

- Número: 1-5, con frecuencia sólo 2-3 telopodos.
- Longitud: desde decenas hasta cientos de micras.
- Grosor: calibre desigual aunque en su mayoría por debajo de 0,2 micras.
- Aspecto moniliforme con algunas dilataciones a lo largo de su recorrido.
- Modelo de división dicotómico.

- Organización en red formando un sistema laberintiforme mediante superposición y uniones gap.

Figura 22. Telocito (TC) de la lámina propia del duodeno de rata Wistar. c: capilar.



III. Neurogénesis adulta.

La neurogénesis adulta es el proceso por el cual se generan nuevas neuronas que se integran en los circuitos existentes, una vez que el desarrollo fetal y postnatal temprano ha cesado [Yoneyama et al., 2011].

Uno de los dogmas fundamentales mantenido en las neurociencias hasta el siglo pasado sostenía que la regeneración del SNC no puede ocurrir en etapas de la vida adulta. La ausencia de figuras mitóticas en las neuronas y la irreversibilidad de las lesiones cerebrales reforzaban el poder dogmático, que poseía la creencia inicial, donde la neurogénesis estaba limitada al periodo embrionario. En la década de los 90, diversos estudios en mamíferos confirmaban la persistencia de células madre adultas en determinadas zonas del cerebro. Impulsados por estos hallazgos, nos cuestionamos si también pueden existir un nicho de células madre en el SNE postnatal. Los muchos paralelismos y los éxitos en el SNC nos motiva a los investigadores para seguir avanzando y poder revelar muchos aspectos nuevos e interesantes del “segundo cerebro”.

1. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Central.

Los primeros estudios que demuestran indiscutiblemente la existencia de neurogénesis en animales adultos datan de 1965, cuando Joseph Altman, utilizando la técnica de auto-radiografía con timidina tritiada para marcar células en división, demostró la existencia de neurogénesis en algunas áreas del cerebro de ratas postnatales y adultas, específicamente en el neocortex, hipocampo y bulbo olfatorio, relacionando incluso la neurogénesis con el aprendizaje y la memoria [Altman y Das, 1965].

Las áreas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas se conocen como **regiones o nichos neurogénicos**. La neurogénesis en el cerebro de mamíferos adultos ha sido descrita en dos regiones claramente definidas: la zona subgranular del giro dentado del hipocampo o SGZ (*subgranular zone*) [Altman y Das, 1965; Kaplan y Bell, 1984; Cameron et al., 1993] y la zona subventricular de los ventrículos laterales o SVZ (*subventricular zone*) [Altman y Das, 1966; Altman, 1969; Lois y Alvarez-Buylla, 1993]. Además, se han aislado células con propiedades de células madre *in vitro* en áreas no neurogénicas, tales como el septo, el estriado, la corteza cerebral, el cuerpo calloso y el nervio óptico [Palmer et al., 1995; Shihabuddin et al., 1997; Tropepe et al., 1997; Palmer et al., 1999;].

1.1 La Zona Subventricular (SVZ).

La región subventricular es una estructura anatómica par situada a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales (Figura 23). En esta zona, las nuevas neuronas generadas se desplazan a través de la vía de migración rostral hacia el bulbo olfatorio, donde se diferencian hacia interneuronas maduras [Altman, 1969; Lois y Alvarez-Buylla, 1994].

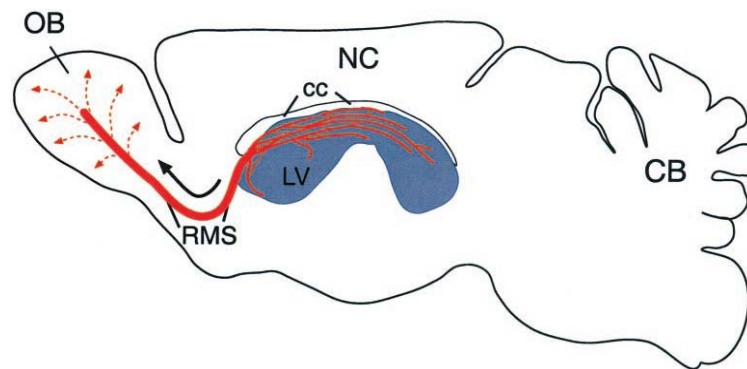


Figura 23. Sistema SVZ-bulbo olfatorio. Esquema de una sección sagital de cerebro de ratón con el bulbo olfatorio (BO) a la izquierda y el cerebelo (CB) a la derecha. La SVZ se localiza a lo largo del ventrículo lateral (LV). Las nuevas neuronas originadas en la SVZ migran tangencialmente en dirección al bulbo olfatorio. NC: neocórtex, cc: cuerpo calloso, RMS: cadena de migración rostral. *Alvarez-Builla y García-Verdugo, 2002.*

La continua producción de nuevas neuronas en la SVZ del adulto sugiere que las células progenitoras neurales persisten dentro de esta capa germinal [Alvarez-Builla y García-Verdugo, 2002].

En base a las características morfológicas, inmunocitoquímicas y ultraestructurales, en la SVZ se han identificado los siguientes tipos celulares (Figura 24) [Doetsch et al. 1997]:

1. Neuroblastos migratorios o células tipo A.
2. Células astrocíticas de proliferación lenta o células tipo B.
3. Células amplificantes transitorias o células tipo C.
4. Tanicitos o células tipo D.
5. Células endodimales ciliadas o células tipo E.

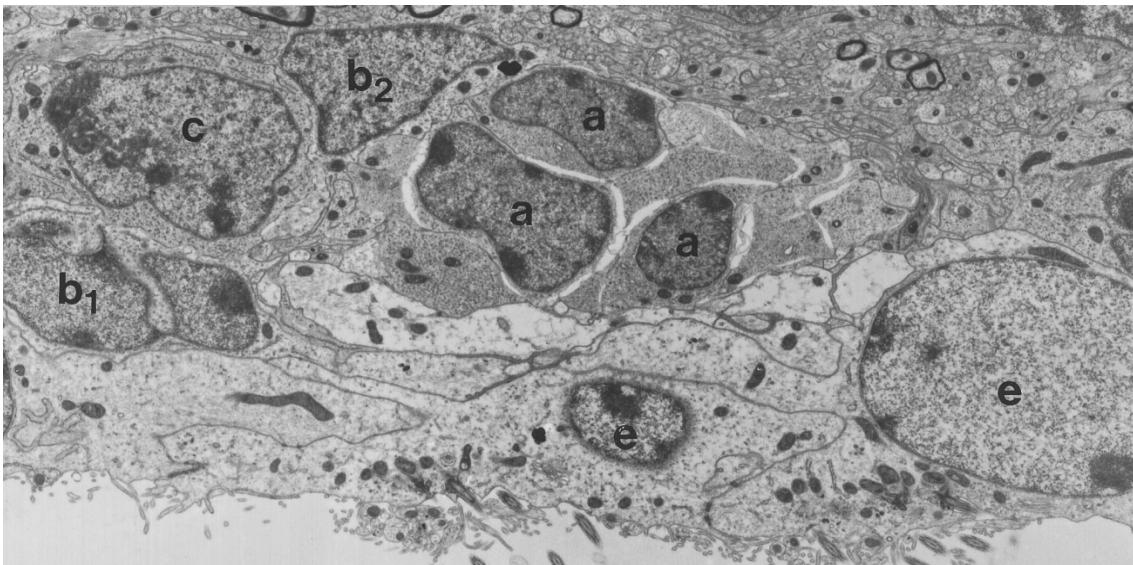


Figura 24. Relación de los principales tipos celulares de la SVZ. a: neuroblastos, b1 y b2: células astrocíticas, c: células precursoras amplificantes, e: células endodimales. *Doetsch et al., 1997.*

La SVZ se organiza formando cadenas de neuroblastos (células tipo A) que se localizan tangencialmente a las paredes de los ventrículos laterales y están aislados de las células endodimales y el cuerpo estriado

por dos tipos de células gliales (B1 y B2). Los puntos calientes de proliferación de supuestos precursores (células tipo C) se asocian a los neuroblastos migratorios sólo en la SVZ y no en la vía de migración rostral (Figura 25) [Doetsch et al., 1997; Gil-Perotin et al., 2009].

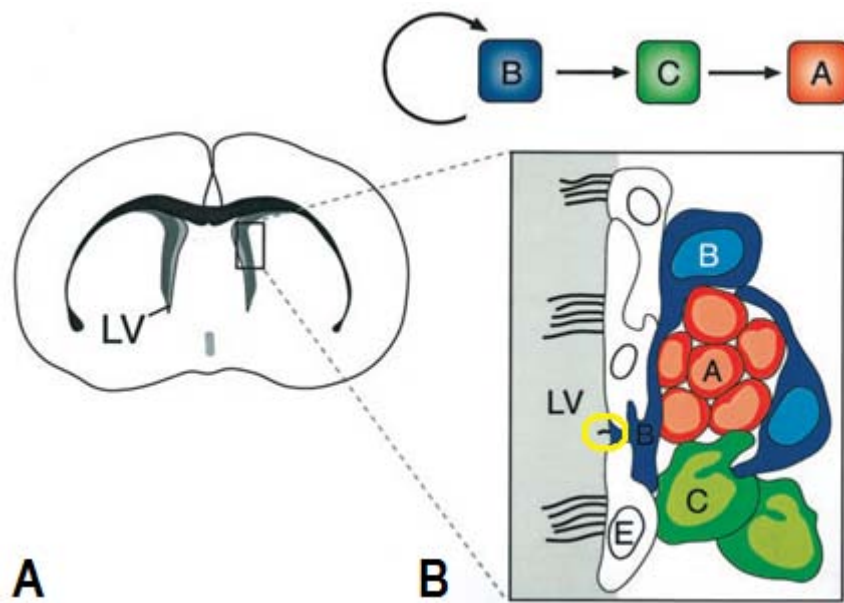
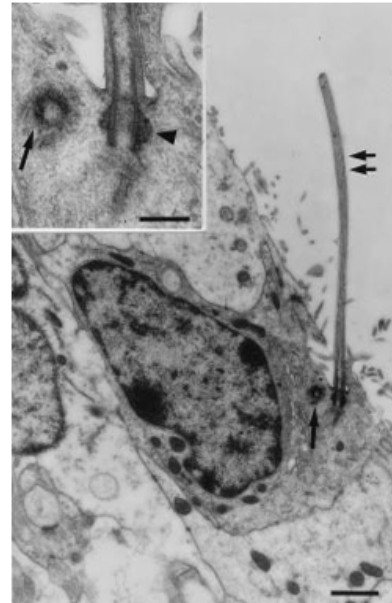


Figura 25. Organización y composición celular de la SVZ. [A] Esquema frontal del cerebro adulto de ratón mostrando la SVZ adyacente a los ventrículos laterales (LV). [B] Tipos de células de la SVZ: línea de células endodiales multiciliadas (E, en blanco), cadenas de neuroblastos (A, en rojo) migrando a través de los túneles gliales formados por los astrocitos de la SVZ (B, en azul) y células progenitoras neurales (C, en verde) dispersas en pequeños grupos a lo largo de las cadenas formadas por los neuroblastos migratorios. Ocasionamente, unos astrocitos de la SVZ se extienden entre las células endodiales y contactan con el ventrículo lateral donde proyectan un cilio único (círculo amarillo). Las células B generan células amplificantes transitorias, células tipo C, que a su vez dan lugar a los neuroblastos o células tipo A. *Alvarez-Builla y García-Verdugo., 2002.*

Los **neuroblastos migratorios o células tipo A** poseen un cuerpo fusiforme con una o dos prolongaciones. Las células en general presentan un contorno liso y están unidas a otros neuroblastos mediante pequeños complejos de unión donde es frecuente observar vesículas endocíticas. Inmunocitoquímicamente son positivas a la molécula de adhesión celular neural polisializada (PSA-NCAM), tubulina β -III específica neuronal (Tuj1) y doblecortina (Dcx) [Doetsch et al., 1997; Yang et al., 2004; Gil-Perotin et al., 2009].

Las **células astrocíticas o células tipo B** tienen un contorno irregular, al igual que su núcleo que presenta numerosas invaginaciones. Estas células establecen contactos mediante uniones gap con otros astrocitos y células ependimales, pero nunca con células tipo C o con los neuroblastos migratorios. Ocasionalmente las células de tipo B contactan con el lumen del ventrículo y exhiben un pequeño cilio primario con organización 9+0 (Figura 26). Atendiendo a su posición y a su apariencia ultraestructural, se han descrito en el ratón dos subtipos de células B: las de tipo B1 y las de tipo B2 [Doetsch et al., 1997; Gil-Perotin et al., 2009].

Figura 26. En la SVZ, las células de tipo B presentan un cilio primario proyectado hacia el ventrículo lateral. Tamaño de la escala 1 mm. En el recuadro, se muestra el cuerpo basal (cabeza de flecha) y el centriolo (flecha) que acompaña al cilio único. Tamaño de la escala 0.3 mm. *Doetsch et al., 1999.*



El tercer tipo celular son las **células amplificantes transitorias o células tipo C**. Son células más grandes donde destaca la presencia de varios nucleolos enormes, reticulados y totalmente atípicos. No se han observado en la cadena de migración rostral y tampoco se ha descrito ningún marcador molecular específico de estas células que permita diferenciarlas de los otros tipos celulares de la SVZ. Son positivas a la nestina al igual que las células de tipo A, B y E; y al factor de transcripción Dlx2, que también se encuentra presente en las células de tipo A. Las células de tipo C son precursores pluripotenciales puesto que pueden generar neuronas, glía y oligodendrocitos *in vitro* [Doetsch et al., 1997; Gil-Perotin et al., 2009].

Los **tanicitos o células tipo D** son poco frecuentes en la SVZ. Estas células no ciliadas se encuentran entre las células ependimales contactando con el ventrículo exhibiendo microvellosidades en su

superficie luminal. Son positivos a la proteína ácida gliofibrilar (GFAP) [Doetsch et al., 1997; Gil-Perotin et al., 2009].

Las **células endodimales o células tipo E** son grandes, cúbicas y forman una monocapa epitelial que separa el ventrículo lateral del parénquima que le rodea. Como característica principal, destaca la presencia de prolongaciones laterales interdigitadas entre las propias células que contienen complejos de unión tipo desmosoma. Estas células presentan positividad a la GFAP, vimentina y nestina [Doetsch et al., 1997; Gil-Perotin et al., 2009]. En la búsqueda de los progenitores neurales *in vivo*, las células endodimales han sido sugeridas también como células madre neurales [Johansson et al., 1999; Coskun et al., 2008].

La tabla 3 resume las características inmunocitoquímicas de los distintos tipos celulares de la SVZ.

	A	B	C	D	E
	Neuroblasto	Astrocito	Precursor	Tanicito	Célula endodimal
PSA-NCAM	***	/	/	/	/
Tuj1	***	/	/	/	/
GFAP	/	**	/	***	*
Vimentina	/	*	/	n.d	**
Nestina	*	**	*	n.d	***
Dcx	***	n.d	n.d	n.d	n.d
Dlx2	**	n.d	**	n.d	n.d

Tabla 3. Marcadores moleculares de las células presentes en la SVZ del ratón adulto. La intensidad de la tinción inmunocitoquímica está representada por el texto siguiente: * leve, ** intermedio, *** moderado, / sin marcaje, n.d no determinado. *Modificado de Doetsch et al., 1997.*

1.2 La Zona Subgranular (SGZ).

Las células progenitoras neurales del hipocampo residen en la SGZ, localizada entre el hilio del hipocampo y la capa de células granulares del giro dentado. Al igual que en la SVZ, la neurogénesis se origina a partir de células pluripotentes que dan lugar a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos *in vitro* [Palmer et al., 1995, 1999; Ehninger y Kempermann, 2008]. En datos numéricos, aproximadamente unas 250.000 neuronas de nueva formación se incorporan al mes en el giro dentado, lo que supone un 6% de la población celular total de esta estructura [Cameron y McKay, 2001].

Los "puntos calientes" proliferativos se ha identificado cerca de la vasculatura, por lo que se ha supuesto que los vasos sanguíneos tienen un papel importante en la regulación de la neurogénesis [Palmer et al., 2000].

En base a su morfología [Seri et al., 2001; Fukuda et al., 2003; Seri et al., 2004], su expresión de marcadores [Fukuda et al., 2003; Kronenberg et al., 2003; Kempermann et al., 2004; Steiner et al., 2004] y sus propiedades electrofisiológicas [Fukuda et al., 2003; Ambrogini et al., 2004], se han descrito varios tipos celulares en la SGZ:

1. Astrocitos radiales o células B.
2. Células precursoras o células D.
3. Nuevas neuronas granulares o células G.

Los astrocitos radiales (células B) se dividen para generar los precursores intermedios (células tipo D) los cuales maduran hacia neuronas granulares (células G). Por otra parte, en la SGZ también se encuentran los astrocitos horizontales, que no tienen características de células troncales, y se distinguen de los astrocitos radiales por su morfología y expresión frente a determinados marcadores moleculares [Seri et al., 2004]. Los resultados experimentales indican que son los astrocitos radiales los que dan origen a los astrocitos horizontales [Seri et al., 2004], que a su vez son los precursores de los oligodendrocitos [Vives et al., 2003; Romero-Alemán et al., 2004] (Figura 27).

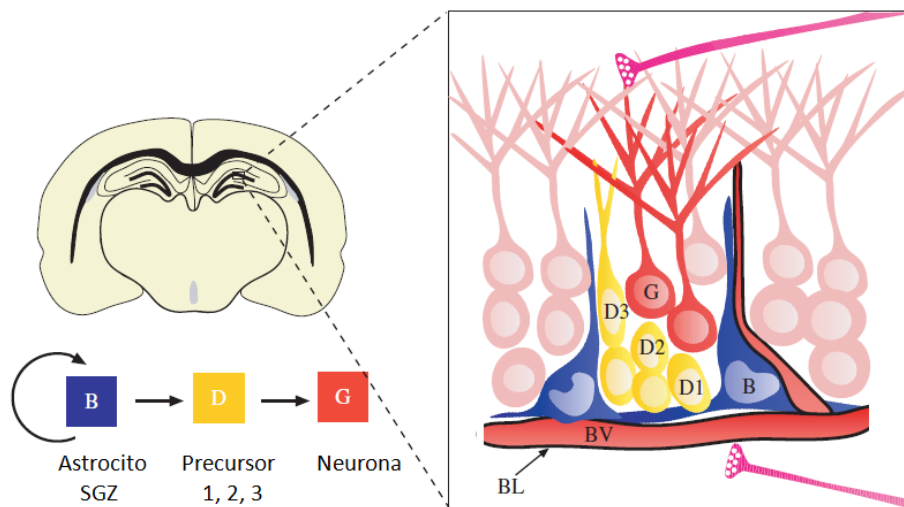


Figura 27. Anatomía y tipos celulares de la SGZ en el adulto. Esquema frontal del cerebro adulto de ratón que muestra la SGZ en la interfase entre el hilio (área debajo de los vasos sanguíneos) y la capa de células granulares del giro dentado (células de color rosa). Los astrocitos de la SGZ (B, azul) se dividen para generar los precursores intermedios (células tipo D, color amarillo) los cuales maduran hacia neuronas granulares (G, roja). La neurogénesis se produce junto a los vasos sanguíneos donde se

intuye que la lámina basal vascular podría jugar un papel importante en el nicho. Axones aferentes (rosa) desde la corteza entorrinal y los axones de las regiones subcorticales, así como de las interneuronas inhibitorias locales, se proyectan hacia la SGZ. *Riquelme et al., 2008.*

Los **astrocitos radiales o células B** son, en contraste con la apariencia multipolar de los astrocitos horizontales, predominantemente uni o bipolares. Tienen un gran cuerpo celular con una terminación radial principal que penetra y cruza la capa de células granulares, y varias prolongaciones cortas tangenciales intercaladas entre las neuronas granulares [Alvarez-Buylla et al., 2002; Fukuda et al., 2003; Garcia et al., 2004]. En cuanto la expresión de marcadores, tanto los astrocitos radiales como los horizontales expresan GFAP, vimentina, musashi, Mash1 y la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (3-PGDH). Específicamente, los astrocitos radiales expresan nestina y los astrocitos horizontales S100 β y glutamina sintetasa (GS) [Seri et al., 2004].

Los astrocitos radiales, como se ha mencionado anteriormente, no se diferencian directamente hacia neuronas maduras, sino que dan lugar primero a las denominadas **células precursoras intermediarias o células D**. Estas células se agrupan en torno a 2-4 células y tienen una morfología completamente diferente a los astrocitos radiales. En base a su morfología, tres subtipos de células D han sido definidas: D1, D2 y D3.

En general, las células D son positivas a la PSA-NCAM, a la Dcx y a la proteína 4 mediadora de respuesta a colapsina (TUC-4); a NeuroD, un

factor de transcripción que interviene en la diferenciación neuronal; y a Prox-1, un gen homeobox expresado en las neuronas granulares del giro dentado en el cerebro postnatal. La tuj1 sólo se encuentra en algunas células D [Seri et al., 2004]. En general, las células tipo D no equivalen a ningún tipo celular de la SVZ [Seri et al., 2001].

Las **nuevas neuronas granulares o células G** presentan todas las características de las neuronas maduras del SNC: son no mitóticas y polarizadas, poseen axones y dendritas, forman sinapsis eficientes, son eléctricamente activas, presentan potenciales de acción en respuesta a estímulos sinápticos tanto inhibitorios como excitatorios y son capaces de liberar los neurotransmisores clásicos en respuesta a potenciales de acción. Sin embargo, a nivel cuantitativo, la funcionalidad de estas neuronas no es tan efectiva como las formadas a partir de células troncales en el desarrollo embrionario. Son positivas a NeuN (núcleo neuronal) y los factores de transcripción NeuroD y Prox-1 [Seri et al., 2004]. Además, contrariamente a lo que sucede con las neuronas generadas en la SVZ, las nuevas neuronas de la SGZ se desplazan en distancias cortas dentro de la capa de células granulares [Song et al., 2002]. La función de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo ha sido correlacionada con el aprendizaje y la memoria [Gould et al., 1999; Shors et al., 2001].

La tabla 4 resume las características inmunocitoquímicas de los distintos tipos celulares de la SGZ.

		B	D	G
	Astrocito horizontal	Astrocito radial	Precursor intermediario	Neurona granular
GFAP	*	*	-	n.d
Vimentina	*	*	-	n.d
Musashi	*	*	-	n.d
Mash1	*	*	-	n.d
3-PGDH	*	*	-	n.d
Nestina	-	*	-	n.d
S100β	*	-	-	n.d
GS	*	-	-	n.d
PSA-NCAM	n.d	n.d	*	-
Dcx	n.d	n.d	*	n.d
TUC-4	n.d	n.d	*	n.d
NeuroD	n.d	n.d	*	*
Prox-1	n.d	n.d	*	*
Tuj1	n.d	n.d	*	n.d
NeuN	n.d	-	-	*

Tabla 4. Marcadores moleculares de las células presentes en la SGZ del ratón adulto. Los resultados de la tinción inmunocitoquímica están representados por el texto siguiente: * positivo, - negativo, n.d no determinado. *Seri et al., 2004.*

2. Neurogénesis en el Sistema Nervioso Entérico.

Las neuronas entéricas aparecen tempranamente en el desarrollo del SNE, poco después de la invasión del mesénquima asociado al intestino anterior por las células de la cresta neural entérica [Young et al., 1999]. No obstante, los subtipos de neuronas entéricas aparecen en diferentes etapas del desarrollo [Rothman y Gershon, 1982; Rothman et al., 1984] y algunas de ellas sólo en la etapa postnatal [Matini et al., 1997;

Vannucchi y Fausone-Pellegrini, 1996]. Por otra parte, existe un incremento en el número de neuronas entéricas hasta bien después del nacimiento [Ali y McLelland, 1979; Liu et al., 2009]. Se piensa que las células de la cresta neural entérica mantienen su potencial neurogénico durante un período largo de tiempo, pero poco se sabe acerca de la velocidad y el grado de neurogénesis que acontece en el SNE.

A diferencia del SNC, la neurogénesis activa no ha sido detectada en el SNE de mamíferos adultos en condiciones fisiológicas. Las primeras investigaciones no pudieron demostrar la neurogénesis en el SNE de ratones adultos, por lo que el nacimiento de las neuronas entéricas se creyó que ocurría exclusivamente durante etapas embrionarias y postnatales tempranas [Pham et al., 1991]. Sin embargo, estudios posteriores en cultivos celulares demostraron que pueden aislarse progenitores capaces de generar neuronas entéricas y células gliales, no sólo en el intestino embrionario sino también en el adulto postneurogénico [Kruger et al., 2002; Suárez-Rodríguez y Belkind Gerson, 2004]. Por ejemplo, Silva y colaboradores separaron ganglios mientéricos de la pared intestinal, los disociaron y los pusieron a cultivar bajo el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2). En estas condiciones, se desarrollaron cuerpos similares a neuroesferas que incorporaban bromodeoxiuridina (BrdU) y expresaban el marcador de células madre, nestina. Como resultado, algunas células positivas a BrdU asumen la morfología de neuronas y expresan PGP9.5, y otras, el marcador de células gliales, GFAP. Este trabajo proporciona una

evidencia más sobre los progenitores derivados de la cresta neural y su plasticidad en el intestino de rata postnatal [Silva et al., 2008].

En cuanto a las células progenitoras entéricas, se piensa que solo representan el 1-2% de una población celular que expresa altos niveles de p75 [Kruger et al., 2002]. En cultivo, estas células fueron capaces de auto-renovarse, proliferar y diferenciarse hacia neuronas, células gliales y miofibroblastos; sugiriendo la persistencia de una población con propiedades de células madre neurales en el intestino adulto. Similares resultados fueron obtenidos por Suarez-Rodríguez y Belkind-Gerson, quienes aislaron *in vitro* células proliferantes y multipotentes desde el SNE de ratones lactantes y adultos. Dichas células expresaban vimentina y nestina [Suarez-Rodríguez y Belkind-Gerson, 2004].

El potencial neurogénico de estas células *in vivo* y su significado funcional en el intestino del humano adulto sigue siendo desconocido. Se ha demostrado que existen progenitores neurales entéricos exclusivamente en neonatos y niños de hasta 5 años de edad [Metzger et al., 2009b]. Estos estudios abren la posibilidad a que una población de células madre de la cresta neural entérica pueda persistir en el SNE adulto. La identidad de tales progenitores y los mecanismos que conducen a su maduración neuronal podría ser el desenlace que permita comprender la neurogénesis en el SNE.

Justificación

Como se ha visto en la Introducción, Cajal definió perfectamente mediante microscopía óptica la localización de las ICC en la pared del tracto gastrointestinal. Posteriormente, y a lo largo de los años, se han establecido los distintos subtipos de células intersticiales en base a sus características ultraestructurales y su distribución en el tracto gastrointestinal.

Todos los estudios realizados se han centrado preferentemente en las células intersticiales vinculadas al plexo mientérico e intramusculares. Sin embargo, hasta la fecha, no existe una caracterización ultraestructural precisa de las ICC asociadas a la mucosa, ni tampoco un análisis de su relación con los elementos vasculares de la submucosa. Nuestro grupo de investigación puso de relieve la presencia de un cilio único en las ICC-MP de conejo. ¿Presentarán las ICC de la lámina propia o aquellas que están asociadas a los vasos sanguíneos de la submucosa alguna característica especial?, ¿podría generalizarse la existencia del cilio único en todas las localizaciones de las ICC?, ¿y en todas las especies?.

Por otro lado, el descubrimiento de la neurogénesis en el SNC del adulto ha supuesto un gran cambio para la Neurociencia. La caída del dogma, que consideraba que el cerebro adulto no puede generar nuevas células nerviosas, ha abierto un amplio y esperanzador camino hacia el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Parece lógico pensar que del mismo modo que existe una cierta potencialidad regenerativa en el SNC, también deberá de existir neurogénesis en otras

regiones, y particularmente en el SNA, encargado de regular funciones vitales en el organismo como la respiración, el peristaltismo o el latido cardiaco.

Centrándonos en el SNE, los elementos que constituyen estos plexos son básicamente las neuronas, la glía y las ICC. ¿Son las células gliales, al igual que en el SNC, la células madre adultas del SNE?, ¿podrían las ICC desempeñar algún papel en la neurogénesis adulta?

Para responder a estas preguntas hemos planteado los objetivos que se describen a continuación.

Objetivos

Los **objetivos generales** de esta tesis doctoral han sido:

1. Profundizar en el estudio ultraestructural de las ICC en el tracto gastrointestinal.
2. Valorar el papel de las ICC en la neurogénesis entérica adulta.

Estos objetivos generales se han desarrollado a partir de los siguientes **objetivos específicos**:

1. Demostrar la presencia de las ICC en la lámina propia del duodeno de rata Wistar.
2. Estudiar la relación que las ICC establecen entre sí y con los elementos de su entorno: vasos sanguíneos, células epiteliales de la mucosa y troncos nerviosos.
3. Constatar la presencia del cilio único en las ICC de la lámina propia, la submucosa y el plexo mientérico de rata Wistar.
4. Examinar la localización celular de nestina (marcador de células progenitoras en el SNC) en los ganglios entéricos del duodeno de rata Wistar.

Presentación de las publicaciones

Puesto que la MET ha supuesto un gran apoyo en la identificación de las ICC, nosotros igualmente hemos considerado esta técnica como una herramienta fundamental en el desarrollo de esta tesis. De tal manera, que se ha realizado principalmente un estudio ultraestructural de las ICC en relación con la lamina propia, localización preestablecida por Santiago Ramón y Cajal, pero que hasta el momento no había sido objeto de un profundo estudio a nivel ultraestructural (**artículo I**).

Además, hemos establecido las relaciones que estas células establecen entre sí, con otros tipos celulares (células del sistema inmune y células neuroendocrinas) y especialmente con los vasos sanguíneos, profundizando en el conocimiento de los nichos vasculares (**artículo II**).

Del mismo modo, hemos realizado una búsqueda exhaustiva para constatar la presencia del cilio único como una característica constante en la identificación ultraestructural de una subpoblación de células intersticiales, y en consecuencia, su posible papel como células progenitoras (**artículo III**). En esta vía, como a día de hoy se desconoce cuáles son los progenitores neurales entéricos *in vivo*, y no es posible descartar a ningún tipo celular, siguiendo con las pautas establecidas en el modelo de neurogénesis en el SNC, se ha planteado un estudio inmunocitoquímico preliminar de marcadores de células progenitoras, tales como la nestina (**artículo IV**).

Publicaciones

Los resultados de la investigación desarrollada, para la elaboración de la presente tesis doctoral, han quedado plasmados en los siguientes artículos:

- I. **Cantarero Carmona I**, Luesma Bartolomé MJ, Junquera Escribano C. Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. *J Cell Mol Med*. 2011; 15(1): 26-30. **F.I: 4.608 (2010)**.
- II. **Cantarero I**, Luesma MJ, Junquera C. The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med*. 2011. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x. **F.I: 4.608 (2010)**.
- III. Junquera Escribano C, **Cantarero Carmona I**, Luesma Bartolomé MJ, Soriano-Navarro M, Martínez-Ciriano C, Castiella Muruzábal T, García-Verdugo JM. The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol*. 2011; 26(4): 461-70. **F.I: 2.502 (2010)**.
- IV. **Cantarero Carmona I**, Luesma Bartolomé MJ, Lavoie-Gagnon C, Junquera Escribano C. Distribution of nestin protein: immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. *Microsc Res Tech*. 2011; 74(2): 148-52. **F.I: 1.712 (2010)**.

Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy

I. Cantarero Carmona^{a, b, *}, M. J. Luesma Bartolomé^{a, b}, C. Junquera Escribano^{a, b}

^a Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

^b Aragon Health Sciences Institute (I+CS), Zaragoza, Spain

Received: September 16, 2010; Accepted: November 1, 2010

Abstract

Recently the new term 'telocytes' has been proposed for cells formerly known as interstitial Cajal-like cells. In fact, telocytes are not really Cajal-like cells, they being different from all other interstitial cells by the presence of telopodes, which are cell-body prolongations, very thin, extremely long with a moniliform aspect. The identification of these cells is based on ultrastructural criteria. The presence of telocytes in others organs was previously documented. We reported for the first time, an ultrastructural study of telocytes in the lamina propria of rat duodenum. Our findings show that typical telocytes are present in the rat duodenum. Telocytes are located in the lamina propria, immediately below mucosal crypts. Telopodes frequently establish close spatial relationships with immune cells, blood vessels and nerve endings. On the basis of their distribution and morphology, we suggest that these cells may be involved in immune response and in our opinion, it may be possible that different locations of telocytes could be associated with different roles.

Keywords: telocytes • telopodes • lamina propria • transmission electron microscopy • duodenum • ultrastructure

Introduction

In 1893, Santiago Ramon and Cajal used the Golgi technique and methylene blue staining to describe, in amphibians [1] and several mammals [2], spindle-shaped or stellate cells associated with autonomic nerve endings of the intestine; he termed them 'primitive neurons'. At present, the term 'interstitial cells of Cajal' (ICC) refers to several types of cells located in the musculature of the gastrointestinal tract and, morphologically and functionally, intercalated between the segments of the enteric nervous system and smooth muscle cells.

For the past 10 years many groups were interested in whether or not ICC are present outside the gastrointestinal tract, and indeed, peculiar interstitial cells were found in: upper and lower urinary tracts [3–7], blood vessels [8–12], pancreas [13–14], male and female reproductive tracts [15], mammary gland [16], placenta [17], heart [18] and gut [19]. Such cells, now mostly known as interstitial Cajal-like cells (ICLC), were given different and confusing names.

Recently the new term 'telocytes' (telos, *i.e.* provided with long-distance cell projections) has been proposed for cells formerly known as ICLC, and the term 'telopodes' has been proposed for their very long and very thin prolongations [20]. We share these arguments and for the sake of standardization; these terms will be used from this point of view.

Here we show the presence of telocytes and telopodes in the lamina propria, immediately below mucosal crypts, of rat duodenum by transmission electron microscopy (TEM). Their functional significance in the lamina propria must be studied more extensively.

Materials and methods

Animal use

Six adult Wistar rats, 3 months old (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), were used in accordance with institutional guidelines (Ethics Advisory Commission for Animal Experimentation, PI 22/08). Each animal had *ad libitum* access to food and water and was fed on a complete and balanced standard laboratory diet (Teklad 4% rat diet 7001; Harlan Teklad, Madison, WI, USA). They were housed in temperature controlled rooms (20 ± 1°C) and natural light.

*Correspondence to: Irene Cantarero CARMONA, Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza, Spain.
Tel.: +34 976761674
Fax: +34 976761754
E-mail: irene-cantarero@hotmail.com

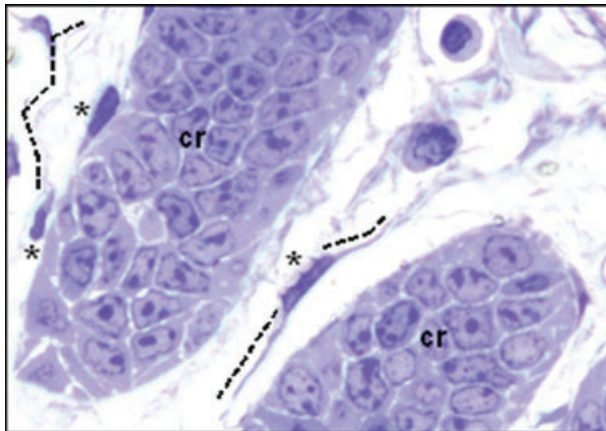


Fig. 1 Rat duodenum. Non-conventional light microscopy; objective 100 \times . Tissue fixed with glutaraldehyde–paraformaldehyde and post-fixed in OsO₄. Thin section of Araldite-embedded material was stained with toluidine blue. At least three telocytes (asterisks) are present in the interstitium among crypt (cr).

All rats were anesthetized, killed and perfused intracardially with the specific fixative of the technique described below.

Transmission electron microscopy

Duodenum samples (about 1–1.5 mm³) were washed in phosphate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. The pieces were fixed overnight at room temperature in the same fixative, washed in 0.1 M phosphate buffer for 5 min., post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded acetones (30%, 50%, 70% with 2% uranyl-acetate, 90%, 100%), cleared in propylene oxide and embedded in araldite (Durcupan, Fluka AG, Buchs SG, Switzerland). Semi-thin sections (1.5 μ m) were cut with a diamond knife and stained lightly with 1% toluidine blue. Later, ultrathin (0.08 μ m) sections were cut with a diamond knife, collected on Formvar coated single-slot grids, counterstained with 1% uranyl acetate and with Reynold's lead citrate for 10 min. and examined under a FEI Tecnai G2 Spirit TEM. The images were achieved with Advanced Microscopy Techniques, Corp.'s Charge-Coupled Device (CCD) (Danvers, MA, USA) imaging system.

Semi-thin sections ($\leq 1 \mu$ m thick) were stained with toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation, Tokyo, Japan).

Results

Light microscopy on semi-thin sections

Telocytes were easily identifiable as cells with long cellular processes that extend into the connective tissue beneath mucosal crypts in toluidine blue semi-thin sections (Fig. 1).

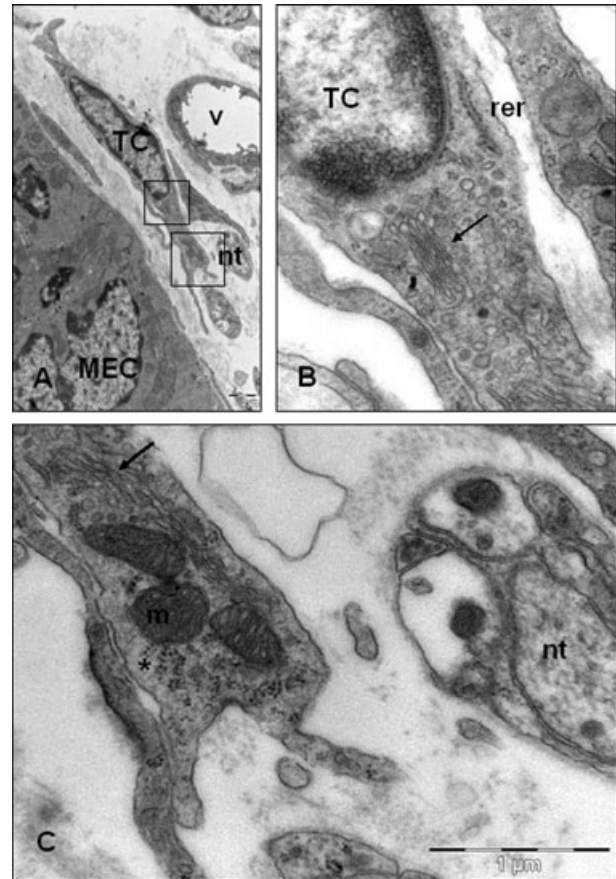


Fig. 2 Telocyte typical ultrastructural features. (A) Telocytes are found in close opposition to nervous trunks (nt) and blood vessels (v). Square marked area in (A) are enlarged in (B) and (C). (B, C) The perinuclear cytoplasm contains a small Golgi complex (arrows), elements of rough endoplasmic reticulum (rer) and distally, presents abundant mitochondria (m) and polyribosomes (asterisks). In this case, the surface cell membranes not covered with a basal lamina. TC: telocyte; MEC: mucosal epithelial cell.

Transmission electron microscopy

TEM examination is fundamental in identifying the telocytes.

Figure 2(A) shows general aspect of the telocyte: small cellular body, containing a nucleus, surrounded by a small amount of cytoplasm. The nucleus contains a thin band of marginal heterochromatin attached to the nuclear envelope.

The perinuclear cytoplasm contains a small Golgi complex, cytoskeletal elements as well as, elements of rough and smooth endoplasmic reticulum. Distally, the telocyte presents abundant mitochondria and polyribosomes (Fig. 2B and C).

The shape of the telocytes is according to the number of their telopodes: piriform for one prolongation (Fig. 3A), spindle for two telopodes, triangular for three, stellate, etc. (Fig. 3B). Their spatial appearance would be that of a polyhedron with a different number

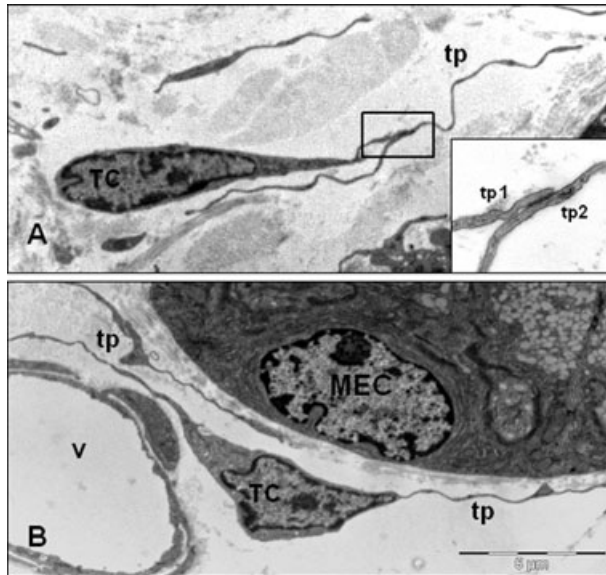


Fig. 3 The shape of the telocytes is according to the number of their telopodes (tp). (A) Piriform for one prolongation. Inset: gap junction connecting the processes of two telopodes (tp1, tp2). (B) Triangular shape for two telopodes in the vicinity of a blood vessel (v). TC: telocytes; MEC: mucosal epithelial cell.

of vertices, depending on their telopode number. Of course, the number of prolongations as well as the ramifications of telopodes depend on the site and angle of section, because TEM is essentially a 2D examination of an extremely thin section (~60 nm).

Figure 4(A) presents several examples of complex systems of telopodes which connect, for example, telocytes with immune cells in the lamina propria. A multicontact synapsis between an eosinophil and a telopode indicated by black rectangular area. Blue and red square illustrating higher magnification of telopodes (tp) from (A) in (B) and (C), respectively.

(B) Distinctive dichotomous pattern of branching (arrows). (C) Direct cellular contact (arrowhead) between two telopodes (tp1, tp2) showing junctional complexes. MEC: mucosal epithelial cell; LY: lymphocyte; E: eosinophile cells; e: endothelial cell.

Another distinctive ultrastructural feature of telopodes is the formation of labyrinthine apparatus with very convoluted profile and a dichotomous patterns of branching (Fig. 4B), but, we have observed another having a surface without flexions or irregularities. Also, it is common that telopodes present dilations, where accommodate mitochondria and endoplasmic reticulum, and establish junctional complexes between two telopodes (Fig. 4C).

Figure 5 illustrates the exchange of molecules between telocytes and the extracellular matrix or other cells in lamina propria; the shape of the telopodes seems to help this telocyte to deliver multivesicular bodies as exosomes.

For the last one the close vicinity with nerve fibres and blood vessel deserves to be mentioned. Telocytes have 'strategic' positioning in a tissue, in between blood capillaries and their specific target cells (mucosa epithelial cells) and in close contact with nerve endings (Fig. 2A). Some telocytes were observed very close to enterochromaffin cells, where they form close contacts with them. Enterochromaffin cells (neuroendocrine cells) present secreting granules generally spherical or spindle shaped, which contain electron-dense core (Fig. 6).

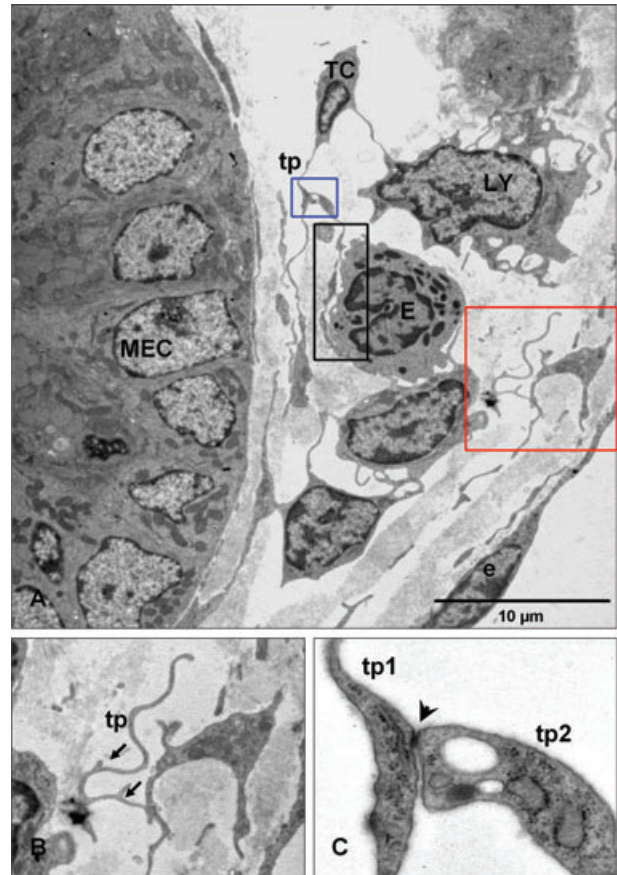


Fig. 4 Relation of telocytes with other cells in the lamina propria. (A) The processes of a telocyte establish numerous interactions with adjacent cells in the lamina propria. A multicontact synapsis between an eosinophil and a telopode indicated by black rectangular area. Blue and red square illustrating higher magnification of telopodes (tp) from (A) in (B) and (C), respectively. (B) Distinctive dichotomous pattern of branching (arrows). (C) Direct cellular contact (arrowhead) between two telopodes (tp1, tp2) showing junctional complexes. MEC: mucosal epithelial cell; LY: lymphocyte; E: eosinophile cells; e: endothelial cell.

Discussion

Electron microscopy study unequivocally demonstrated the presence of the telocytes in the duodenum lamina propria, having their distinctive ultrastructural features according to the TEM diagnostic criteria for telocytes [20]. However, the ultrastructural features of telocytes comprise distinct cellular compartments: cell body, cellular prolongations (telopodes) and the labyrinthine system made of telopodes.

- (1) Location in the connective interstitium, in the extraepithelial space, among functional elements: blood vessels, nerve endings, immunoreactive cells.
- (2) Telopodes: (a) typical long, thin, moniliform prolongations, with (b) dichotomic branching pattern; (c) two to three

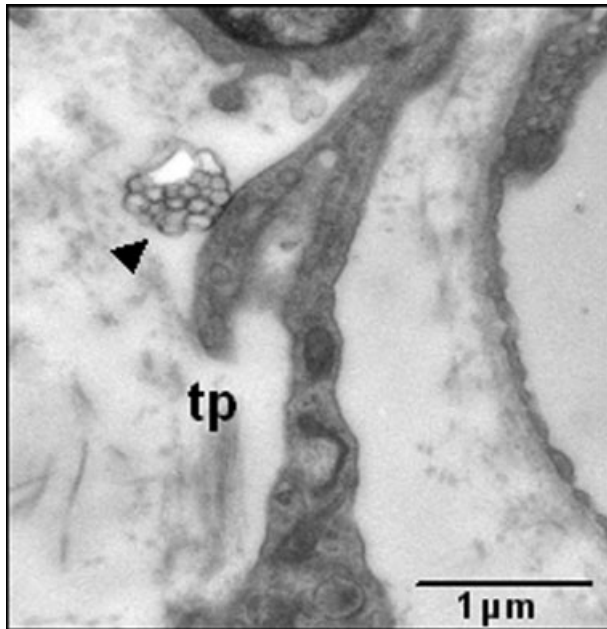


Fig. 5 Electron micrographs show details of telopodes (tp) from lamina propria of rat duodenum. Exosomes (arrowhead) emerge from telopodes in the interstitial space.

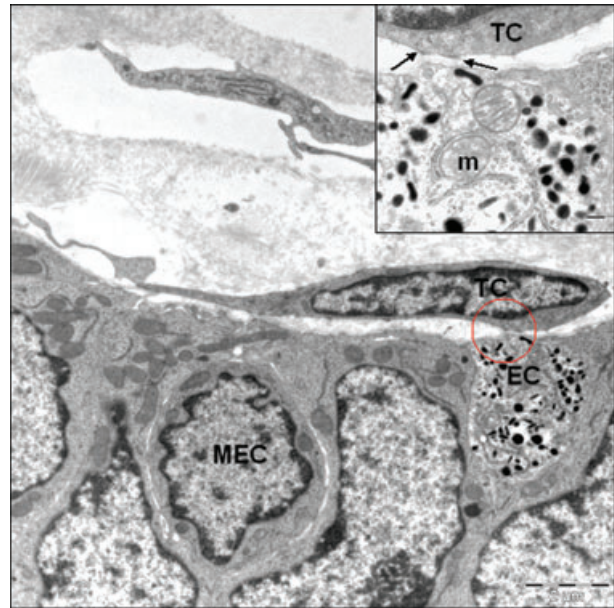


Fig. 6 Close contact between telocyte (TC) and enterochromaffin cells (EC). Inset: electron-dense reinforcements in telocyte membrane (arrows). Note the enterochromaffin cell with large amounts of pleomorphic secretory granules. MEC: mucosal epithelial cell; m: mitochondria.

telopodes are observed on single section; (d) specialized cell-to-cell junctions (gap junctions, junctional complexes).

Although the term telocytes is relatively new, the screening of the literature revealed several studies evaluating the presence the telocytes themselves in other organs: epicardium [21], myocardium [22], endocardium [23] and placenta [24].

The role of telocyte is unknown to us. However, based on several publications of telocytes, some relevant and potential roles were proposed. Popescu and Faussone-Pellegrini [20] suggested that telocytes are involved in intercellular signalling, taking into account the 3D network of telopodes and their strategic position in between target cells, blood capillary and nerve ending. They considered at least two mechanisms could be involved: (1) a paracrine and/or juxtacrine secretion of small signal molecules and (2) shedding microvesicles, which play unique roles in horizontal transfer of important macromolecules among neighbouring cells (*e.g.* proteins or RNAs, microRNA included).

Kostin (2010) suggested possible functions of telocytes in the myocardium:

- (1) Telocytes are involved in intercellular signalling at distance because they are situated very close to blood capillaries and nerve endings.
- (2) Telocytes, owing to their extremely long telopodes and their ability to form attachment plaques connecting them to the extracellular matrix, are predicted to function as mechanoreceptors/transducers.
- (3) Telocytes are key players in cardiac renewal and, likewise, in cardiac repair.

Telocytes relations with the other elements of the lamina propria

Telocytes were often in close proximity to nerve bundles and blood vessels as shown also in other localization.

We observed the relationship between telocyte and neuroendocrine cells. Gut neuroendocrine cells are highly specialized mucosal epithelial cells that produce a wide range of hormones. Studies on the distribution and frequency of endocrine cells have been performed in the gastrointestinal tract of the rat [25] and human beings [26] and others, with a view to understanding their role in the gut. The neuroendocrine cells heterogeneity and concentration in the duodenum may be related to regulation of the secretion of pancreatic juice and bile as well as to functional control of the small intestine [27–29]. Instead, the telocyte–enterochromaffin cells proximity may have a special significance here.

Popescu described the close contacts (synapses) that establish ICC and ICC-like cells (now termed ‘telocytes’) with several types of immunoreactive cells: lymphocytes, plasma cells, eosinophils, basophils, macrophages and mast cells in human mammary gland and myometrium, rat stomach, gut, bladder and uterus. We also observed these contacts with eosinophils or lymphocytes present in the rat duodenum lamina propria. This author proposed that ICC-like processes might also act as ‘cellular’ guides for immune cells that arrive *via* blood stream. ICC-like might display gradients of membrane-bound or soluble chemoattractants and these

cells might contribute to the process of leucocytes homing in connective tissues [30].

In conclusion, this study shows that telocytes exist in duodenum lamia propria. On the basis of their distribution and morphology, we suggest that these cells may be involved in immune response and in our opinion, it could be possible that different locations of telocytes could be associated with different roles. Currently, however, the presumed role(s) for lamina propria telocytes is the subject of speculation and further studies are required.

Acknowledgements

This research has received financial support from Aragon Institute of Health Sciences (I+CS) (PIPAMER 0903) and the European Social Fund (ESF), DGA (B83).

Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

References

1. **Ramón y Cajal S.** Notes on the Auerbach's plexus of the frog. *Histological laboratory works of the Medicine Faculty of Barcelona.* 1892; 23–8.
2. **Ramón y Cajal S.** Ganglia and nerve plexus of the mammal gut and some contributions to our studies on the spine and sympathetic nervous system. *Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya;* 1893: p. 5–37.
3. **Hashitani H, Suzuki H.** Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis. *Br J Pharmacol.* 2004; 141: 199–204.
4. **Davidson RA, McCloskey KD.** Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle and neurons. *J Urol.* 2005; 173: 1385–90.
5. **McHale NG, Hollywood MA, Sergeant GP, et al.** Organization and function of ICC in the urinary tract. *J Physiol.* 2006; 576: 689–94.
6. **Sergeant GP, Thornbury KD, McHale NG, et al.** Interstitial cells of Cajal in the urethra. *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 280–91.
7. **Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, et al.** Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor. *Cell Tissue Res.* 2009; 335: 517–27.
8. **Bobryshev YV.** Subset of cells immunopositive for neurokinin-1 receptor identified as arterial interstitial cells of Cajal in human large arteries. *Cell Tissue Res.* 2005; 321: 45–55.
9. **Harhun MI, Pucovsky V, Povstyan OV, et al.** Interstitial cells in the vasculature. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 232–43.
10. **Harhun M, Gordienko D, Kryshtal D, et al.** Role of intracellular stores in the regulation of rhythmical [Ca²⁺]_i changes in interstitial cells of Cajal from rabbit portal vein. *Cell Calcium.* 2006; 40: 287–98.
11. **Pucovsky V, Harhun MI, Povstyan OV, et al.** Close relation of arterial ICC-like cells to the contractile phenotype of vascular smooth muscle cell. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 764–75.
12. **Morel E, Meyronet D, Thivolet-Beju F, et al.** Identification and distribution of interstitial Cajal cells in human pulmonary veins. *Heart Rhythm.* 2008; 5: 1063–7.
13. **Popescu L, Hinescu M, Radu E, et al.** CD117/c-kit positive interstitial (Cajal-like) cells in human pancreas. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 738–9.
14. **Popescu LM, Hinescu ME, Ionescu N, et al.** Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 169–90.
15. **Hutchings G, Williams O, Cretoiu D, et al.** Myometrial interstitial cells and the coordination of myometrial contractility. *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 4268–82.
16. **Gherghiceanu M, Popescu LM.** Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human resting mammary gland stroma. Transmission electron microscope (TEM) identification. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 893–910.
17. **Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M.** Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 590–7.
18. **Kostin S, Popescu LM.** A distinct type of cell in myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLCs). *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 295–308.
19. **Pieri L, Vannucchi MG, Fausone-Pellegrini MS.** Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1944–55.
20. **Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS.** TELECYTES – a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via interstitial Cajal-like cells (ICLC) to TELECYTES. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 729–40.
21. **Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, et al.** Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 2085–93.
22. **Kostin S.** Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 1917–21.
23. **Gherghiceanu M, Manole CG, Popescu LM.** Telocytes in endocardium: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 2330–34.
24. **Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M, et al.** Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs.* 2010; 192: 325–39.
25. **Lundqvist M, Arnberg H, Candell J, et al.** Silver stains for identification of neuroendocrine cells. A study of the chemical background. *Histochem J.* 1990; 22: 615–23.
26. **Sjolund K, Sanden G, Hakanson R, et al.** Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology.* 1993; 85: 1120–30.
27. **Kitamura N, Yamada J, Yamashita T, et al.** Endocrine cells in the gastrointestinal tract of cat as revealed by various staining methods. *Jap J Vet Sci.* 1982; 44: 427–31.
28. **Kitamura N, Yamada J, Calingasan NY, et al.** Histochemical and immunocytochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the cow and calf. *Am J Vet Res.* 1985; 46: 1381–86.
29. **Krause WJ, Yamada J, Cutts JH.** Quantitative distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the adult opossum, *Didelphis virginiana*. *J Anat.* 1985; 140: 591–605.
30. **Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D, et al.** The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ. *J Cell Mol Med.* 2005; 9: 714–30.

Title:

The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging

Authors:

I. Cantarero ^{1 2*}; M J. Luesma ^{1 2}; C. Junquera ^{1 2}.

Institutional affiliation:

¹ Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

² Aragon Health Sciences Institute (I+CS), Zaragoza, Spain.

Received date: 24-Feb-2011, Accepted date: 17-Mar-2011

Author responsible for correspondence:

Irene Cantarero Carmona.

Department of Human Anatomy and Histology.

Faculty of Medicine. University of Zaragoza.

Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza, España.

Phone: +34 976761674.

Fax: +34 976761754.

Email: irene-cantarero@hotmail.com

This is an Accepted Work that has been peer-reviewed and approved for publication in the *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. See <http://www.blackwell-synergy.com/loi/jcmm> for details. Please cite this article as a "Postprint"; 10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x

ABSTRACT.

Blood vessels are highly organized and complex structures, which are far more than simple tubes conducting the blood to almost any tissue of the body. The fine structure of the wall of blood vessels has been studied previously using the electron microscope, but the presence of telocytes associated with vasculature, a specific new cellular entity, has not been studied in depth. Interestingly, telocytes have been recently found in the epicardium, myocardium, endocardium, human term placenta, duodenal lamina propria and pleura. We show the presence of telocytes located on the extracellular matrix of blood vessels (arterioles, venules and capillaries) by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. Also, we demonstrated the first evidence of a primary cilium in telocytes. Several functions have been proposed for these cells. Here, the telocyte-blood vessels cell proximity, the relationship between telocytes, exosomes and nervous trunks may have a special significance.

KEYWORDS: Telocytes • primary cilium • vasculature • transmission electron microscopy.

INTRODUCTION.

Blood vessels are highly organized and complex structure, which are far more than simple tubes conducting the blood to almost any tissue of the body. They are able to autonomously regulate the blood flow, thus providing the tissues an optimal support of oxygen and nutrients and an efficient removal of waste products [1]. The blood supply of the duodenum is confusing due to the diverse possibilities of origin, distribution, and individual variations [2].

The wall of the large vessels usually contains endothelial cells, inner circular and outer longitudinal smooth muscle layers, nerve cells, connective tissue and collagen and elastic fibres. The fine structure of the wall of blood vessels has been studied previously using the electron microscope [3], but the presence of telocytes associated with vasculature, a specific new cellular entity, has not been studied in depth. Interestingly, telocytes have been recently found in the epicardium [4], myocardium [5-7], endocardium [8], human term placenta [9], duodenal lamina propria [10] and pleura [11].

Due to electron microscopy and histochemical techniques as well as the possibilities of investigation at the single cell level, the interest in the investigation of the features, function and localization of telocytes have increased. These cells have a small oval body, mainly occupied by the nucleus, surrounded by a small amount of cytoplasm. The perinuclear cytoplasm is rich in mitochondria, contains a small Golgi apparatus, as well as elements of rough and smooth endoplasmic reticulum and cytoskeletal elements (thin and intermediate filaments). As a main characteristic, telocytes have two or three thin and long processes, telopodes, with dichotomic branching pattern [12].

In this paper, we show the presence of telocytes located on the extracellular matrix of blood vessels (arterioles, venules and capillaries) by immunohistochemistry and transmission electron microscopy (TEM). Also, we demonstrated the first evidence of a primary cilium in telocytes. Several functions have been proposed for these cells. Here, the telocyte-blood vessels cell proximity, the relationship between telocyte and nervous trunks and the presence of primary cilium may have a special significance.

MATERIALS AND METHODS.

Animal Use.

Six adult Wistar rats, 3 months old, weighing between 180-210 g (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), were used in accordance with institutional guidelines (Ethics Advisory Commission for animal Experimentation, PI 36/10). Each animal had ad libitum access to food and water and was fed on a complete and balanced standard laboratory diet (Teklad 4% rat diet 7001; Harlan Teklad, Madison, WI, USA). They were housed in temperature controlled rooms ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) and natural light.

All rats were anesthetized, killed and perfused intracardially with the specific fixative of the technique described below.

Immunohistochemistry.

The duodenum samples (n=6) were fixed for 6 hours with formal saline solution at 10% pH 7. Immunohistochemical staining was performed on paraffin sections 5 μm thick using the immunohistochemistry EnVision® (Dako) method. The primary antibody used in this study was: polyclonal rabbit anti-CD117/c-Kit (1:50; ABIN188397, Antibodies-Online, Aachen, Germany). Antibody was diluted with Dako diluent (S2022; Dako, Carpinteria, CA). The tissue sections were deparaffined in xylene (10 min. twice) and rehydrated in a graded ethanol series up to distilled water. Before all assays, for heat-induced antigen retrieval, the samples were treated during 6 min. in an 800-W microwave oven with 10% citrate buffer (S2031; Dako, Carpinteria, CA) in distilled water and at 360 W for 5 additional minutes. After washing twice with PBS, 3 min., the sections were treated with endogenous peroxidase blocking (S2001; Dako, Carpinteria, CA) for 20 min., washed in distilled water and blocking buffer [100 ml PBS, 2 ml triton X100, 0.25 ml BSA (A4503, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)], for 3 min., twice. The blocking was repeated for a second time. The sections were incubated with the primary antibody solution for 30 min. followed by a rinse in PBS, for 3 min., twice. Sections not incubated with the primary antibody were used as negative control. The visualization was made by incubating with Envision® peroxidase-based visualization kit (K5007; Dako, Carpinteria, CA) during 30 min, washed twice in PBS, for 3 min. according to manufacturer's directions. To confirm the presence of immunocomplexes, 3,3'-diaminobenzidine was used as chromogene and hydrogen peroxide as substrate. The samples were washed twice in distilled water, contrasted with Mayer's hematoxylin for 7 min., washed in tap water for 15 min., dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene

and coverslipped with DPX. Digital microscope images were captured by means of an Olympus BX 51 microscope.

Transmission electron microscopy (TEM).

Duodenum samples (about 1–1.5 mm³) were washed in phosphate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. The pieces were fixed overnight at room temperature in the same fixative, washed in 0.1 M phosphate buffer for 5 min., post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded acetones (30%, 50%, 70% with 2% uranyl-acetate, 90%, 100%), cleared in propylene oxide and embedded in araldite (Durocupan, Fluka AG, Buchs SG, Switzerland). Semi-thin sections (1.5 µm) were cut with a diamond knife and stained lightly with 1% toluidine blue. Later, ultrathin (0.08 µm) sections were cut with a diamond knife, collected on Formvar coated single-slot grids, counterstained with 1% uranyl acetate and with Reynold's lead citrate for 10 min. and examined under a FEI Tecnai G2 Spirit TEM. The images were achieved with Advanced Microscopy Techniques, Corp.'s Charge-Coupled Device (CCD) (Danvers, MA, USA) imaging system. Semi-thin sections (≤1 µm thick) were stained with toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation, Tokyo, Japan).

RESULTS.

Light Microscopy.

By immunohistochemistry, cell expressing the stemness marker c-kit could be found in all the types of blood vessels studied: arterioles, venules and capillaries. c-kit was expressed in cells located just behind the muscle layer surrounding blood vessels (Fig 1A). Sections containing archetypal myenteric plexus interstitial cell of Cajal (ICC-MP) from the digestive tract were used as positive controls (Fig 1B).

Light Microscopy on Semithin Sections.

Toluidine blue staining revealed the general morphology of telocyte: the fusiform or triangular cell bodies and the emerging cytoplasmic processes, telopodes, that surround capillary (Fig. 2A) and arteriole (Fig. 2B). The moniliform aspect and sinuous trajectory of telopodes is evident. However, with the exception of nucleus, no other subcellular component (organelle) can be really recognized inside the telocytes with this tissue processing and the given resolving power.

Transmission electron microscopy (TEM).

Using electron microscopy, we observed that telocytes have been clearly found in the loose connective tissue surrounding the arterioles, venules and capillaries. Telocytes associated with the vasculature were morphologically similar to those previously found in other locations. In arterioles, the telocytes often send telopodes bordering the tunica adventitia (Fig 3A). The adjacent telopodes may establish junctional complexes (Fig. 3B) and show small dilatations (podoms) that accommodate rough endoplasmic reticulum (Fig. 3C). In relation to venules and capillaries, the telocytes were located parallel with the longitudinal axis of the smooth muscle cells of the vessel wall (Fig. 4A and 4B, respectively). Also, the telopodes can form a wide network around the blood vessels (Fig. 4C).

Vascular telocytes showed typical features: small cellular body; long, thin and moniliform prolongations with dichotomic branching pattern; mitochondria, well-developed Golgi apparatus and polyribosomes. In addition, we have identified a novel cytoplasmic component; a deep invagination that is continuous with the plasma membrane, the cilium-pit, which accommodate the primary cilium (Fig. 5A and 5B). The cilium that extends into the extracellular matrix showed a structure 9 + 0 (absence of the central filaments) and a length of about 2–3 μm (Fig. 6A and 6B).

Sometimes, we observed small membrane vesicles secreted by telocytes into the extracellular compartment called exosomes (Fig. 7).

DISCUSSION.

In the vascular system, we characterize a cell population does not correspond to any of the other cell types present in the vessels wall: endothelial cells, smooth muscle cells (SMCs), fibroblasts, inflammatory cells, and pericytes. Cells with irregular bodies and numerous thin long processes, interstitial cells of Cajal (ICCs) or interstitial Cajal-like cells (ICLCs), have been described in the vasculature [13-14]: rat mesenteric artery [15], human pulmonary veins [16] and rabbit portal vein [17]. Not all the above cases, the ICCs were positive for c-kit. Using electron microscopy and exclusion criteria defined by Popescu [12], the results we obtained so far prove that it has many phenotypic and morphologic features related to the archetypal telocytes.

Although in the last papers we have witnessed an increased interest and knowledge about telocytes and their relation to blood vessels, several unsolved issues regarding these cells should be emphasized. Apart from several studies reporting the presence of telopodes in close proximity to blood vessel, there are virtually no studies to address the properties of telocytes in the vasculature.

Telopodes and interstitial network.

Popescu suggested that telocytes seem to form an interstitial network in endocardium [8], human term placenta [9] and in pleura [18]. In the first case, the telocytes were connected by gap junctions in a network extending into the placental stroma between concentric layers formed by SMC and myofibroblasts around large blood vessels. However, their telopodes were often connected through a “plug and socket” complex, as revealed by electron tomography, in case of the pleura. We also observed this interstitial network surrounding the blood vessels where the telopodes were connected by gap junctions.

Primary cilium of telocytes.

As mentioned in this paper, the ultrastructural identity of telocytes is well established and unequivocal. However, we have identified a relevant feature in these cells, the presence of a single non-motile cilium called primary cilium. Primary cilia contain a 9+0 axoneme, consisting of nine outer doublet microtubules but lacking the central pair of microtubules that is found in the 9+2 axonemes of most motile cilia. Except for nodal cilia, primary cilia are thought to lack axonemal dyneins and be immotile [19].

A recent study has suggested that in cells displaying an internal primary cilium, the cilium extends towards the cell surface through a channel lined with a membrane that in its mature form is continuous with the plasma membrane and only a portion of the cilium extends free of the cell margin and into the cellular environment. They have designated this cilium-filled channel the *cilium-pit* and the space between the cilium and the walls of the pit the *cilium reservoir*. The cilium reservoir is continuous with the extracellular environment [20].

This structure has also been reported in interstitial cells of Cajal by our research group [21-22]. Since the discovery of this organelle in 1898 [23], three major hypotheses for their function have been put forth. The first is that they are vestigial organelles inherited from an ancestor whose cells had motile cilia, and that they now have no purpose [24]. A second hypothesis is that primary cilia are closely linked with the cell cycle. In postmitotic cells, the centrosome, which is composed of two centrioles surrounded by pericentriolar material, migrates to the cell surface, and one of the centrioles differentiates into a basal body that nucleates microtubules to give rise to the primary cilium. During mitosis, the primary cilium is disassembled and the centrosome organizes the bipolar spindle [25].

Such a role would not be incompatible with the third hypothesis, which is that primary cilia are sensory organelles [26]. This hypothesis is suggested by the fact that, first, cilia are clearly used as sensory organelles in lower eukaryotes; second, the sensory structures of the vertebrate visual and olfactory systems are modified cilia and third, the primary cilium has emerged as key organelle, for example, in hedgehog signal transduction in mammalian systems [19, 27]. The primary cilium of telocytes associated with the vasculature may be particularly important in signaling processes within the vascular niche.

Telocytes as progenitor cells.

Recently it has been suggested that telocytes could be considered an early step in the differentiation process of the mesenchymal cells, a subpopulation of progenitor cells among the stromal cells of human placenta [9]. In fact, besides being c-kit-positive, the telocytes co-expressed other stem-cell markers including CD34, CD44 [28] and nestin [29]. On the other hand, the primary cilium is necessary for chemically induced differentiation of human mesenchymal stem cells [30]. Then, based on the previous considerations, we can add a new phenotypic characteristic, the primary cilium, and support the previous hypothesis given by Suci [9].

Vascular Niche.

Some previous studies demonstrate that, for example, ICC processes might act as 'cellular' guides for immune cells that arrive via blood stream [31] or telocytes have 'strategic' positioning in a tissue, in between blood capillaries and their specific target cells (e.g. smooth muscle cells, cardiomyocytes) and in close contact with nerve ending [12]. Vascular cells are key elements of different cellular niches, for example in the adult hippocampus [32], the bone marrow [33], the intestine and skin [34]. Based on our observations, we think that "mesenchymal cell niche" is composed of telocytes, nerve fibers and blood vessels. Telocytes whose somas did not contact blood vessels frequently extended their telopodes toward the vasculature and nervous trunks.

The presence of exosomes seems to be a conserved feature in the telocytes, regardless of their location. An increasing body of evidence indicates that they play a pivotal role in cell-to-cell communication. Indeed, they may directly stimulate target cells by receptor-mediated interactions or may transfer from the cell of origin various bioactive molecules including membrane receptors, proteins, mRNAs, microRNAs and organelles [35]. Although other roles have been suggested, such as, immune system modulation [36].

We suggest that blood vessels and nerve fibers can create a favorable microenvironment ("niche") in the differentiation process of mesenchymal precursor cells so, the telocytes could secrete exosomes with the aim to modulate their microenvironment.

In conclusion, the present study has revealed the characteristics of telocytes in duodenal vasculature. We considered that the telocytes might contribute to the regulation of microvascular niche and to participate in heterocellular communication mediated by gap junctions and exosomes. Of particular interest is the presence of primary cilium. At least for the moment, we strongly believe in previous hypothesis that telocytes may be a subpopulation of mesenchymal progenitor cells.

ACKNOWLEDGMENTS.

This research has received financial support from Aragon Institute of Health Sciences (I+CS) (PIPAMER 10/001) and the European Social Fund (ESF), DGA (B83).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT.

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

REFERENCES.

1. **Eble JA, Niland S.** The extracellular matrix of blood vessels. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(12): 1385-400.
2. **Skandalakis LJ, Skandalakis JE, Skandalakis PN.** Duodenum. In: *Surgical Anatomy & Technique: A Pocket Manual.* Springer; 2008. p. 333-346.
3. **Gabella G.** A symmetric distribution of dense bands in muscle cells of mammalian arterioles. *J Ultrastruct Res.* 1983; 84(1): 24-33.
4. **Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, et al.** Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 2085-93.
5. **Kostin S.** Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 1917-21.
6. **Suciu L, Nicolescu MI, Popescu LM.** Cardiac telocytes: serial dynamic images in cell culture. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(11): 2687-92.
7. **Zhou J, Zhang Y, Wen X, et al.** Telocytes accompanying cardiomyocyte in primary culture: two- and three-dimensional culture environment. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(11): 2641-5.
8. **Gherghiceanu M, Manole CG, Popescu LM.** Telocytes in endocardium: Electron microscope evidence. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 2330-34.
9. **Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M, et al.** Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs.* 2010; 192: 325-39.
10. **Carmona IC, Bartolomé MJ, Escribano CJ.** Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(1): 26-30.
11. **Hinescu ME, Gherghiceanu M, Suciu L, et al.** Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(2): 389-97.
12. **Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS.** TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from interstitial cells of Cajal (ICC), via interstitial Cajal-like cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med.* 2010; 14: 729-40.
13. **Harhun MI, Pucovský V, Povstyan OV, et al.** Interstitial cells in the vasculature. *Cell Mol Med.* 2005; 9(2): 232-43.
14. **Bolton TB, Gordienko DV, Povstyan OV, et al.** Smooth muscle cells and interstitial cells of blood vessels. *Cell Calcium.* 2004; 35(6): 643-57. Review.

15. **Formey A, Buscemi L, Boittin FX, et al.** Identification and functional response of interstitial Cajal-like cells from rat mesenteric artery. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(3): 509-19
16. **Gherghiceanu M, Hinescu ME, Andrei F, et al.** Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in myocardial sleeves of human pulmonary veins. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(5A): 1777-81.
17. **Povstyan OV, Gordienko DV, Harhun MI, et al.** Identification of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein. *Cell Calcium.* 2003; 33(4): 223-39.
18. **Hinescu ME, Gherghiceanu M, Suci L, et al.** Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(2): 389-97.
19. **Pazour GJ, Witman GB.** The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(1): 105-10.
20. **Moser JJ, Fritzler MJ, Ou Y, et al.** The PCM-basal body/primary cilium coalition. *Semin Cell Dev Biol.* 2010; 21(2): 148-55.
21. **Junquera C, Martínez-Ciriano C, Castiella T, et al.** Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(4): 776-87.
22. **Junquera Escribano C, Cantarero Carmona I, Luesma Bartolomé MJ, et al.** The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol.* 2011; 26: 461-470.
23. **Zimmerman KW.** Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien [English translation: Contributions to knowledge of some glands and epithelium]. *Arch Mikr Anat.* 1898; 52: 552-706.
24. **Sorokin S.** Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1962; 15: 363-77.
25. **Plotnikova OV, Golemis EA, Pugacheva EN.** Cell cycle-dependent ciliogenesis and cancer. *Cancer Res.* 2008; 68: 2058-2061
26. **Singla V, Reiter JF.** The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science.* 2006; 313(5787): 629-33. Review.
27. **Eggenchwiler JT, Anderson KV.** Cilia and developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007; 23: 345-373.
28. **Blondheim NR, Levy YS, Ben-Zur T, et al.** Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. *Stem Cells Dev.* 2006; 15(2): 141-64.
29. **Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990; 60(4): 585-95.

30. **Tummala P, Arnsdorf EJ, Jacobs CR.** The Role of Primary Cilia in Mesenchymal Stem Cell Differentiation: A Pivotal Switch in Guiding Lineage Commitment. *Cell Mol Bioeng.* 2010; 3(3): 207-212.
31. **Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D, et al.** The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(3): 714-30.
32. **Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH.** Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000; 425(4): 479-94.
33. **Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, et al.** SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005; 121(7): 1109-21.
34. **Fuchs E, Tumber T, Guasch G.** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116(6): 769-78.
35. **Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al.** Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010; 78(9): 838-48.
36. **Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, et al.** The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 2002; 3(5): 321-30. Review.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1. **A:** Duodenal arteriole from Wistar rat. Positive immunostaining to CD117/c-kit in perivascular localization. Inset: Cell with fusiform body is intensely c-kit positive. **B:** Positive control in rat jejunum. Nuclei were counterstained with Mayer haematoxylin. ar: arteriole.

Figure 2. Light microscopy of toluidine-blue stained semithin sections of the duodenum Wistar rats. **A:** typical capillary (**A**) and arteriole (**B**) circumscribed by telocytes (arrows). Objective 40x.

Figure 3. Electron micrograph showing the close relationship between arteriole and telocytes. **A:** Telocyte covering collagen and elastic fibers present in the tunica adventitia. **B-C:** Higher magnification of boxed areas in A. **B:** Gap junction connecting the processes of two telopodes. **C:** Two dilations, podoms (pd1 and pd2) which accommodate rough endoplasmic reticulum. ar: arteriole. smcs: smooth muscle cells. tp: telopodes. nt: nervous trunk. TC: telocyte. pd: podom.

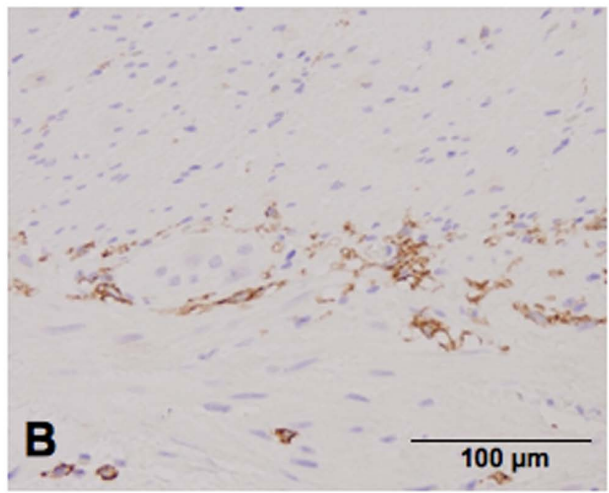
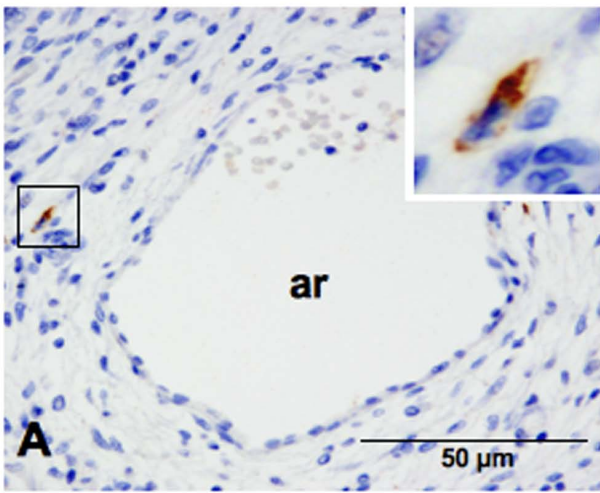
Figure 4. TEM images of telopodes next to a venule and capillary. **A:** Several telopodes bordering the smooth muscle cells of a venule. **B:** The capillary is partially surrounded by long telopodes. **C:** Numerous telopodes encloses a capillary. smc: smooth muscle cell. tp: telopodes. nt: nervous trunk. TC: telocyte. c: capillary. ve: venule.

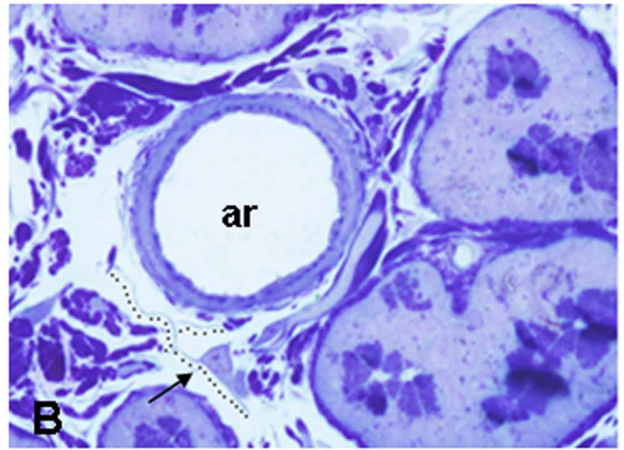
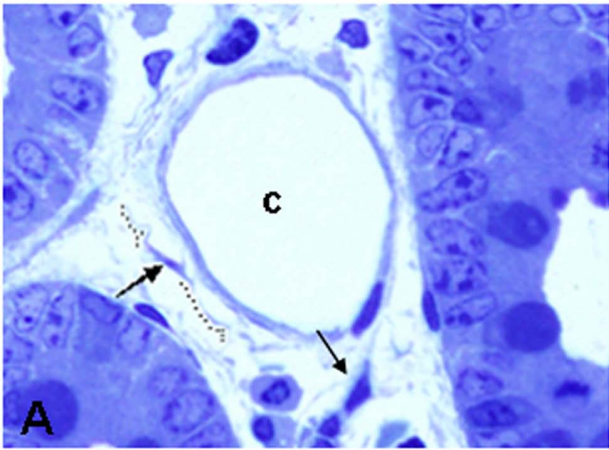
Figure 5. Transmission electron microscopy images of telocyte in close apposition to wall of venule. **A:** A typical example of telocyte: long, thin and moniliform processes with dichotomous pattern (arrowhead) of branching. Black square illustrating a higher magnification of telocyte from A. **B:** The perinuclear cytoplasm contains well-developed Golgi apparatus (G), mitochondria (m), numerous polyribosomes (asterisk) and intermediate filaments (f). Note the deep invagination (cilium-pit) corresponding to primary cilium. smc: smooth muscle cells. tp: telopodes. ax: axon. TC: telocyte. e: endothelial cell. cp: cilium-pit. pd: podom. ve: venule.

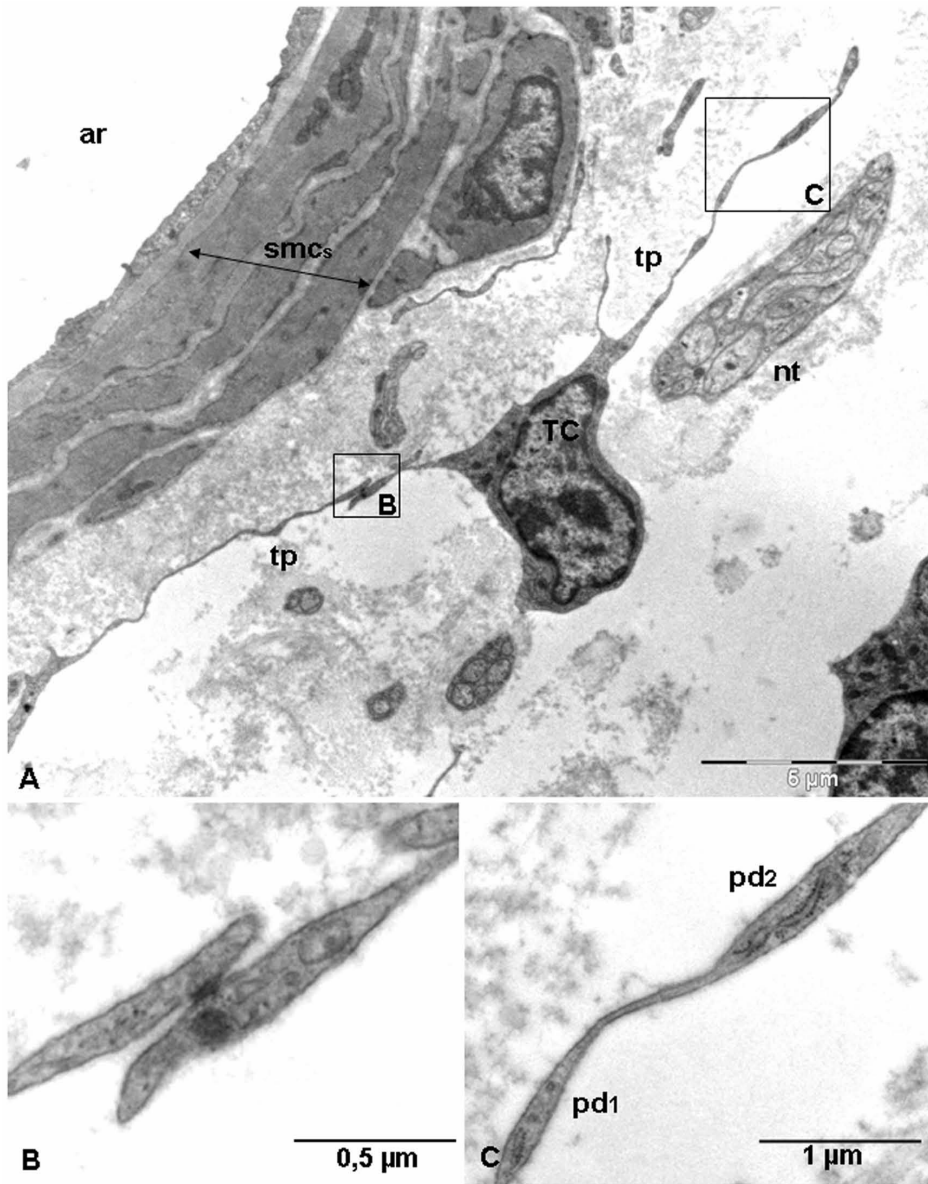
Figure 6. Duodenal venule. **A:** Telocyte located in parallel between the cells of the vessel wall and a nerve trunk. Note as the cytoplasm of telocyte establishes interactions with

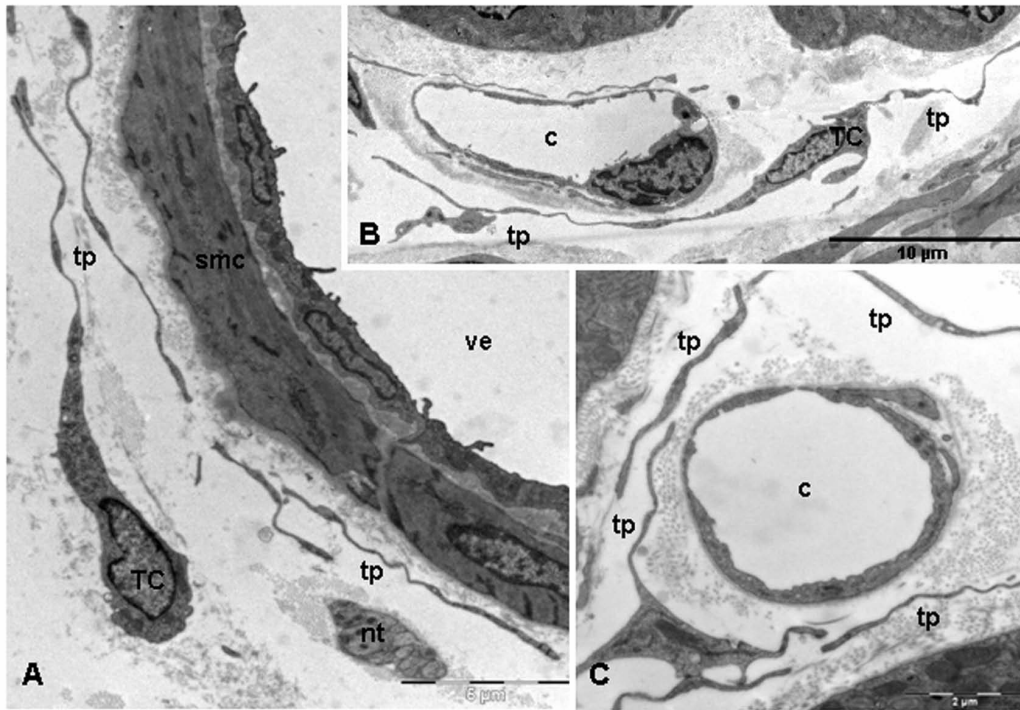
vascular smooth muscle. Black rectangular illustrating the primary cilium. **B**: Longitudinally section. Some telocytes exhibit a primary cilium. The basal body resides at the base of the cilium-pit and is associated with its membrane via the distal appendages (white arrow). Below the distal appendages are the subdistal appendages (black arrow). smc: smooth muscle cells. tp: telopodes. nt: nervous trunk. TC: telocyte. e: endothelial cell. ve: venule. G: golgi apparatus. m: mitochondria. rer: rough endoplasmic reticulum. li: lipid drop.

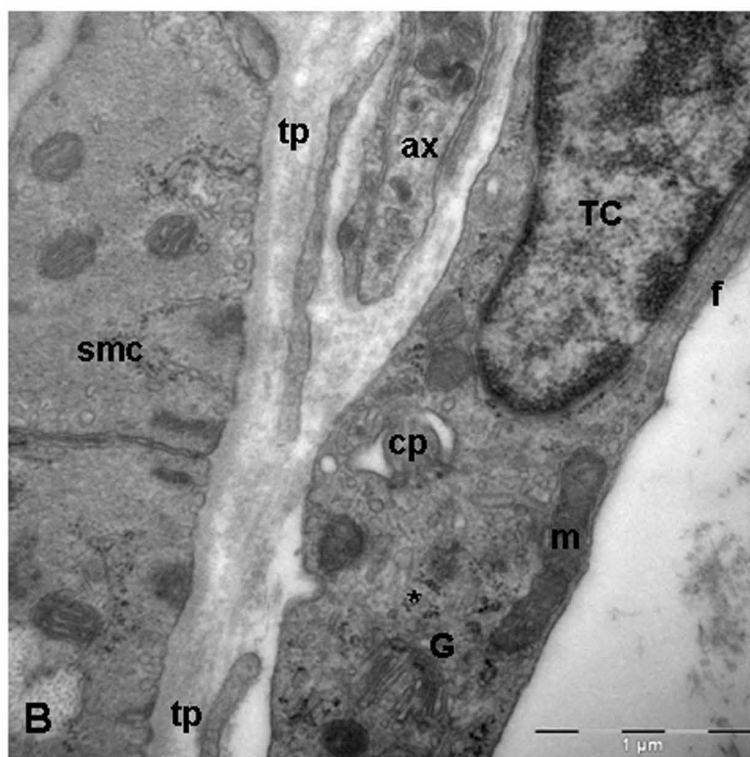
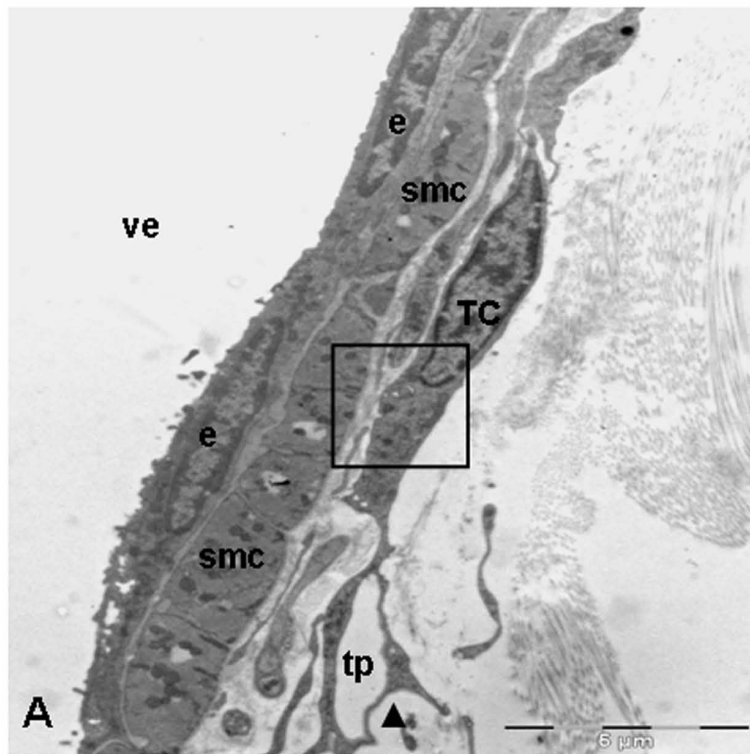
Figure 7. TEM. Isolated secretory vesicle with exosome morphology (arrow) from telocyte was located close to endothelial cell. nt: nervous trunk. TC: telocyte. c: capillary.

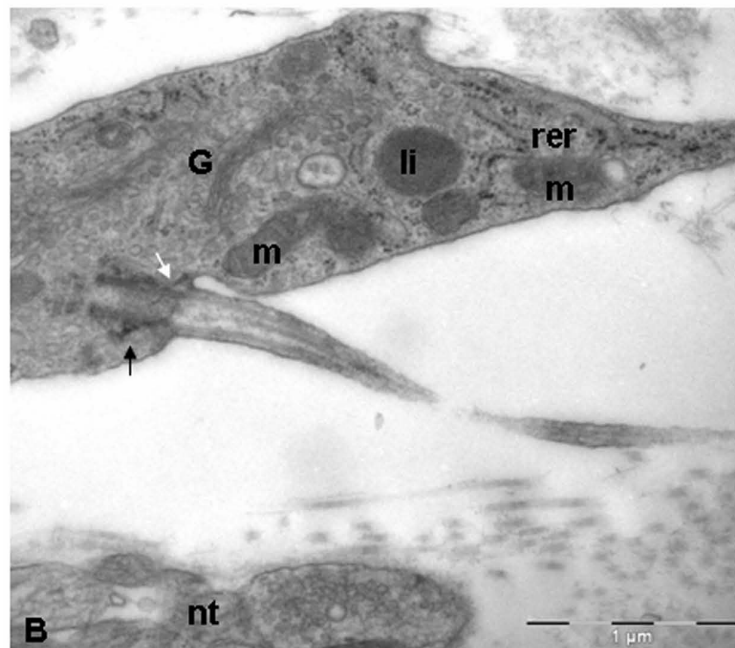
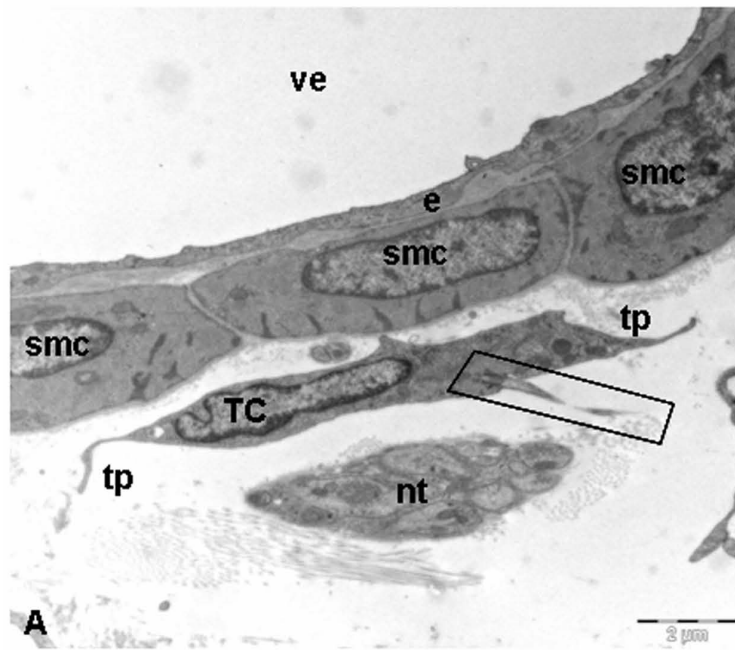


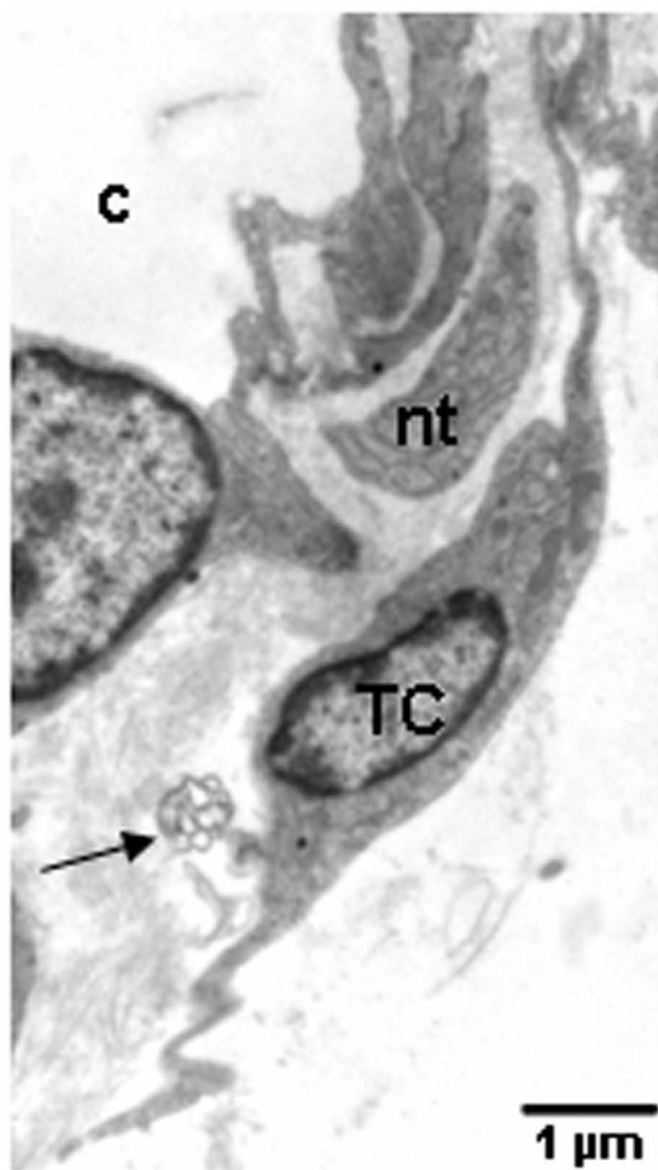












The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus

Concepción Junquera Escribano^{1,2}, Irene Cantarero Carmona^{1,2}, M^a José Luesma Bartolomé^{1,2}, Mario Soriano-Navarro⁴, Carmen Martínez-Ciriano^{1,2}, Tomás Castiella Muruzábal^{2,3} and José-Manuel García-Verdugo⁴

¹Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain, ²Aragon Health Sciences Institute, Zaragoza, Spain, ³"Lozano Blesa" University Clinical Hospital, Zaragoza, Spain and ⁴Prince Felipe Research Center, Valencia, Spain

Summary. Studies *in vitro* have permitted the identification of enteric neural progenitor cells. Now the question arises as to where these progenitor cells are located *in vivo*. The purpose of this paper is to identify possible candidate cells by means of transmission electron microscopy (TEM).

We have located three interstitial cellular types around the rat duodenum myenteric plexus. Type I cells have been identified as Interstitial Cells of Cajal (ICCs). These cells present well defined ultrastructural characteristics, including the triple connexion IC-nervous trunk- blood vessels. Type II cells show characteristics of immature cells, emphasizing the presence of a single cilium with the structure (9+0). To analyse this nanostructure, we have elaborated a reconstruction on ultrathin sections. The two previously described cellular types could be considered to be different functional states of the same cell. Type III cells present ultrastructural characteristics of fibroblast-like cells. This study suggests that Type II cells could be a source of neural progenitor cells.

Key words: Primary cilium, Interstitial cells, Enteric plexus, Progenitor cells, Stem cells, Ultrastructure, Electron microscopy.

Introduction

The enteric nervous system (ENS) is a collection of neurons in the gastrointestinal tract that constitutes the "brain of the gut". This system provides neural control for all functions of the gastrointestinal tract. Subsequent

examination of the functional and chemical diversity of enteric neurons revealed that the enteric nervous system closely resembles the central nervous system (CNS). In fact, the ultrastructure of the ENS is more similar to the CNS ultrastructure than to the rest of the peripheral nervous system (PNS) (Gershon et al., 1994; Gershon, 1997).

An increasing body of evidence has accumulated throughout recent years that supports the existence of multipotent neural progenitor cells in the adult mammalian gut, which are capable of differentiating into neurons, glia and other cell types (Kruger et al., 2002; Bondurand et al., 2003).

Rodent enteric neural stem cells have previously been isolated by flow cytometry and cell suspension cultures from smooth muscle layers of the entire gut wall of postnatal and adult animals (Suarez-Rodriguez and Belkind-Gershon, 2004). Recent studies described a different approach to obtain enteric ganglion-derived cells with the properties of neural progenitor cells, using isolated myenteric ganglia from the infant and adult human gut (Rauch et al., 2006; Metzger et al., 2009) and myenteric ganglia from postnatal rat ileum (Silva et al., 2008). These investigations provide evidence that neural crest-derived progenitors are located in the myenteric plexus. These precursors are nestin-immunopositive *in vitro*, they can be expanded as neurosphere-like bodies under the influence of EGF and FGF-2 and are induced to differentiate into neurons and glial cells (Silva et al., 2008).

Nestin expression is usually associated with dividing or migrating cells (Sahlgren et al., 2001). In addition, nestin is regarded as a marker for progenitor cells in the CNS (Lendahl et al., 1990).

The specific location of enteric neural crest-derived stem cells within the rodent gut wall has not yet been established *in vivo*. It might be expected that they would

reside within or, in close association with the enteric ganglia. Interstitial Cajal cells can be found close to enteric plexuses and surrounding the ganglions (Ramón y Cajal, 1893). The ultrastructural characteristics of these cells were established in different locations of rodent gastrointestinal tract (Horiguchi and Komuro, 1998; Komuro, 1998), but not of rat duodenum. Surprisingly, in the small intestine, some ICCs in the plane of the myenteric plexus were found to be nestin-immunopositive as has been demonstrated in humans (Vanderwinden et al., 2002) and some cells were scattered between the two muscle layers and intramuscularly in rat (Cantarero et al., 2010).

Since the nestin-positive stem cells which have generated neurospheres definitely come from the myenteric plexus, our ultrastructural study has focused initially on the identification of the different cell types that appear to be related to the enteric plexuses.

Evidently, a critical step towards understanding adult neurogenesis is the identification of the primary precursors that generate new neurons *in vivo*. The identification of a stem cell niche is crucial to understand the factors that regulate these cells.

The purpose of this report is to carry out an ultrastructural study of the enteric plexuses and the cells surrounding the ganglia, where the neural precursor cells must be found.

Material and methods

Animal Use

Four adult Wistar rats, three months old, (Jackson Laboratoires) were used in accordance with institutional guidelines (Ethics Advisory Commission for Animal Experimentation, PI 22/08). Each animal had ad libitum access to food and water and was fed on a complete and balanced standard laboratory diet (Teklad 4% rat diet 7001; Harlan Teklad, Madison, WI). They were housed in temperature controlled rooms ($20\pm 1^\circ\text{C}$) and under natural light.

The rats were anaesthetised with pentobarbital sodium and perfused intracardially with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde.

Electron Microscopy

The samples were washed in Palade tampon, post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded acetones (30%, 50%, 70% with 2% uranyl-acetate, 90%, 100%) cleared in propylene oxide and embedded in araldite (Durcupan, Fluka). Serial semithin sections ($1.5\ \mu\text{m}$) were cut with a diamond knife and stained lightly with 1% toluidine blue. Later, ultrathin ($0.08\ \mu\text{m}$) sections were cut with a diamond knife, collected on Formvar coated single-slot grids, counterstained with 1% uranyl acetate and for 10 minutes with Reynold's lead citrate and examined under a FEI Tecnai G2 Spirit transmission electron microscope. The images were

achieved with AMT's CCD imaging system. To determine the cilium ultrastructural characteristics in all its length, we examined 50 serial ultrathin sections.

Results

Myenteric ganglia were located intramuscularly in the connective tissue. In the neurons, the nucleus presented a uniformly distributed chromatin, a thin frame of marginal heterochromatin and a prominent nucleolus (Fig. 1A). Glial cells and thick axonal trunks constituted a part of these ganglion structures (Fig. 1B). We observed three types of non-neural cells in the connective space between the inner circular and the outer longitudinal muscle layers. These cells constitute a cellular net. They are interconnected through their cytoplasmic prolongations that extend from the ganglia periphery up to a capillary (Fig. 2A). Type I cells had an oval or stellate shape presenting a very voluminous nucleus with a finely distributed euchromatin with small condensations and a thin frame of marginal heterochromatin. It was surrounded by a small perinuclear cytoplasm which expanded with radial cytoplasmic processes (Fig. 2B). The cytoplasm of these cells was less electron-dense than the neighbouring smooth muscle cells. The long slender cytoplasmic processes of these cells often overlaid the ganglia (Fig. 1A) and nerve bundles (Fig. 1B) with only a small gap intervening. These cells contained several cisternae of rough endoplasmic reticulum, polysomes, many thin intermediate filaments, abundant mitochondria which extended throughout cytoplasmic processes, and dispersed caveolae along the cell membrane (Fig. 2C). These ultrastructural features corresponded to the currently accepted criteria for interstitial cells of Cajal (ICC) identification. They resembled fibroblasts, but were different on account of the lack of dilated cisternae of endoplasmic reticulum, less dense cytoplasmic matrix and frequent multiple cytoplasmic extensions. IC type I showed intercellular connexions forming a network through the duodenal wall (Fig. 3A,B); these homotypic connexions can be identified with electrodense reinforcement in the membranes of cellular prolongations (Fig. 3A,B). In parallel, more than two cells can be connected (Fig. 3B). These cells also established close contact with neighbouring smooth muscle cells (Fig. 3C); however, fibroblasts do not form close contacts with any other cells.

Type II cells were similar to type I but with certain differences. They had rather larger oval nuclei with simpler cell bodies and fewer cytoplasmic organelles, containing numerous free polyribosomes and limited rough endoplasmic reticulum. Their prolongations established close contacts with nervous trunks (Fig. 4A). These cells exhibited a single cilium with 9+0 pattern, derived from the parental centriole of the diplosomal pair. The single cilium emerging from a typical basal body was projected into the extracellular space. The mother centriole shows basal foot and cap (Fig. 4B). The

Primary cilium in interstitial cells

daughter centriole was close to the Golgi complex (Fig. 4C). We present three serial electron micrographs selected from a reconstruction to analyse the ultrastructure of this single cilium (Fig. 4).

In the circular smooth muscle layer, a population of interstitial cells of stellate morphology could be

observed establishing close association with nerve endings (Fig. 5A,B). Likewise, these cells established a close relationship with blood capillaries (Fig. 6A,B) and a connection with adjacent smooth muscle cells (Fig. 6C). The contact *nervous trunk - interstitial cell - capillary* is a constant interrelation in our observations.

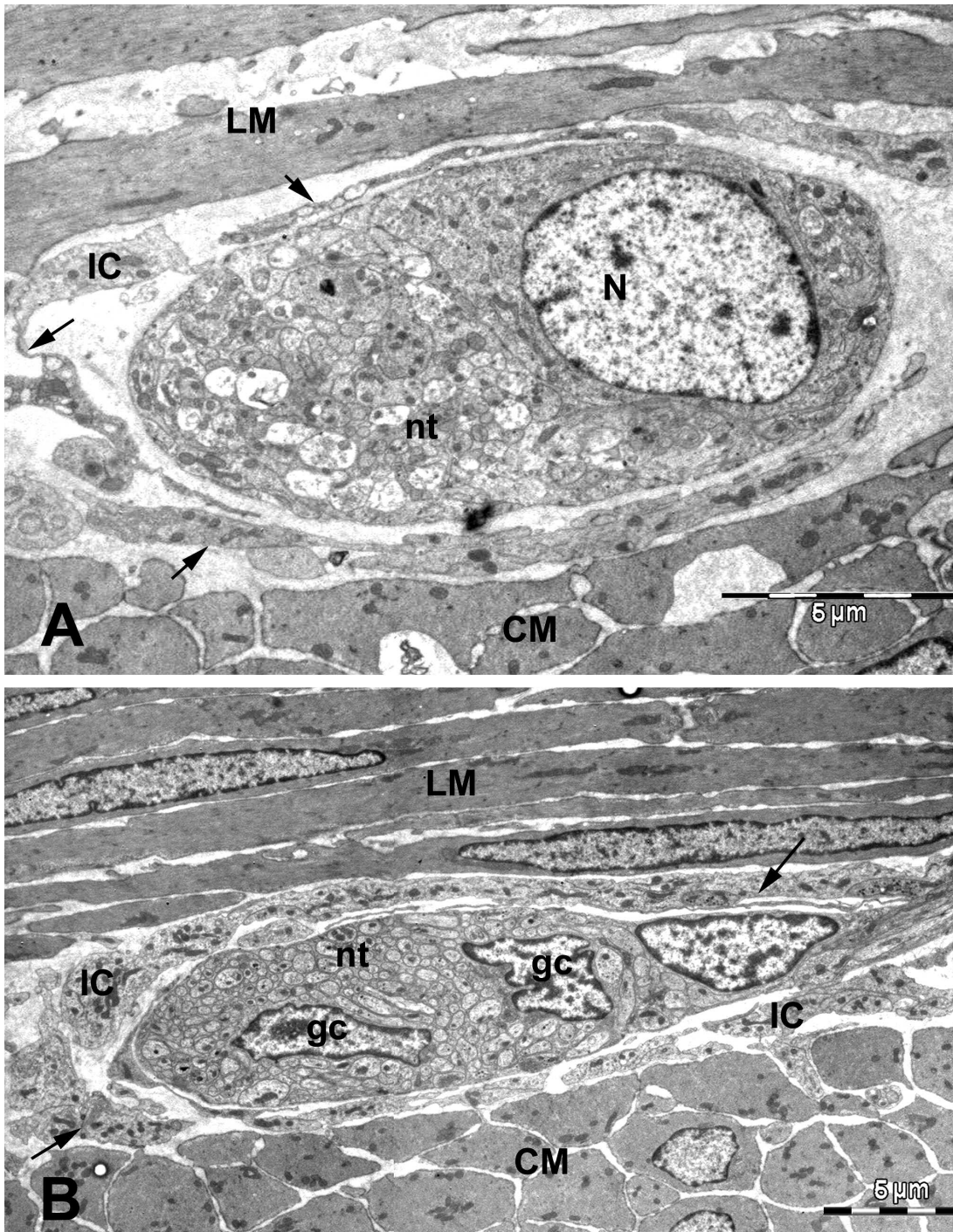


Fig. 1. Ganglion in the myenteric plexus of rat duodenum surrounded by cytoplasmic processes of interstitial cells (arrows). **A.** The nucleus of neurons had finely granular chromatin. **B.** The nucleus of glial cells was smaller and much more irregular, with a compact distribution of heterochromatin and a thin frame of marginal chromatin. N: neuron; gc: glial cell; nt: nervous trunk; IC: interstitial cell; LM: longitudinal muscle layer, CM: circular muscle layer.

Primary cilium in interstitial cells

The overall appearance of type II cells was suggestive of less-differentiated type I cells, and appeared detached from the IC network, although there was a gradual transition between the type I and type II cells. Type I cells do not present a primary cilium. This cilium emission, like a tiny antenna, is, without doubt, an indicative fact of a specific function of type II cells.

In minor proportion, in the periganglionic intramuscular connective tissue, we found a third cellular type which we identified as fibroblast-like. On an ultrastructural level, the fundamental differences with type I cells were: a fusiform and elongated nucleus, a cytoplasm with a more important electron density, less mitochondrial content and long slender processes which did not present

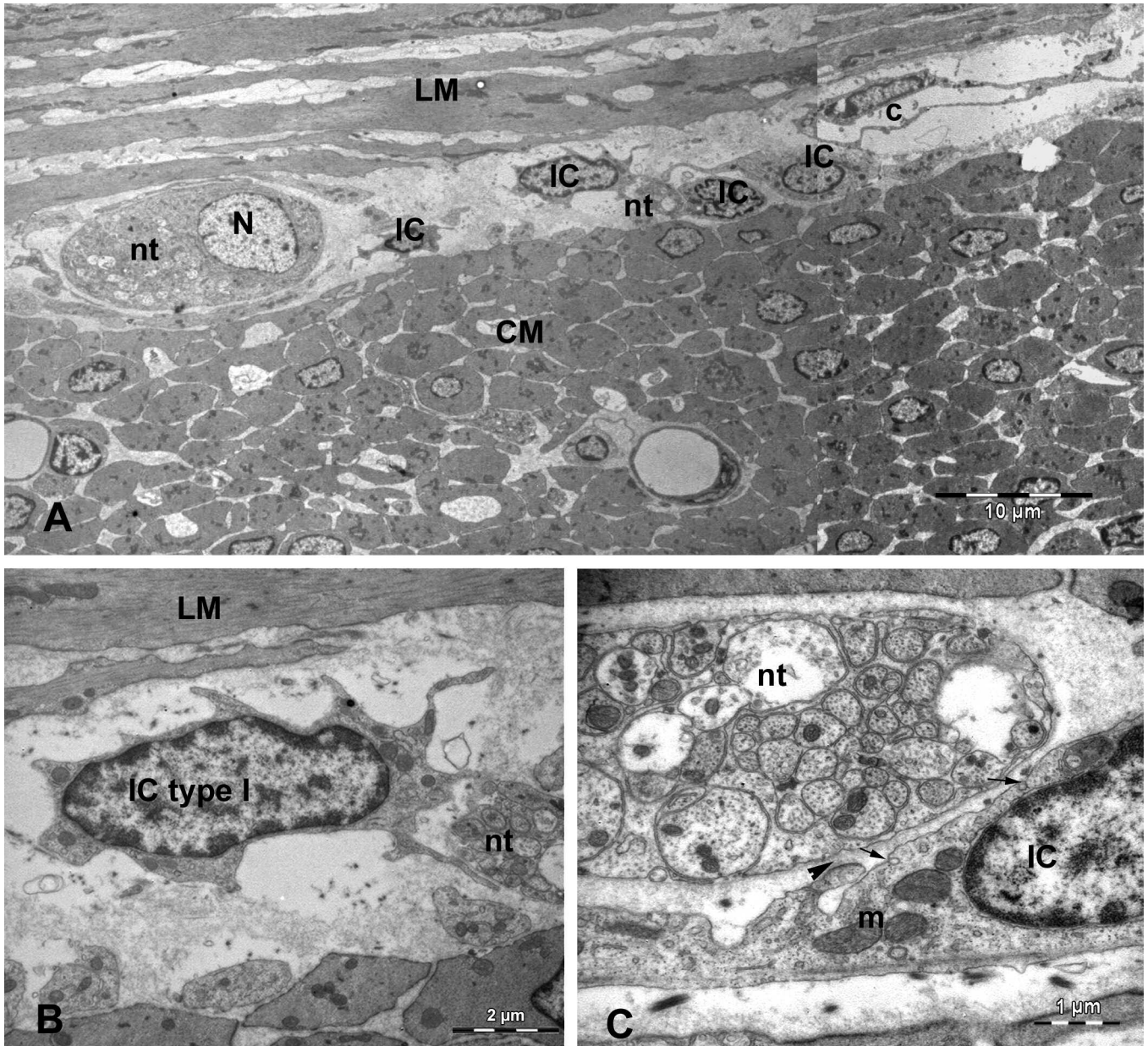


Fig. 2. Interstitial cells located in the connective space between the circular and longitudinal muscle layers. **A.** In the proximity of a ganglion are four interstitial cells between the two muscle coats. These cells show an oval or stellate shape, with long cytoplasmic processes. An interstitial cell with moniliform processes is located between the blood capillary and smooth muscle cells. **B.** Detail of 2A. IC Type I projecting slender cytoplasmic processes in various directions. Their cytoplasm is less electron-dense than the smooth muscle cells. **C.** Close association between an IC and a bundle of axons (arrowhead). Some mitochondria and caveolae can be seen (arrows). N: neuron; gc: glial cell; nt: nervous trunk; LM: longitudinal muscle layer; CM: circular muscle layer; c: capillary; m: mitochondria.

Primary cilium in interstitial cells

caveolae. These fibroblast-like prolongations established contacts with IC type II (Fig. 7).

Discussion

In this transmission electron microscope study, we have identified three cellular types. The ultrastructural characteristics that we described for type I cells coincide with the standards defined as well characterized ICCs. The second type seems to be a less differentiated cell that shows a single cilium as a remarkable characteristic.

A large variety in the structural features of ICCs in different portions of the digestive tract of different species has been recorded by some investigators (Komuro, 1982; Christensen, 1992; Junquera et al., 2001). Komuro refers to the different cytological

features of the cells that could represent morphological variations of the same cell type, or a mixture of different cell types, possibly including cells that were not typical ICCs. In the same way, Min and Leabu suggest that the developing gut contains progenitor cells gradually expressing different combinations of proteins. They also suggest that some of these progenitor cells may remain in adult tissues functioning as organ-specific stem cells (Min and Leabu, 2006). Previous results in rabbit duodenum have provided evidence that some populations of ICCs present immunohistochemical and ultrastructural characteristics that are often present in progenitor cells (Junquera et al., 2007). Recent publications have shown evidence of plasticity in these cells (Fausone-Pellegrini, 2005; Fausone-Pellegrini et al., 2006).

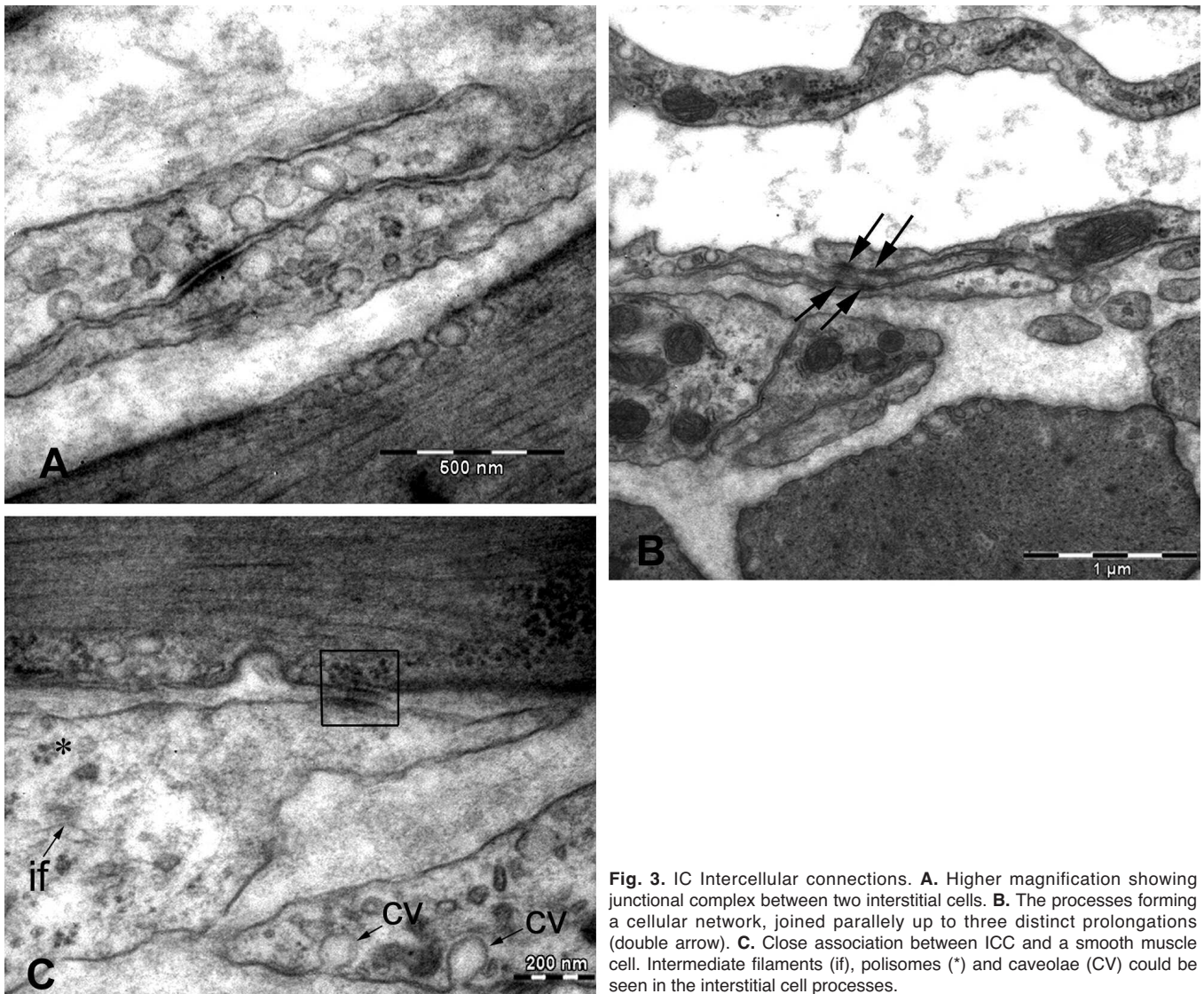


Fig. 3. IC Intercellular connections. **A.** Higher magnification showing junctional complex between two interstitial cells. **B.** The processes forming a cellular network, joined parallelly up to three distinct prolongations (double arrow). **C.** Close association between ICC and a smooth muscle cell. Intermediate filaments (if), polisomes (*) and caveolae (CV) could be seen in the interstitial cell processes.

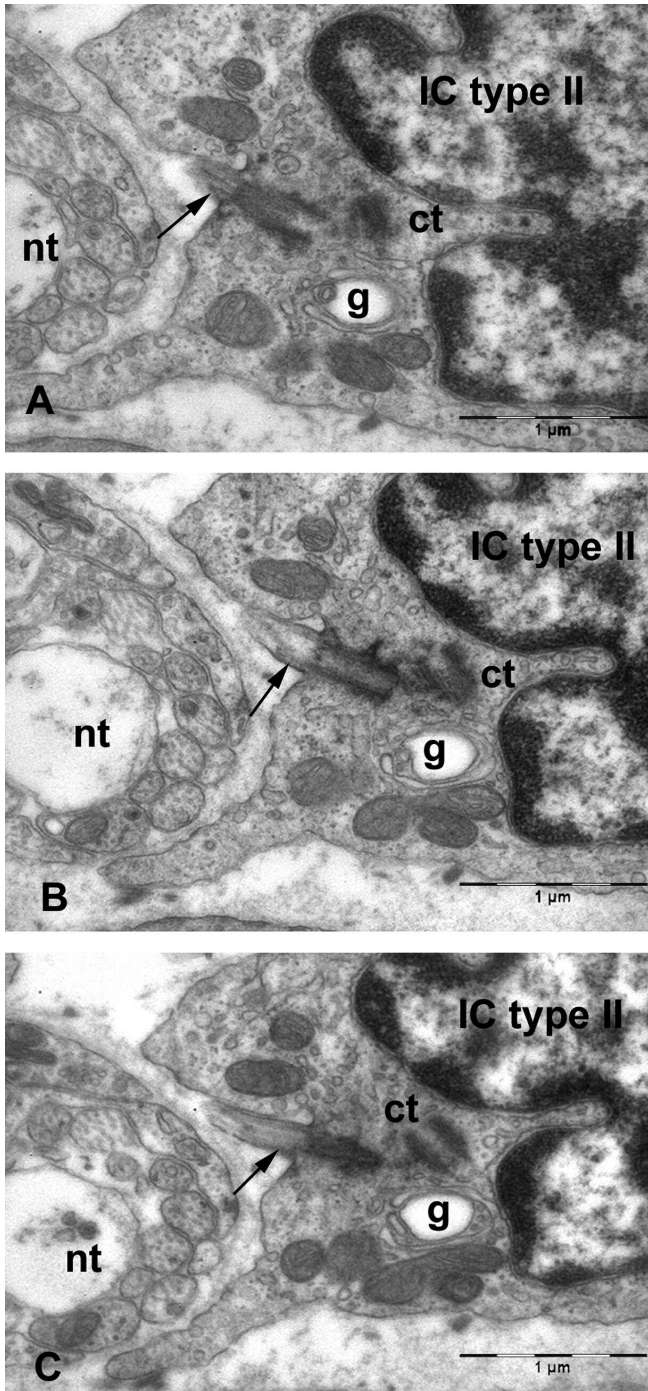


Fig. 4. IC Type II. Three ultrathin serial sections selected from the reconstruction of a primary cilium (arrow). The lack of the central pair of microtubules can be observed. The cilium emerging from a typical basal body that shows basal foot and cap (**B**). The daughter centriole was close to the Golgi complex; nt: nervous trunk, g: Golgi complex; ct: centriole.

Our view is that the different cytological morphologies found in interstitial cells which surround the ganglia of the myenteric plexus, may represent several degrees of differentiation of a progenitor cell that is located in the connective tissue of the adult intestine. Both cellular types described (type I and type II) could be considered different functional states of the same cell.

The primary cilium, which we found only in type II cells, is a single non-motile cilium derived from the parental centriole of the diplosomal pair; which seems to relocate itself into a position beneath the cell membrane after mitosis (Rieder et al., 1979). It generally differs from a motile cilium by its reduced length, its lack of motility due to the absence of dynein arms and lack of a central pair of microtubules in its axoneme, which are critical for directional controlled beating.

Several authors have reported the presence of a

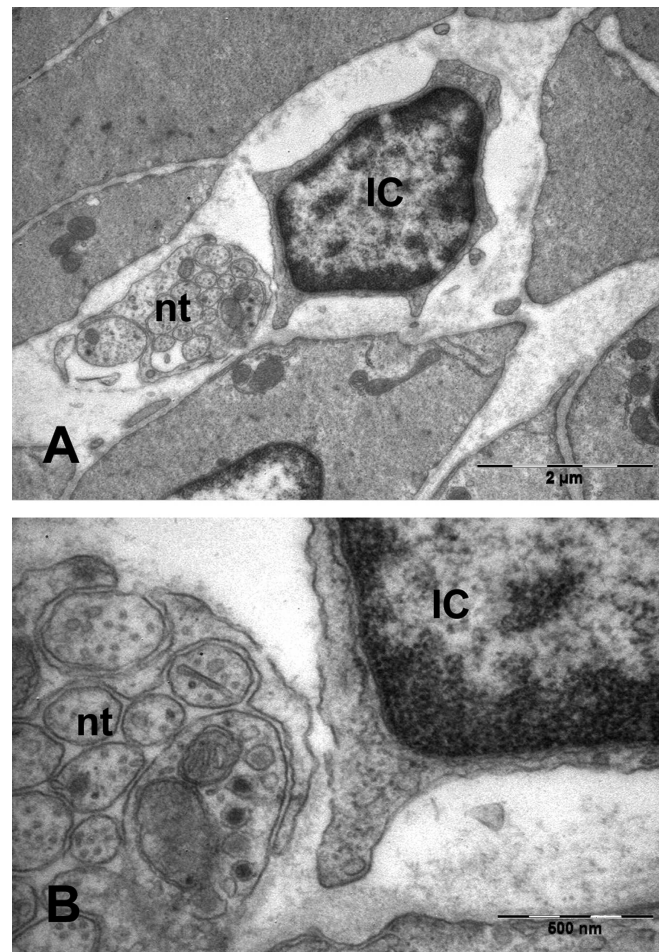


Fig. 5. TEM intramuscular IC. **A.** IC of stellate morphology in the connective tissue that surrounds the circular smooth muscle layer. **B.** Detail of 5A. Close association between IC and a nervous trunk, some varicosity contains peptidergic vesicles with electrondense central core. nt: nervous trunk; IC: interstitial cell.

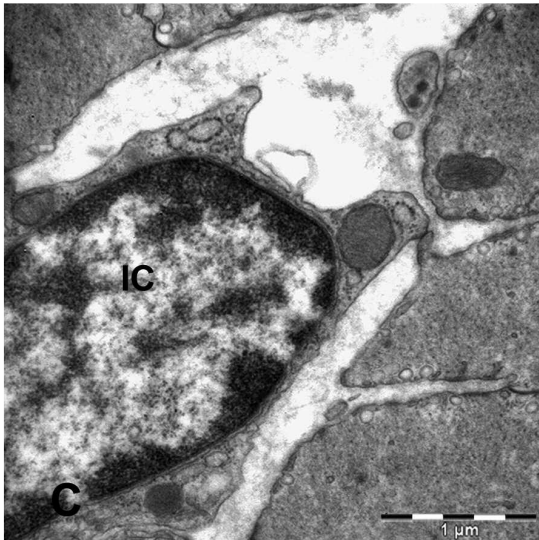
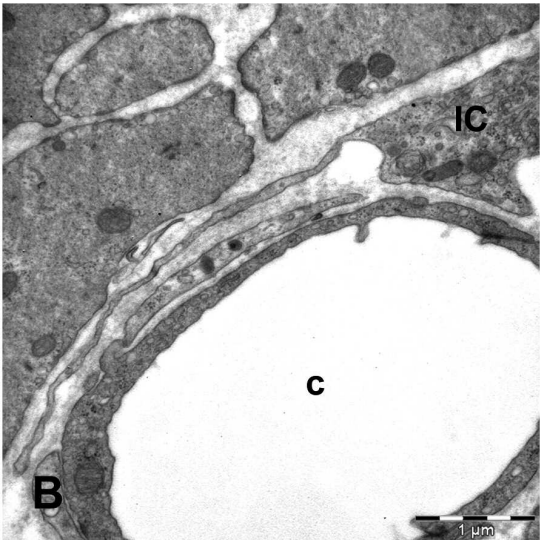
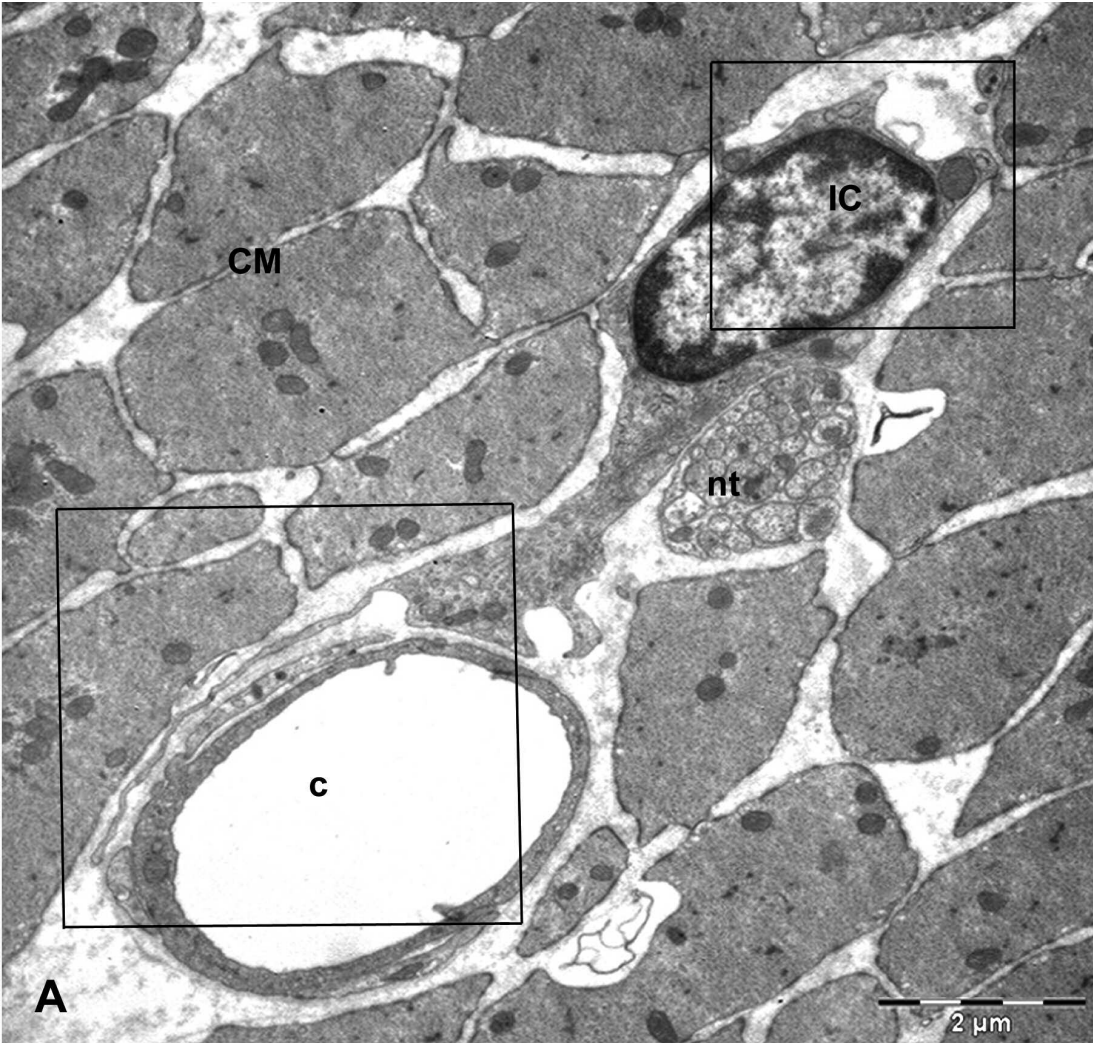


Fig. 6. Triad IC-Nervous trunk-capillary. **A.** Intramuscular IC projecting processes toward a capillary. **B.** Detail of 6A. A filiform process of intramuscular IC surrounding a capillary. **C.** Detail of 6A. The extreme opposite establishes a contact with a muscular cell. nt: nervous trunk; CM: circular muscle layer; c: capillary; IC: interstitial cell.

single cilium emerging from a basal centriole as an ultrastructural characteristic of precursor cells (Seeley and Nachury, 2010). It has also been published that neuronal precursors in the embryonic neuroepithelium extend a single cilium (Cohen and Meininger et al., 1987). The existence of a single cilium characterizes neural progenitor cells in the subventricular zone of the adult mouse (Doetsch et al., 1999; Alvarez-Builla et al., 2001; Alvarez-Builla and Lim, 2004; Doetsch, 2003). Neural stem cells in both embryonic and adult brains have a primary cilium (Han et al., 2008). Primary cilia in the developing dentate gyrus measured 1.5-2 μ m long and were present in cells containing numerous free ribosomes with little rough endoplasmic reticulum, which is characteristic of dividing progenitor cells. These characteristics are similar to those described in type II interstitial cells.

The dentate gyrus progenitors require primary cilia to mediate Sonic hedgehog (Shh) signalling at a critical stage of their development, when they are transitioning and expanding from embryonic to postnatal neural stem cells (Fu et al., 2004; Spassky et al., 2008). The single cilium is a sensory antenna which concentrates in its surface receptors for Shh signalling. In the same way, Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation and migration of enteric neural crest cells in the gut (Fu et al., 2004). The presence of a single cilium in interstitial cells type II ("activated" ICCs) could have the same functional meaning as for progenitor cells of the CNS and Shh signalling might act through the primary cilium.

The first objection to this approach is to admit that an ICC's subpopulation, considered to be of mesenchymal origin, could be neural progenitors. However, the existence of a cellular population emerging from the ventral part of the neural tube (VENT cells) and

migrating up to the anterior part of the gastrointestinal tract was demonstrated. These cells represent a neurons, glia and ICC source, which suggests the existence of a common progenitor for those three cellular lineages (Sohal et al., 2002).

In the small intestine, the ICCs in the plane of the myenteric plexus and some intramuscular cells were nestin-immunoreactive. Several, but not all, subpopulations of nestin-ir ICCs were Kit-immunoreactive, which indicates some functional subdivisions of the populations of ICCs (Vanderwinden et al., 2002). In rat duodenum, we recently demonstrated nestin-positive cells within myenteric ganglia, but also cells scattered between the two muscle layers and intramuscularly (Cantarero et al., 2010). As a first approach, we might think that at least a subpopulation of interstitial cells, the nestin-ir one, could represent *in vivo* the cells which might give neurospheres in specific culture conditions.

In addition to the two cellular types described in rat duodenum, we have found a third cellular type that we have identified as fibroblast-like, in accordance with Komuro and co-workers studies who identified these cells in rat stomach (Ishikawa et al., 1997) and mouse small intestine (Horiguchi and Komuro, 2000). It has been reported that immature ICCs have fibroblast-like features in Ws/Ws rat colon, where less ICCs were observed.

In vivo, SVZ neural stem cells and their progeny are coupled to blood vessels in a specialized vascular niche; transit-amplifying cells uniquely poised to receive spatial indications and regulatory signals from diverse elements of the vascular system (Tavazoie et al., 2008). SVZ B1 cells in adult mice extend a minute apical ending to directly contact the ventricle and a long basal process ending on blood vessels (Mirzadeh et al., 2008).

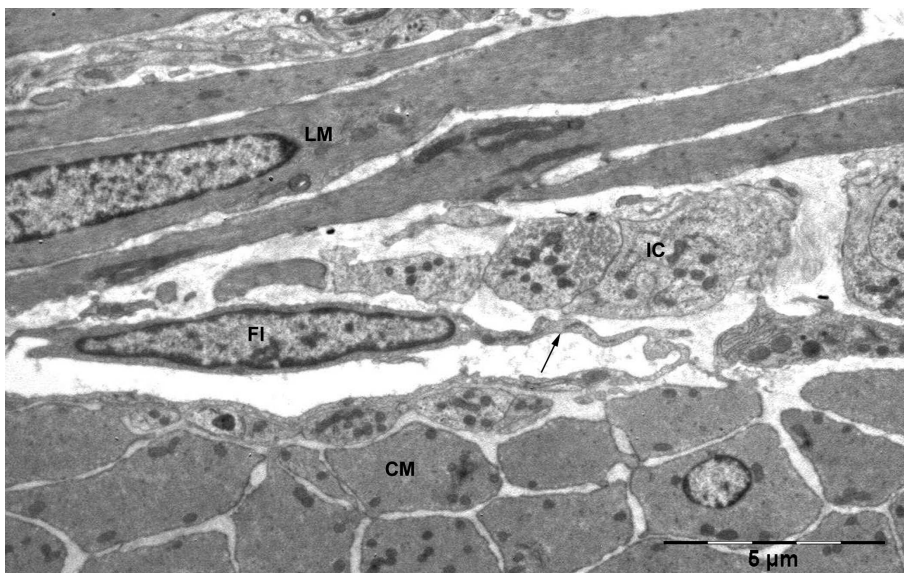


Fig. 7. Fibroblast-like (FI) in the myenteric region. Its long and filiform process establishes contacts with IC (arrow). No caveolae or close contact with smooth muscle cells was found.

Primary cilium in interstitial cells

As we have demonstrated in our results, interstitial cells establish, through their processes, contact with blood capillaries of the periganglionic region and with small capillaries located intramuscularly in the thickness of the muscular layer to receive spatial reminders and regulatory signals from diverse elements of the vascular system.

Conclusion

In this paper, we have established the ultrastructural characteristics of the interstitial cells localized around enteric plexuses and intramuscularly in rat duodenum.

The results of this study suggest that at least a subpopulation of *activated* ICCs could be initially the source of neural and ICC progenitor cells and its activation might coincide with the emission of a single cilium (9+0), acquiring a less differentiated morphology. We proposed that the single cilium could represent a characteristic of precursor cells in the enteric nervous system.

Acknowledgements. This research received financial support from Aragon Institute of Health Sciences (I+CS) (PIPAMER 0807) and the European Social Fund (ESF), DGA (B83).

References

- Alvarez-Buylla A. and Lim D.A. (2004). For the long run: Maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41, 683-686.
- Alvarez-Buylla A., García-Verdugo J.M. and Tramontin A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 287-293.
- Bondurand N., Natarajan D., Thapar N., Atkins C. and Pachnis V. (2003). Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130, 6387-6400.
- Cantarero I., Luesma M.J., Lavoie-Gagnon C. and Junquera C. (2010). Distribution of nestin protein: immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. *Microsc. Res. Tech.* Article online in advance of print. DOI 10.1002/jemt.20884.
- Christensen J. (1992). A commentary on the morphological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J. Auton. Nerv. Syst.* 37, 75-88.
- Cohen E. and Meiningner V. (1987). Ultrastructural analysis of primary cilium in the embryonic nervous tissue of mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.* 5, 43-51.
- Doetsch F. (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nature Neurosci.* 6, 1127-1134.
- Doetsch F., García-Verdugo J.M. and Alvarez-Buylla A. (1999). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11619-11624.
- Faussone-Pellegrini M.S. (2005). Interstitial cells of Cajal: once negligible players, now blazing protagonists. *Ital. J. Anat. Embriol.* 110, 11-31.
- Faussone-Pellegrini M.S., Vannucchi M., Leder O., Huang T.Y. and Hanani M. (2006). Plasticity of interstitial cells of Cajal: a study of mouse colon. *Cell Tissue Res.* 325, 211-217.
- Fu M., Lui V.C.H., Sham M.H., Pachnis V. and Tam P.K.H. (2004). Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J. Cell Biol.* 166, 673-684.
- Gershon M.D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 101-109.
- Gershon M.D., Kirchgessner A.L. and Wade P.R. (1994). Functional anatomy of the enteric nervous system. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. Johnson L.R. (ed). Raven Press. New York pp 381-422.
- Han Y.G., Spassky N., Romaguera-Ros M., García-Verdugo J.M., Aguilar A., Schneider-Maunoury S. and Alvarez-Buylla A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 11, 277-284.
- Horiguchi K. and Komuro T. (1998). Ultrastructural characterization of interstitial cells of Cajal in the rat small intestine using control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res.* 293, 277-84.
- Horiguchi K. and Komuro T. (2000). Ultrastructural observations of fibroblast-like cells forming gap junctions in the W/W(nu) mouse small intestine. *J. Auton. Nerv. Syst.* 80, 142-147.
- Ishikawa K., Komuro T., Hirota S. and Kitamura Y. (1997). Ultrastructural identification of the c-kit expressing interstitial cells in the rat stomach: a comparison of control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res.* 289, 137-43.
- Junquera C., Martínez-Ciriano C., Castiella T., Serrano P., Aisa J., Calvo E. and Lahoz M. (2001). Enteric plexus and interstitial cells of Cajal: Interrelationship in the stomach of *Podarcis hispanica* (reptilia). *Histol. Histopathol.* 16, 869-861.
- Junquera C., Martínez-Ciriano C., Castiella T., Serrano P., Azanza M.J. and Ramón y Cajal Junquera S. (2007). Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 776-787.
- Komuro T. (1982). The interstitial cells in the colon of the rabbit. *Cell Tissue Res.* 222, 41-52.
- Komuro T. (1998). Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc. Res. Tech.* 47, 267-285.
- 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.
- Lendahl U., Zimmerman L.B. and McKay R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Metzger M., Bareiss P.M., Danker T., Wagner S., Hennenlotter J., Guenther E., Obermayr F., Stenzl A., Koenigsrainer A., Skutella T. and Just L. (2009). Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology* 137, 2063-2073.
- Min K.B. and Leabu M. (2006). Interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST): facts, speculations and myths. *J. Cell Mol. Med.* 10, 995-1013.
- Mirzadeh Z., Merkle F.T., Soriano-Navarro M., García-Verdugo J.M. and Álvarez-Buylla A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 3, 265-278.
- Ramón y Cajal S. (1893). Los ganglios y plexos nerviosos del intestino de los mamíferos y pequeñas adiciones a nuestros trabajos sobre la médula y gran simpático general. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, Madrid.

Primary cilium in interstitial cells

- Rauch U., Hansgen A., Hagl C., Holland-Cunz S. and Schafer K.H. (2006). Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int. J. Colorectal Dis.* 21, 554-559.
- Rieder C.L., Jensen C.G. and Jensen L.C. (1979). The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J. Ultrastruct. Res.* 68, 173-185.
- Sahlgren C.M., Mikhailov A., Hellman J., Chou Y.H., Lendahl U., Goldman R.D. and Eriksson J.E. (2001). Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 16456-16463.
- Seeley E.S. and Nachury M.V. (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. *J. Cell Sci.* 123, 511-518.
- Silva A.T., Wardhaugh T., Dolatshad N.F., Jones S. and Saffrey M.J. (2008). Neural progenitors from isolated postnatal rat myenteric ganglia: Expansion as neurospheres and differentiation *in vitro*. *Brain Res.* 47-53.
- Sohal G.S., Ali M.M. and Farooqui F.A. (2002). A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int. J. Dev. Neurosci.* 20, 619-626.
- Spassky N., Han Y.G., Aguilar A., Strehl L., Besse L., Laclef C., Romaguera-Ros M., Garcia-Verdugo J.M. and Alvarez-Builla A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependant expansion of progenitor pool. *Dev. Biol.* 317, 246-259.
- Suarez-Rodriguez R. and Belkind-Gershon J. (2004). Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiates *ex vivo* into neurons, glia, and smooth muscle. *Stem Cells* 22, 1373-1385.
- Tavazoie M., Van der Veken L., Silva-Vargas V., Louissaint M., Colonna N., Zaidi B., Garcia-Verdugo J.M. and Doetsch F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.
- Vanderwinden J.M., Gillard K., DeLaet M.H., Messam C.A. and Schiffmann S.N. (2002). Distribution of the intermediate filament nestin in the mucularis propria of the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 309, 261-268.

Accepted October 29, 2010

Distribution of Nestin Protein: Immunohistochemical Study in Enteric Plexus of Rat Duodenum

I. CANTARERO CARMONA,^{1,2*} M.J. LUESMA BARTOLOMÉ,^{1,2} C. LAVOIE-GAGNON,³
AND C. JUNQUERA ESCRIBANO^{1,2}

¹Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

²Aragon Health Sciences Institute (I+CS), Zaragoza, Spain

³Faculty of Medicine, Laval University, Quebec, Canada

KEY WORDS nestin; enteric glial cell; rat; enteric nervous system; glial fibrillary acidic protein

ABSTRACT The intermediate nestin filament is expressed in neural stem cells, neuroectodermal tumors and various adult tissues under situations that reproduce developmental phases, e.g., physiological renewal of certain cell types, tissue regeneration, and healing or revascularization. In the human gastrointestinal tract, nestin has been reported in glial cells and interstitial cells of Cajal. We examined by immunohistochemistry the appearance and distribution of nestin protein in enteric ganglia of rat duodenum. Through the myenteric and submucosal plexuses, a high number of nestin-positive cells were visualized in this specie. The nestin-positive cells were smaller and more numerous than enteric neurons. They were present both within and around ganglia. The results of this study suggest that the rat enteric glial cells (EGCs) are rich in nestin, a protein usually associated with dividing or migrating cells and the dynamic reorganization of nestin filaments during the cell cycle. EGCs could function as enteric stem cells. *Microsc. Res. Tech.* 74:148–152, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Nestin is a member of the family of intermediate filaments and is expressed in progenitor cells of the central nervous system (CNS) (Lendahl et al., 1990; Sejersen and Lendahl, 1993).

During embryogenesis, nestin is important for distribution and organization of critical cellular factors regulating proliferation, survival, and differentiation of neural stem cells; whereas in adult tissues, nestin is mainly restricted to areas of regeneration (Wiese et al., 2004).

Nestin expression is upregulated in adults under pathological conditions (Frisén et al., 1995), during regeneration of injured muscle tissue (Vaittinen et al., 1999) and in neuroepithelial tumors (Dahlstrand et al., 1992; Tohyama et al., 1992). Although it remains unclear which factors regulate nestin expression in vitro and in vivo, this represents a characteristic marker of multilineage progenitor cells and suggests that its presence in cells may indicate multipotentiality and regenerative potential (Wiese et al., 2004).

Very little is known about functions of nestin in enteric nervous system (ENS). In the human gastrointestinal tract (GI) tract, nestin has been reported in glial cells, interstitial cells of Cajal (ICC) and gastrointestinal stromal tumors, thought to derive from ICC (Vanderwinden et al., 2002). However, there are no previous immunohistochemical evidence about the existence of nestin-positive cell in myenteric and submucosal ganglia in the rat GI.

The aim of this study was to examine the localization of nestin in enteric ganglia of rat duodenum. This fact may suggest a possible neurogenic zone in the intestine.

MATERIALS AND METHODS

Animal Use

Six adult Wistar rats, 3 months old (Jackson Laboratories) were used in accordance with institutional guidelines (Ethics Advisory Commission for Animal Experimentation, PI 22/08). Each animal had ad libitum access to food and water and was fed on a complete and balanced standard laboratory diet (Teklad 4% rat diet 7001; Harlan Teklad, Madison, WI). They were housed in temperature controlled rooms (20 ± 1°C) and natural light. All rats were anesthetized, euthanized, and perfused intracardially with formal saline solution at 10% pH 7.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on serial paraffin sections 5-µm thick using the immunohistochemistry EnVision[®] (Dako) method. The primary antibody used in this study was: monoclonal mouse antinestin IgG (clone Rat-401, 1:400, Chemicon, Temecula, CA). Antibodies were diluted with Dako diluent (S2022). The tissue sections were deparaffinized in xylene (10 min twice) and rehydrated in a graded ethanol series up to distilled water. Before all assays, for heat-induced antigen retrieval, the samples were treated during 6 min in an 800-W microwave oven with 10% citrate buffer

*Correspondence to: Irene Cantarero Carmona, Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Domingo Miral, s/n. 50009 Zaragoza, España, Spain. E-mail: irene-cantarero@hotmail.com

Contract grant sponsor: Aragon Institute of Health Sciences (I+CS); Contract grant number: PIPAMER 0807; Contract grant sponsors: European Social Fund (ESF), DGA (B83)

Received 1 February 2010; accepted in revised form 24 April 2010

DOI 10.1002/jemt.20884

Published online 26 May 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

(Dako S2031) in distilled water and at 360 W for 5 additional minutes. After washing twice with PBS, 3 min, the sections were treated with endogenous peroxidase blocking (Dako S2001) for 20 min, washed in distilled water and PBS 3 min, twice. The blocking was repeated for a second time. The sections were incubated with the primary antibody solution for 30 min followed by a rinse in blocking buffer [100 mL PBS, 2 mL triton $\times 100$, 0.25 mL BSA (A4503 SIGMA)], for 3 min, twice. The visualization was made by incubating with EnVision[®] peroxidase-based visualization kit (Dako K5007) during 30 min, washed twice in PBS, for 3 min according to manufacturer's directions. To confirm the presence of immunocomplexes, 3,3'-diaminobenzidine was used as chromogene and hydrogen peroxide as substrate. The samples were washed twice in distilled water, contrasted with Mayer's hematoxylin for 7 min, washed in tap water for 15 min, dehydrated in a graded series of ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with DPX. Digital microscope images were captured by means of an Olympus BX 51 microscope.

Immunofluorescence

The expression and distribution of proteins were studied by indirect immunofluorescence staining method for: monoclonal mouse antinestin IgG (clone Rat-401, dilution 1:400, Chemicon, Temecula, CA); glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP, dilution 1:100, polyclonal rabbit-anti-mouse Z0334 Dako); goat anti-mouse IgG (HL) Alexa Fluor 488 (dilution 1:1000; Molecular Probes Invitrogen); goat anti-rabbit IgG (H + L) Alexa Fluor 546 (dilution 1:1000; Molecular Probes Invitrogen). The antibodies were diluted with Dako (S2022) diluent. Tissue sections were deparaffined in xylene (10 min twice) and rehydrated in a graded ethanol series up to distilled water. Before all assays, for heat-induced antigen retrieval, the samples were treated during 6 min in an 800 W microwave oven with 10% citrate buffer (Dako S2031) in distilled water and at 360 W for 5 additional minutes. After washing twice with PBS, 3 min, sections were treated with endogenous peroxidase blocking (Dako S2001) for 20 min, washed in distilled water and PBS 3 min twice. The blocking was repeated for a second time. Sections were incubated with the primary antibody solution for 20 h followed by a rinse in blocking buffer [100 mL PBS, 2 mL triton $\times 100$, 0.25 mL BSA (A4503 SIGMA)], for 3 min twice. The visualization was made with Alexa Fluors for 90 min, washing in PBS three times for 10 min and incubated with 5 μ L of DRAQ5 (Biostatus, Leicesterchire, UK) to counterstain the nuclei. Cover slips were then mounted in Mowiol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) and cell staining was documented using Leica TCS SL Laser Scanning Confocal Microscope.

RESULTS

Enteric ganglia neurons are surrounded by a vast neuropil in which axons, dendrites, and glial cells, with their processes, are tightly packed together. Blood vessels and connective tissue do not penetrate into ganglia but lie outside them.

We observed a strong immunostaining of nestin-positive cells. Nestin-ir labeled numerous cells within myenteric (Fig. 1A) and submucosal (Fig. 1B) ganglia, but also cells scattered between the two muscle layers

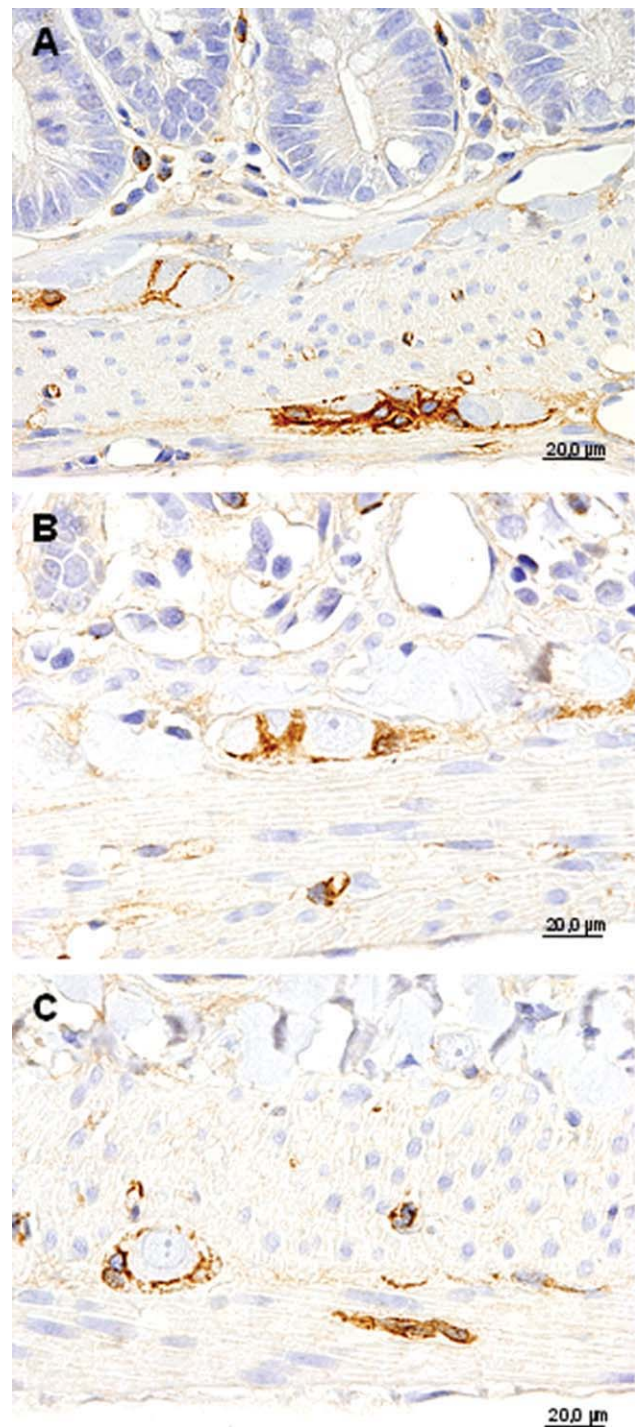


Fig. 1. Immunohistochemistry, EnVision[®] method. Nestin-positive cells are found within myenteric (A) and submucosal ganglia (B) of rat duodenum. Nestin-positive cells are also seen within circular and longitudinal muscle layers (C). Longitudinal section (A, C) and cross-section (B). Scale bar = 20 μ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and intramuscularly (Fig. 1C). In addition, there were fewer nestin-positive cells in the submucosal plexus than in the myenteric plexus (Fig. 1A). None of the neurons was immunoreactive for nestin.

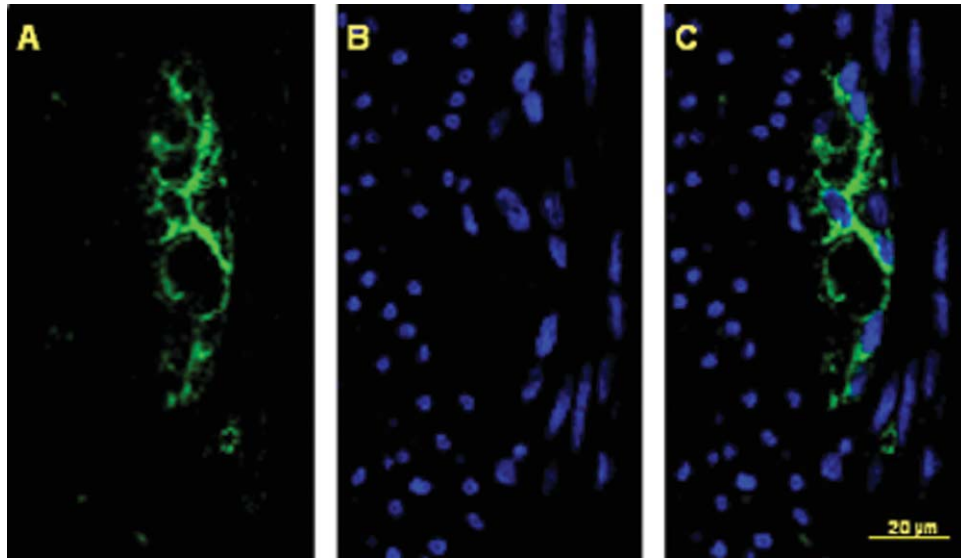


Fig. 2. Nestin-positive cells at the level of the myenteric plexus subjected to confocal microscopy analyses. Nestin-ir (green, **A**), nuclear staining (blue, **B**), and merged image (**C**). The scale bar is 20 μm in length and applies to all images. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

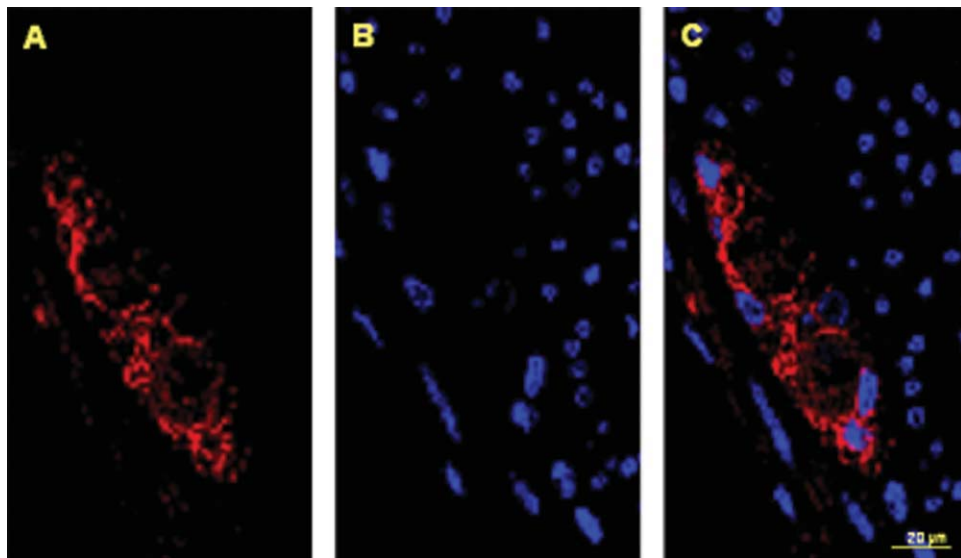


Fig. 3. Confocal imaging of GFAP stained enteric glial cells from rat duodenum. GFAP-ir (red, **A**), nuclear staining (blue, **B**), and merged image (**C**). The scale bar is 20 μm in length and applies to all images. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

We did not find nestin-positive cells associated with the deep muscular plexus. On the other hand, our results show nestin-positive cells located below the mucosal crypts with small fusiform or triangular-shaped cell bodies (Fig. 1A).

The pattern of nestin expression observed with the optical and confocal microscopy was similar (Figs. 2A–2C). In parallel, we performed immunofluorescence staining for glial fibrillary acidic protein. Again, GFAP-ir labeled cells appeared within myenteric and submucosal ganglia around neurons (Figs. 3A–3C). We also used a double immunofluorescence technique to assess coexpression of nestin and GFAP by the same cells

(Figs. 4A–4C). In the rat duodenum, some, but not all, of nestin-positive cells also exhibited GFAP-ir (Figs. 5A–5C).

DISCUSSION

There are no previous immunohistochemical evidences about the existence of nestin-positive cells in rat myenteric and submucosal ganglia. In contrast with the human CNS, where nestin is transiently expressed during fetal development, very few structures retain nestin expression in the mature CNS (Lendahl et al., 1990; Mujtaba et al., 1998; Sejersen and Lendahl, 1993).

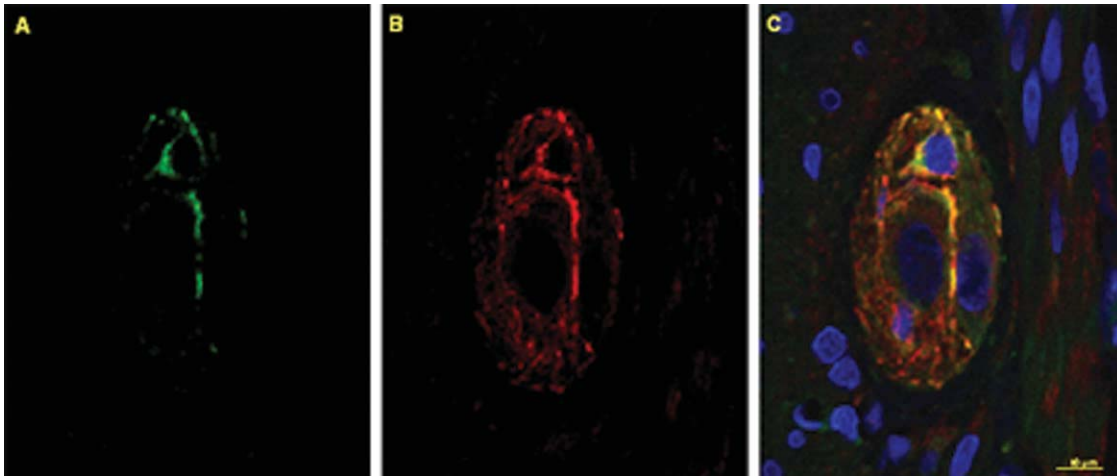


Fig. 4. Confocal microscopy analyses. At level of the myenteric plexus, nestin-ir (green, **A**) is abundantly present in GFAP-ir glial cells (red, **B**) and merged image (yellow, **C**). Nuclear staining (blue). The scale bar is 10 μm in length and applies to all images. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

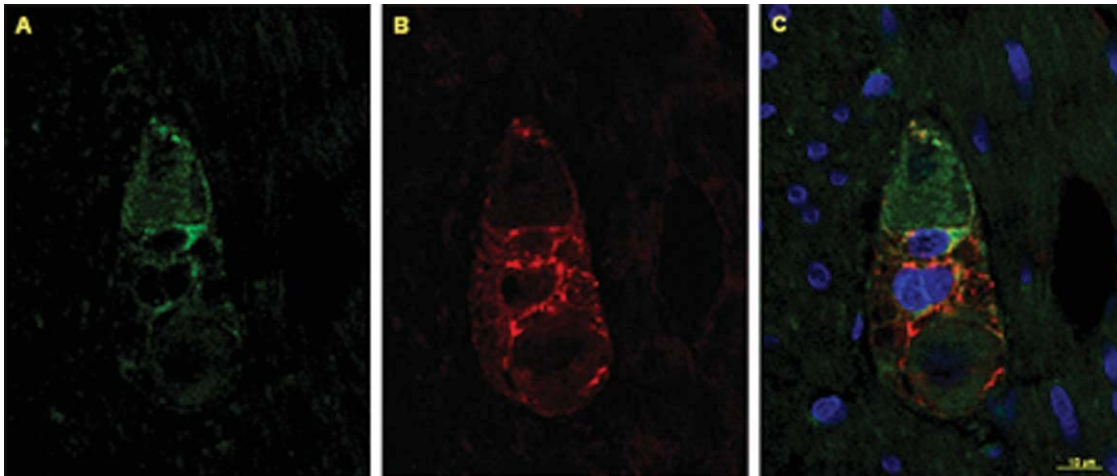


Fig. 5. Laser confocal images of rat duodenum. Pattern of nestin-ir (green, **A**) and GFAP-ir (red, **B**) in the myenteric plexus. Some GFAP-ir cells do not express nestin-ir (**C**). Nuclear staining (blue). The scale bar is 10 μm in length and applies to all images. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

While nestin is regarded as a marker for progenitor cells in the CNS and for various types of tumors (Flørenes et al., 1994; Kobayashi et al., 1998; Tohyama et al., 1992), very little is actually known about its function. Nestin expression is usually associated with dividing or migrating cells and the dynamic reorganization of nestin filament during the cell cycle involves phosphorylation by the cdc2 kinase (Sahlgren et al., 2001). Antibodies used in this study did not discriminate the phosphorylated and nonphosphorylated forms of nestin.

The presence of nestin immunoreactivity along the rat duodenum is in agreement with a report on the pattern of nestin-ir distribution observed in the human intestine (Vanderwinden et al., 2002). The pattern of nestin expression in the rat duodenum appeared to be complex and only a detailed analysis of high-resolution images and double immunohistochemical staining, as

performed in this study, provided a proper assessment of cell type expressing nestin-ir in this localization.

Enteric glial cells (EGCs) are rich in gliofilament and have processes that are firmly anchored to the surface of the ganglion. Glial cells outnumber ganglion neurons and probably confer structural stability to ganglia (Gabella, 1982). It is well known that the EGCs are positive for GFAP. Komuro et al. (1982) revealed in the myenteric plexus of the rabbit colon three types of non-neuronal (glial) cells according to ultrastructural characteristics: type 1, which was the most common, contained many 10 nm "gliofilaments" and resembled EGCs or astrocytes from the CNS; type 2, composing about 5% of glial cells, had few filaments; type 3 was seen only rarely, had a small dark nucleus, little cytoplasm, may have been from an extraganglionic origin and resembled microglia of the CNS.

Accumulating data suggests that EGCs represent the morphological and functional equivalent of CNS

astrocytes within the ENS (Gulbransen and Sharkey, 2009). Previous studies have demonstrated the existence of neural stem cells in the subventricular zone (SVZ) of the adult rodent brain and have characterized cellular types implicated in the neurogenesis. Also, other studies have concluded that SVZ astrocytes (type B cells) act as neural stem cells in both the normal and regenerating brain (Doetsch et al., 1997).

We have demonstrated the presence of three cellular subpopulations according to staining pattern for nestin and GFAP. Cells positive to both GFAP and nestin (subpopulation I), cells positive to nestin and were negative to GFAP (subpopulation II), and cells positive to GFAP and negative to nestin (subpopulation III). Given the huge similarities between the ENS and the CNS, this observation can suggest that cellular subpopulations I, II, and III could be comparable with “B cells,” “C cells,” and astrocytes, respectively, previously described in the adult mammalian SVZ. Type B and C cells were nestin-positive (Doetsch et al., 1997). Type C cells, which may correspond to putative precursors, were negative to GFAP. Type C cells were larger and more spherical (less elongated) than Type B cells (Doetsch et al., 1997). Type B cells, astrocyte precursors, were darkly stained with anti-GFAP antibodies. Type B cells had irregular contours that profusely filled spaces between neighboring cells (Doetsch et al., 1997).

Even though we do not reject the possibility that the pattern of staining observed could be due to distinct functional states of the same cell and that at least a subpopulation of these cells may serve as neuronal progenitors. In conclusion, the use of nestin and GFAP antibodies has permitted us to characterize three subpopulations of EGCs in the duodenum of adult rats, which might have important implications in the understanding of the process of neurogenesis in the adult enteric plexus.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Microscopy and Image Services of the Aragon Institute of Health Sciences and the reliable technique assistance of M. Royo Cañas and M. Carreras Fernandez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. 1992. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 52:5334–5341.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17:5046–5061.
- Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O. 1994. Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res* 54:354–356.
- Frisén J, Johansson CB, Török C, Risling M, Lendahl U. 1995. Rapid, widespread, and long-lasting induction of nestin contributes to the generation of glial scar tissue after CNS injury. *J Cell Biol* 131:453–464.
- Gabella G. 1982. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. *Scand J Gastroenterol Suppl* 71:15–25.
- Gulbransen BD, Sharkey KA. 2009. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 136:1349–1358.
- Kobayashi M, Sjöberg G, Söderhäll S, Lendahl U, Sandstedt B, Sejersen T. 1998. Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin. *Pediatr Res* 43:386–392.
- Komuro T, Baluk P, Burnstock G. 1982. An ultrastructural study of neurons and non-neuronal cells in the myenteric plexus of the rabbit colon. *Neuroscience* 7:1797–1806.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585–595.
- Mujtaba T, Mayer-Proschel M, Rao MS. 1998. A common neural progenitor for the CNS and PNS. *Dev Biol* 200:1–15.
- Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, Eriksson JE. 2001. Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem* 276:16456–16463.
- Sejersen T, Lendahl U. 1993. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106(Pt 4):1291–300.
- Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ. 1992. Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest* 66:303–313.
- Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, Rantanen J, Hurme T, Lendahl U, Eriksson JE, Kalimo H. 1999. Specific and innervation-regulated expression of the intermediate filament protein nestin at neuromuscular and myotendinous junctions in skeletal muscle. *Am J Pathol* 154:591–600.
- Vanderwinden JM, Gillard K, de Laet MH, Messam CA, Schiffmann SN. 2002. Distribution of the intermediate filament nestin in the muscularis propria of the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 309:261–268.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. 2004. Nestin expression—A property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61:2510–2522.

Discusión

Artículos I y II: Los telocitos.

La presencia y nomenclatura de las ICC ha sido motivo de controversia durante muchos años, no solo en el tracto gastrointestinal sino también fuera de él. El origen de tal polémica viene justificado: primero, porque a veces resulta difícil reconocer ultraestructuralmente a tales células, incluso a pesar de estar preestablecidos los criterios para su identificación; y segundo, la presencia de otros tipos celulares con características ultraestructurales muy similares o intermedias con las ICC. Por ejemplo, en la literatura existe una gran cantidad de publicaciones sobre fibroblastos, fibroblastos-like, miofibroblastos... que en nuestra opinión, muchas veces se trata de ICC y viceversa.

Recientemente, LM. Popescu, autor de diversas publicaciones sobre las ICC y las ICC-like, establece una nueva entidad celular denominada Telocitos [Popescu et al., 2010]. En su primer artículo textualmente dice: “Obviamente, las células que nosotros llamamos ICC-like son diferentes de las ICC. Por tanto, parece razonable asignarle un nombre diferente para referirse a ellas. De la misma manera que las neuronas intersticiales pasaron a llamarse células intersticiales de Cajal, nosotros pensamos que las ICC-like deberían llamarse Telocitos”.

En lo que respecta a este tema, nuestras observaciones nos llevan a pensar que no se trata de una nueva entidad celular sino que podrían ser considerados un *subtipo de ICC*. Efectivamente, poseen unas

características ultraestructurales propias y definitorias que le hacen diferenciarse de las clásicamente descritas, fundamentalmente, la presencia de largas y sinuosas prolongaciones (definidas por Popescu como telopodios). Es por ello, que la delgadez de estas prolongaciones posiblemente impedía su identificación al microscopio óptico, pero aun así, Cajal definió perfectamente su localización en la mucosa intestinal, distinguiendo incluso con claridad su morfología. Por tanto, aunque nosotros hemos aceptado su denominación como telocitos, pensamos que su descubridor en el intestino fue D. Santiago Ramón y Cajal, pero en todo caso, se trata de células intersticiales. Nos planteamos incluso si no podrían ser *estados intermediarios de la misma célula*. Las ICC pueden presentar una morfología, unos orgánulos o una cromatina característica en un momento determinado de su ciclo celular. Es necesario analizar las células desde un punto de vista dinámico: que recibe señales del medio, que responde a ellas y que se comporta de una manera u otra dependiendo del ambiente que le rodea.

Para apoyar nuestra hipótesis, hay que destacar que los telocitos son positivos al c-Kit, un receptor ampliamente aceptado como marcador de células intersticiales, y que por el momento, no se ha descubierto ningún marcador específico de esta supuesta nueva entidad celular. En la mayoría de los artículos donde se menciona la positividad hacia algún anticuerpo utilizan frases especulativas:

“células con características de telocitos, bajo determinadas circunstancias, son positivas al c-Kit, al CD34 y a la vimentina [Fausson-Pellegrini y Bani, 2010; Bani et al., 2010]”.

O bien,

“la figura 4A muestra telocitos positivos a la S-100. El inmunomarcaje para la proteína Tau fue similar al de la S-100 (Fig. 3D). El anticuerpo CD57 (NK1) fue positivo para los telocitos... Sin embargo, la inmunohistoquímica por sí sola no es suficiente para un diagnóstico positivo de telocitos [Popescu et al., 2010]”.

Además, la MET, aunque proporciona información muy valiosa, revela a la célula en un momento determinado, y en nuestra opinión, no es suficiente como herramienta única para demostrar una nueva entidad celular.

Si en la zona subventricular se han aceptado varios tipos de astrocitos, incluso con funcionalidad distinta, y en la zona subgranular, estadios intermedios de la misma célula, ¿por qué no podrían existir estadios intermediarios de las ICC? o ¿por qué no pueden existir subtipos de ICC con características ultraestructurales específicas?.

Artículos II y III: El cilio único.

El cilio primario o cilio único, aunque es localizado en la mayoría de las células de los vertebrados que han sido profundamente estudiadas, a excepción de las células de origen mieloide y linfoide [Wheatley, 1995], en la literatura no se encuentran evidencias ultraestructurales de tal existencia.

La función de esta estructura en los vertebrados ha sido sujeta de muchas especulaciones, y hoy en día, está escasamente comprendida. Desde su descubrimiento en células de mamífero [Zimmerman, 1898] se han considerado tres hipótesis:

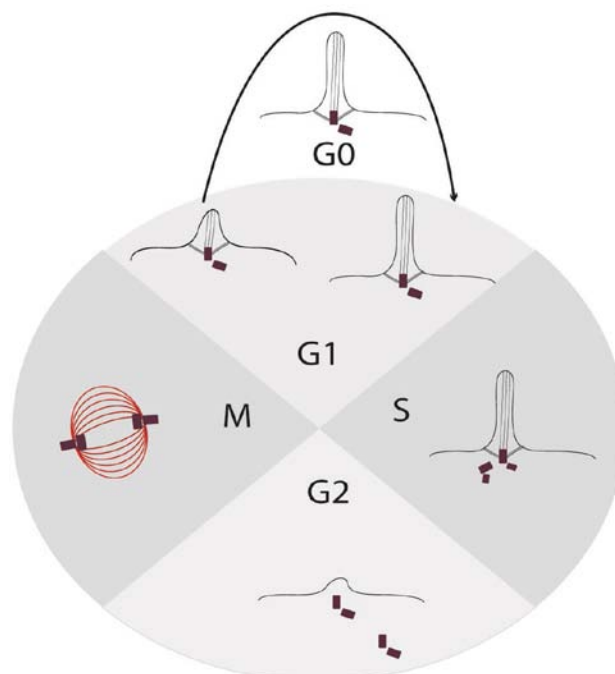
1. Orgánulo vestigial.
2. Implicación en el ciclo celular.
3. Antena sensorial.

Hasta 1990, el cilio único, denominado así por primera vez por Sorokin en 1962, se consideró un apéndice vestigial, heredado de un ancestro cuyas células tenían un cilio móvil. Estudios posteriores indicaron una presencia generalizada y una ultraestructura conservada en células endoteliales de la córnea, sugiriendo entonces que estos orgánulos podrían tener una función importante en las células.

El ensamblaje del cilio primario está también estrechamente ligado y coordinado con el ciclo celular. El axonema ciliar está anclado a la

superficie proximal celular por el cuerpo basal. El cuerpo basal se deriva del llamado centriolo “madre” en una fase específica del ciclo celular, requiriendo su liberación desde los cilios y su utilización posterior como centro organizador de microtúbulos (MTOC) durante la mitosis. En los vertebrados, esta oscilación entre el cuerpo basal y el MTOC está típicamente acompañado de la extensión del cilio en células postmitóticas (fase G0 o G1) y la reabsorción posterior antes de la entrada en mitosis [Archer y Wheatley, 1971; Tucker et al., 1979; Rieder et al., 1979; Quarmby, 2004]. El punto exacto de la reabsorción ciliar durante el ciclo celular depende del tipo celular; algunas células reabsorben los cilios en la fase S, y más típicamente, en la transición G2/M (Figura 28) [Jensen et al., 1987; Rieder et al., 1979].

Figura 28. El cilio primario y el ciclo celular. En la mayoría de las células, la formación de cilio primario ocurre por primera vez después de la citocinesis, durante la fase G1. En la fase S, los centriolos inician la replicación del ADN. El desensamblaje ciliar se produce en la transición G2/M. Plotnikova et al., 2009.



A día de hoy, la función principal y más reconocida es su papel como antena sensorial. Esta hipótesis es sugerida puesto que los cilios son usados como órganos sensoriales en los eucariotas inferiores, y las estructuras del sistema olfativo y visual de los vertebrados son cilios modificados [Pazour y Witman, 2003]. En general, se considera que el cilio primario actúa como una unidad foto-, mecano- y osmo-sensora que transfiere información del ambiente extracelular al interior celular [Veland et al., 2009].

Por otro lado, recientes trabajos demuestran que el cilio primario concentra varios receptores tipo somatostatina [Handel et al., 1999], serotonina [Brailov et al., 2000] o dopamina [Iwanaga et al., 2011]; y componentes de ciertas vías de señalización vitales para el desarrollo, entre otras Sonic hedgehog (Shh) [Han et al., 2008], Wnt [Corbit et al., 2008] y Polaridad Celular Plana o PCP [Jones et al., 2008] (Figura 29). De tal manera que, defectos en los cilios primarios se han asociado por ejemplo con el síndrome de Alstrom, Bardet-Biedl, Joubert, Meckel-Gruber y Oro-facial digital tipo 1 [Badano et al., 2006].

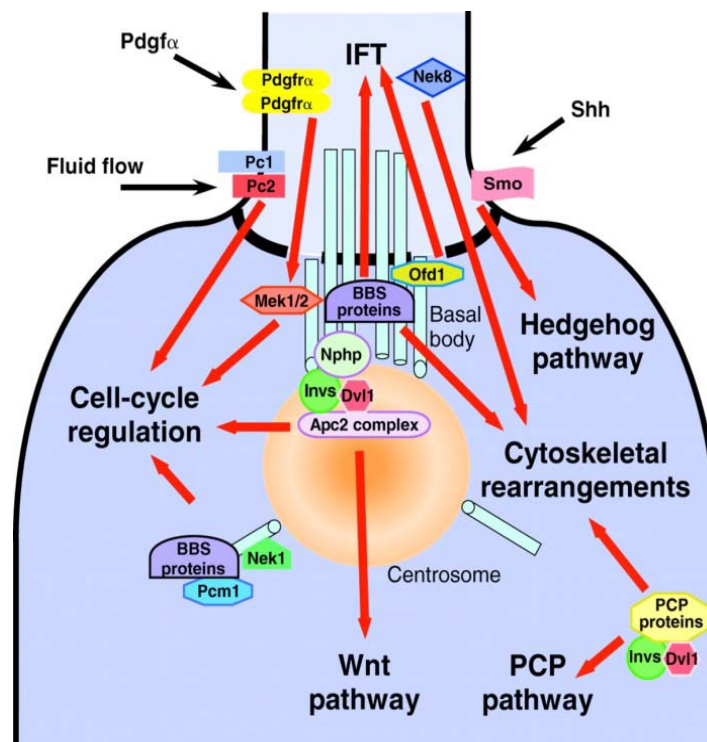


Figura 29. Función de los cilios primarios. Los cilios primarios actúan como un órgano sensorial que transfiere información desde el medio extracelular al interior celular. Las señales de los cilios primarios, en última instancia, están implicados en la regulación de procesos celulares esenciales, incluyendo el ciclo celular, la organización del citoesqueleto, el transporte intraflagelar y las vías de señalización Shh, Wnt o PCP. *Bisgrove y Yost, 2006.*

Por tanto, si las células progenitoras neurales en el cerebro embrionario y adulto tienen un cilio primario [Alvarez-Builla et al., 2001], que es necesario para el correcto desarrollo y función del cerebro [Han et al., 2008], y además, es determinante en las vías de diferenciación y proliferación celular, no solo en estadios tempranos del desarrollo, sino también en la neurogénesis adulta del SNC [Veland et al., 2009]; todas estas consideraciones podrían darnos una orientación sobre el posible papel de las células ciliadas en el SNE, así como proporcionarnos la clave para poder identificar a las posibles progenitoras neurales entéricas.

Artículo IV: La Nestina.

La nestina es un marcador de células progenitoras neurales tanto del SNC como de células de la cresta neural de migración temprana y post-migratoria [Lo y Anderson, 1995] (Figura 30). Fue identificada por primera vez en células mitóticamente activas del SNC y del SNP, capaces de generar tanto neuronas como glía durante la embriogénesis temprana [Hockfield y McKay, 1985]. Posteriormente, se ha asociado con células progenitoras de tejidos no neurales como el corazón [Kachinsky et al., 1995], el páncreas [Delacour et al., 2004] o el intestino [Rauch et al., 2006b].

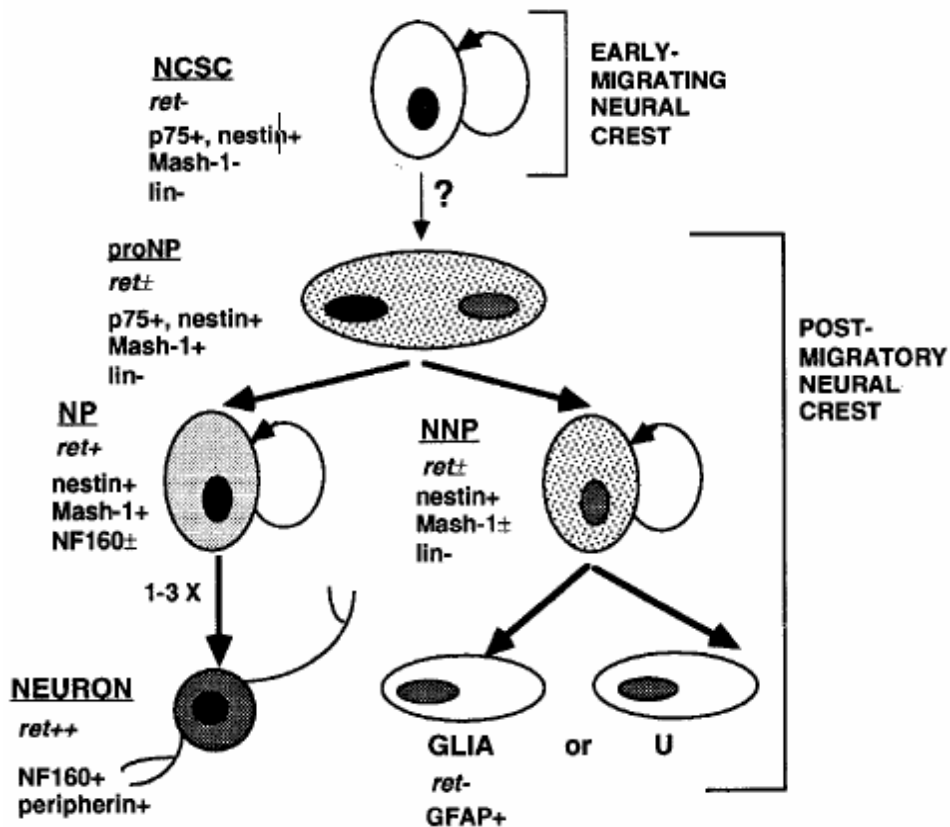


Figura 30. Modelo que representa la supuesta relación lineal de las células progenitoras del SNE. El fenotipo antigénico de cada tipo de célula progenitora es

indicado. U: células no neuronales no identificadas, NCSC: células madre de la cresta neural, proNP: progenitor proneuronal, NP: progenitor neuronal, NNP: progenitor no neuronal. *Lo y Anderson, 1995.*

La expresión de nestina disminuye cuando la célula comienza a diferenciarse hacia un linaje neuronal o glial [Young et al., 2003; Shi et al., 2008]. Si bien, se ha descrito que algunas células maduras son capaces de mantener la expresión de nestina, entre otros, los astrocitos [Rosser et al., 1997], las células adrenocorticales [Bertelli et al., 2002], las ICC del plexo mientérico [Vanderwinden et al., 2002], las neuronas del plexo submucoso [Azan et al., 2011] o como nosotros hemos demostrado, algunas células gliales de ambos plexos [Cantarero Carmona et al., 2011a].

Las células progenitoras neurales persisten también en el SNE de roedores adultos jóvenes (postnatal 5-15) [Kruger et al., 2002]. En experimentos de cultivos celulares con ratones embrionarios, las células progenitoras entéricas en división forman neuroesferas, las cuales pueden mantenerse durante varios meses, y cuando se les proporciona las condiciones óptimas, se diferencian a neuronas o glía [Schäfer et al., 2009] De igual manera, en estadios postnatales y en el adulto propiamente dicho, se han utilizado cultivos de muestras intestinales, procedentes de humano y roedores, para obtener células progenitoras clonales y multipotenciales, las cuales expresan nestina y se diferencian hacia neuronas, células gliales y músculo liso [Suárez-Rodríguez y Belkind-Gerson, 2004; Rauch et al., 2006a; Silva et al., 2008; Metzger et al., 2009a; 2009b].

Por otro lado, células con un fenotipo que no es ni neuronal ni glial están presentes en los ganglios entéricos de ratones postnatales (entre 5% y 10%). Se cree que podrían representar células madre indiferenciadas [Young et al., 2003]. Similares células, es decir, negativas para marcadores neuronales y gliales, se han encontrado en el hipocampo humano adulto, asumiéndose que podrían ser precursores en reposo de células progenitoras [Eriksson et al., 1998]. Por otro lado, se han observado células negativas para la nestina en cultivos de neuroesferas de cerebro de ratón adulto; dichas células se vuelven positivas después de un periodo de maduración y son capaces de generar de nuevo neuronas y células gliales. Tal patrón de expresión se explica en base a que estas células representan un tipo de células progenitoras tempranas ontogénicamente [Kukekov et al., 1997].

De tal manera que células progenitoras entéricas, aun sin identificar, podrían ser capaces de realizar el mantenimiento y la reparación de células maduras que se han perdido o dañado por el recambio fisiológico o una lesión. El hecho de existir una regeneración en el plexo mientérico de ratón después de la destrucción de determinados segmentos [Hanani et al., 2003], plantea la posibilidad que células madre neurales humanas tengan un potencial similar para generar un reemplazamiento de neuronas y células gliales [Kruger et al., 2002; Schäfer et al., 2009; Metzger, 2010]. En nuestra opinión, tal población celular podría ser aquella positiva a la nestina, al igual en el SNC. De hecho, dos poblaciones celulares, bien las ICC o las células gliales, podrían

ser candidatas a ello. No obstante, la presencia del cilio único en las ICC hace que tomen cierta ventaja sobre las anteriores. Un mayor conocimiento de la biología e identidad de estas supuestas células madre podría revelar su potencial terapéutico.

Conclusiones

Como resultado de nuestra investigación hemos obtenido las siguientes conclusiones:

1. Un subtipo de células intersticiales de Cajal se localiza en la lámina propia del duodeno de rata Wistar.
2. Dichas células intersticiales de Cajal, en base a las características ultraestructurales, particularmente larguísimas y finas prolongaciones (<0,2 micras) con ensanchamientos varicosos, se han denominado como Telocitos.
3. Las células intersticiales de Cajal son encontradas en las proximidades de troncos nerviosos y en relación con los vasos sanguíneos formando auténticas redes celulares.
4. Las células intersticiales de Cajal establecen uniones de tipo gap con los distintos tipos celulares que les rodean: linfocitos, eosinófilos y células endocrinas.
5. La liberación de exosomas es una característica particular de estas células.
6. Algunas células intersticiales de Cajal asociadas a los vasos sanguíneos de la submucosa en el duodeno de rata Wistar presentan un cilio único de estructura 9+0.

7. En relación con el plexo mientérico del duodeno de rata Wistar, se definen tres tipos de células intersticiales:
 - Células tipo I. Se corresponden con las clásicas células intersticiales de Cajal.
 - Células tipo II. Presentan características de células inmaduras y particularmente un cilio único de naturaleza sensorial.
 - Células tipo III. Se corresponden con los fibroblastos-like.

8. El cilio único podría representar una característica de las células precursoras en el SNE.

9. La nestina se expresa en los plexos entéricos del duodeno de rata Wistar: alrededor de los ganglios, en una subpoblación de células gliales y en la base de las criptas intestinales.

10. En los plexos entéricos del duodeno de rata Wistar, existen tres subtipos de células gliales en base a la expresión de nestina y GFAP: subtipo 1 (nestina y GFAP positivas), subtipo 2 (nestina positiva/GFAP negativa) y subtipo 3 (GFAP positiva/nestina negativa).

Referencias

1. Ali HA, McLelland J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Anat Histol Embryol.* 1979; 8(3):277-83.
2. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965; 124:319-35.
3. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 1966; 126(3):337-89.
4. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969; 137(4):433-57.
5. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(4):287-93.
6. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 2002; 22:629-34.
7. Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull.* 2002; 57(6):751-8.

8. Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res.* 2004; 1017(1-2):21-31.
9. Anderson RB, Newgreen DF, Young HM. Neural crest and the development of the enteric nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 2006a; 589:181-196.
10. Anderson RB, Stewart AL, Young HM. Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res.* 2006b; 323:11-25.
11. Archer FL, Wheatley DN. Cilia in cell-cultured fibroblasts. II. Incidence in mitotic and post-mitotic BHK 21-C13 fibroblasts. *J Anat.* 1971; 109(Pt 2):277-92.
12. Azan G, Low WC, Wendelschafer-Crabb G, Ikramuddin S, Kennedy WR. Evidence for neural progenitor cells in the human adult enteric nervous system. *Cell Tissue Res.* 2011; 344(2):217-25.
13. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006; 7:125-48.
14. Bani D, Formigli L, Gherghiceanu M, Fausone-Pellegrini MS. Telocytes as supporting cells for myocardial tissue organization in developing and adult heart. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(10):2531-8.

15. Beckett EA, McGeough CA, Sanders KM, Ward SM. Pacing of interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum: neutrally mediated and direct stimulation. *J Physiol.* 2003; 553(Pt 2):545-559.
16. Beckett EA, Ro S, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract. *Dev Dyn.* 2007; 236(1):60-72.
17. Berkley HJ. On complex nerve terminations and ganglion cells in the muscular tissue of the heart ventricle. *Anat Anz.* 1893; 9:34-42.
18. Bertelli E, Regoli M, Lucattelli M, Bastianini A, Fonzi L. Nestin expression in rat adrenal gland. *Histochem Cell Biol.* 2002; 117:371-377.
19. Besmer P, Murphy JE, George PC, Qiu FH, Bergold PJ, Lederman L, Snyder HW Jr, Brodeur D, Zuckerman EE, Hardy WD. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature.* 1986; 320(6061):415-21.
20. Bisgrove BW, Yost HJ. The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development.* 2006; 133(21):4131-43.
21. Bobryshev YV. Subset of cells immunopositive for neurokinin-1 receptor identified as arterial interstitial cells of Cajal in human large arteries. *Cell Tissue Res.* 2005; 321(1):45-55.

22. Boddy G, Daniel EE. Role of I-Ca(2+) channels in intestinal pacing in wild-type and W/W(V) mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288(3):G439-46.
23. Brailov I, Bancila M, Brisorgueil MJ, Miquel MC, Hamon M, Vergé D. Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* 2000; 872(1-2):271-5.
24. Brookes SJ. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec.* 2001; 262:58-70.
25. Burns AJ, Douarin NM. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development.* 1998; 125:4335-4347.
26. Buyse, A. The differentiation of transplanted mammalian gonad primordia. *J Exp Zool.* 1935; 70:1–30.
27. Cajal SR, Sala C. Terminación de los nervios y tubos glandulares del páncreas de los vertebrados. *Trab. Lab. Histol. Facultad Med. Barcelona* 1891; 28:1–5.
28. Cajal SR. El plexo de Auerbach de los batracios. *Trab. Lab. Histol. Facultad Med. Barcelona.* 1892; 23–28.
29. Cajal SR. Los Ganglios y Plexos Nerviosos del Intestino de los Mamíferos. Imprenta y Librería de Nicolás Moya. Madrid. 1893; 5-37.
30. Cajal SR. *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés.* Paris: Maloine, 1911, vol. 2, p. 891–942.

31. Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*. 1993; 56(2):337-44.
32. Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2001; 435:406-17.
33. Cantarero Carmona I, Luesma Bartolomé MJ, Lavoie-Gagnon C, Junquera Escribano C. Distribution of nestin protein: immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. *Microsc Res Tech*. 2011a; 74(2):148-52.
34. Cantarero Carmona I, Luesma Bartolomé MJ, Junquera Escribano C. Identification of telocytes in the lamina propria of rat duodenum: transmission electron microscopy. *J Cell Mol Med*. 2011b; 15(1):26-30.
35. Cantarero I, Luesma MJ, Junquera C. The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med*. 2011. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x.
36. Christensen J, Rick GA, Lowe LS. Distributions of interstitial cells of Cajal in stomach and colon of cat, dog, ferret, opossum, rat, guinea pig and rabbit. *J Auton Nerv Syst*. 1992; 37(1):47-56.
37. Christensen J. A commentary on the morphological identification of interstitial cells of Cajal in the gut. *J Auton Nerv Syst*. 1992; 37(2):75-88. Review.
38. Corbit KC, Shyer AE, Dowdle WE, Gaulden J, Singla V, Chen MH, Chuang PT, Reiter JF. Kif3a constrains β -catenin-dependent

- Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nature Cell Biol.* 2008; 10:70–76.
39. Coskun V, Wu H, Bianchi B, Tsao S, Kim K, Zhao J, Biancotti JC, Hutnick L, Krueger RC Jr, Fan G, de Vellis J, Sun YE. CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(3):1026-31.
 40. Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience.* 1996; 75:949- 967.
 41. Cretoiu D, Ciontea SM, Popescu LM, Ceafalan L, Ardeleanu C. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) as steroid hormone sensors in human myometrium: immunocytochemical approach. *J Cell Mol Med.* 2006; 10(3):789-95.
 42. Daniel EE, Posey-Daniel V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol.* 1984; 246(3 Pt 1):G305-15.
 43. Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle. *Neurogastroenterol Motil.* 2004; 16 Suppl 1:118-22. Review.
 44. Daniel EE, Yazbi AE, Mannarino M, Galante G, Boddy G, Livergant J, Oskouei TE. Do gap junctions play a role in nerve transmissions as well as pacing in mouse intestine? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292(3):G734-45.

45. d'Auriol L, Mattei MG, Andre C, Galibert F. Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4. *Hum Genet.* 1988; 78(4):374-6.
46. de Graaff E, Srinivas S, Kilkenny C, D'Agati V, Mankoo BS, Costantini F, Pachnis, V. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev.* 2001; 15:2433-2444.
47. Delacour A, Nepote V, Trumpp A, Herrera PL. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev.* 2004; 121(1):3-14.
48. Dickens EJ, Hirst GDS, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol.* 1999; 514:515–531
49. Dickinson DP, Machnicki M, Ali MM, Zhang Z, Sohal GS. Ventrally emigrating neural tube (VENT) cells: a second neural tube-derived cell population. *J Anat.* 2004; 205(2):79-98. Review.
50. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997; 17(13):5046-61.
51. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97(6):703-16.
52. Druckenbrod NR, Epstein ML. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol.* 2005; 287:125-133.

53. Duquette RA, Shmygol A, Vaillant C, Mobasheri A, Pope M, Burdyga T, Wray S. Vimentin-positive, c-kit-negative interstitial cells in human and rat uterus: a role in pacemaking? *Biol Reprod.* 2005; 72(2):276-83.
54. Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development.* 1996; 122:349-358.
55. Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2008; 331(1):243-50.
56. Epstein ML, Mikawa T, Brown AM, McFarlin DR. Mapping the origin of the avian enteric nervous system with a retroviral marker. *Dev Dyn.* 1994; 201:236-244.
57. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998; 4:1313–1317.
58. Farrugia G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61:45-84. Review.
59. Fausone Pellegrini MS. Ultrastructure and topography of Cajal interstitial cells in the circular muscle layer of the ileum and the colon in the rat. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1982; 58(19):1260-5.

60. Fausone-Pellegrini MS, Cortesini C. Ultrastructure of striated muscle fibers in the middle third of the human esophagus. *Histol Histopathol.* 1986; 1(2):119-28.
61. Fausone-Pellegrini MS. Comparative study of interstitial cells of Cajal. *Acta Anat (Basel).* 1987a; 130(2):109-26.
62. Fausone-Pellegrini MS. Cytodifferentiation of the interstitial cells of Cajal of mouse colonic circular muscle layer. An EM study from fetal to adult life. *Acta Anat (Basel).* 1987b; 128(2):98-109.
63. Fausone-Pellegrini MS. Histogenesis, structure and relationships of interstitial cells of Cajal (ICC): from morphology to functional interpretation. *Eur J Morphol.* 1992; 30(2):137-48. Review.
64. Fausone-Pellegrini MS, Thuneberg L. Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech.* 1999; 47(4):248-66. Review.
65. Fausone-Pellegrini MS. Interstitial cells of Cajal: once negligible players, now blazing protagonists. *Ital J Anat Embryol.* 2005; 110(1):11-31. Review.
66. Fausone-Pellegrini MS. Relationships between neurokinin receptor-expressing interstitial cells of Cajal and tachykininergic nerves in the gut. *J Cell Mol Med.* 2006; 10(1):20-32. Review.

67. Faussonne-Pellegrini MS, Bani D. Relationships between telocytes and cardiomyocytes during pre- and post-natal life. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(5):1061-3.
68. Formey A, Buscemi L, Boittin FX, Bény JL, Meister JJ. Identification and functional response of interstitial Cajal-like cells from rat mesenteric artery. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(3):509-19.
69. Fujita A, Takeuchi T, Saitoh N, Hanai J, Hata F. Expression of Ca(2+)-activated K(+) channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281(5):C1727-33.
70. Fukuda S, Kato F, Tozuka Y, Yamaguchi M, Miyamoto Y, Hisatsune T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci.* 2003; 23(28):9357-66.
71. Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience.* 1980; 5(1):1-20. Review.
72. Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 1995; 7:89-96.
73. Furness, JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81:87-96.
74. Furness JB. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections *Auton Neurosci.* 2006; 130(1-2):1-5.

75. Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*. 1987; 22:737-752.
76. Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*. 2004; 7(11):1233-41.
77. Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Martínez-Murillo R, Freire M. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Res Rev*. 2009; 61(2):154-69.
78. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell*. 1988; 55(1):185-92.
79. Geissler EN, Liao M, Brook JD, Martin FH, Zsebo KM, Housman DE, Galli SJ. Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. *Somat Cell Mol Genet*. 1991; 17(2):207-14.
80. Gershon, MD, Epstein ML, Hegstrand L. Colonization of the chick gut by progenitors of enteric serotonergic neurons: distribution, differentiation, and maturation within the gut. *Dev Biol*. 1980; 77: 41-51.
81. Gershon, MD. The enteric nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1981; 4:227-272.
82. Gershon MD, Rothman TP. Enteric glia. *Glia*. 1991; 4:195-204.

83. Gershon, MD. Development of the neural crest. *J Neurobiol.* 1993; 24:141-145.
84. Gershon, MD. *The Second Brain*: New York: Harper Collins. 1998.
85. Gherghiceanu M, Hinescu ME, Andrei F, Mandache E, Macarie CE, Fausone-Pellegrini MS, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in myocardial sleeves of human pulmonary veins. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(5A):1777-81.
86. Gherghiceanu M, Manole CG, Popescu LM. Telocytes in endocardium: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med.* 2010;14(9):2330-4.
87. Gianino S, Grider JR, Cresswell J, Enomoto H, Heuckeroth RO. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development.* 2003; 130:2187-2198.
88. Gil-Perotín S, Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2009; 203:1-101, ix.
89. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* 1999; 2(3):260-5.
90. Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell.* 1993; 75:463-476.

91. Hagger R, Gharaie S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst.* 1998; 73(2-3):75-9.
92. Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A. Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2008; 11(3):277-84.
93. Hanani M, Ledder O, Yutkin V, Abu-Dalu R, Huang TY, Härtig W, Vannucchi MG, Fausone-Pellegrini MS. Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J Comp Neurol.* 2003; 462:315–327.
94. Handel M, Schulz S, Stanarius A, Schreff M, Erdtmann-Vourliotis M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V. Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience.* 1999; 89(3):909-26.
95. Hara Y, Kubota M, Szurszewski JH. Electrophysiology of smooth muscle of the small intestine of some mammals. *J Physiol.* 1986; 372:501-20.
96. Harhun M, Gordienko D, Kryshchal D, Pucovský V, Bolton T. Role of intracellular stores in the regulation of rhythmical $[Ca^{2+}]_i$ changes in interstitial cells of Cajal from rabbit portal vein. *Cell Calcium.* 2006; 40(3):287-98.

97. Hashitani H, Suzuki H. Identification of interstitial cells of Cajal in corporal tissues of the guinea-pig penis. *Br J Pharmacol.* 2004; 141(2):199-204.
98. Hashitani H, Garcia-Londoño AP, Hirst GD, Edwards FR. Atypical slow waves generated in gastric corpus provide dominant pacemaker activity in guinea pig stomach. *J Physiol.* 2005; 569(Pt 2):459-65.
99. Hashitani H, Lang RJ. Functions of ICC-like cells in the urinary tract and male genital organs. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(6A):1199-211.
100. Hinescu ME, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in human atrial myocardium. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4):972-5.
101. Hinescu ME, Popescu LM, Gherghiceanu M, Faussonne-Pellegrini MS. Interstitial Cajal-like cells in rat mesentery: an ultrastructural and immunohistochemical approach. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(1):260-70.
102. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Suci L, Popescu LM. Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(2):389-97.
103. Hirst GDS, Edwards FR. Generation of slow waves in the antral region of guinea-pig stomach – a stochastic process. *J Physiol.* 2001; 535:165–180
104. Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 1985; 5(12):3310-28.

105. Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol.* 2001; 537(Pt 1):237-50.
106. Horiguchi K, Sanders KM, Ward SM. Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum. *Cell Tissue Res.* 2003; 311:299-313.
107. Huang Y, Mei F, Yu B, Zhang HJ, Han J, Jiang ZY, Zhou DS. Distribution of the interstitial Cajal-like cells in the gallbladder and extrahepatic biliary duct of the guinea-pig. *Acta Histochem.* 2009; 111(2):157-65.
108. Huizinga JD, Farraway L, Hertog AD. Generation of slow-wavetype action potentials in canine colon smooth muscle involves a non-Ltype Ca² conductance. *J Physiol.* 1991; 442:15–29.
109. Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18:393-403
110. Huizinga JD, Golden CM, Zhu Y, White EJ. Ion channels in interstitial cells of Cajal as targets for neurotransmitter action. *Neurogastroenterol Motil.* 2004; 16 Suppl 1:106-11.
111. Iwanaga T, Hozumi Y, Takahashi-Iwanaga H. Immunohistochemical demonstration of dopamine receptor D2R in the primary cilia of the mouse pituitary gland. *Biomed Res.* 2011; 32(3):225-35.

112. Jensen CG, Davison EA, Bowser SS, Rieder CL. Primary cilia cycle in PtK1 cells: effects of colcemid and taxol on cilia formation and resorption. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1987; 7(3):187-97.
113. Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol*. 2003; 258(2):364-84.
114. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Raff MC, Miller RH, Noble M. Identification of a neural stem cell in the adult develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96(1):25-34.
115. Johnston L, Sergeant GP, Hollywood MA, Thornbury KD, McHale NG. Calcium oscillations in interstitial cells of the rabbit urethra. *J Physiol*. 2005; 565(Pt 2):449-61.
116. Jones C, Roper VC, Foucher I, Qian D, Banizs B, Petit C, Yoder BK, Chen P. Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation. *Nature Genet*. 2008; 40: 69–77.
117. Junquera C, Martínez-Ciriano C, Castiella T, Serrano P, Azanza MJ, Junquera SR. Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(4):776-87.
118. Junquera Escribano C, Cantarero Carmona I, Luesma Bartolomé MJ, Soriano-Navarro M, Martínez-Ciriano C, Castiella Muruzábal T, García-Verdugo JM. The primary cilium: A

- relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol.* 2011; 26(4):461-70.
119. Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB. Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem.* 1995; 43(8):843-7.
120. Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci.* 1984; 4(6):1429-41.
121. Kapur RP, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development.* 1992; 116:167-175.
122. Kapur RP. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol.* 2000; 227:146-155.
123. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004; 27(8):447-52. Review.
124. Kierszenbaum AL. *Histología y Biología Celular. Introducción a la anatomía patológica.* 2ª Edición. Elsevier. Barcelona. 2008.
125. Kitamura Y, Hirota S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(23):2924-31.
126. Kito Y, Suzuki H. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J Physiol.* 2003; 553(Pt 3):803-18.

127. Kluppel M, Huizinga JD, Malysz J, Bernstein A. Developmental origin and Kit-dependent development of the interstitial cells of cajal in the mammalian small intestine. *Dev Dyn.* 1998; 211(1):60-71.
128. Knecht AK, Bronner-Fraser M. Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(6):453-61. Review.
129. Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *J Physiol.* 1998; 513:203–213.
130. Komuro T, Tokui K, Zhou DS. Identification of the interstitial cells of Cajal. *Histol Histopathol.* 1996; 11(3):769-86. Review.
131. Komuro T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. *Microsc Res Tech.* 1999; 47(4):267-85. Review.
132. Komuro T, Seki K, Horiguchi K. Ultrastructural characterization of the interstitial cells of Cajal. *Arch Histol Cytol.* 1999; 62(4):295-316.
133. Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol.* 2006; 576(Pt 3):653-8. Review.
134. Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(7):1917-21. Review.
135. Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond

- differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol.* 2003; 467(4):455-63.
136. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron.* 2002; 35:657–669.
137. Kukekov VG, Laywell ED, Thomas LB, Steindler DA. A nestin-negative precursor cell from the adult mouse brain gives rise to neurons and glia. *Glia.* 1997; 21:399–407.
138. Kunze, WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 1999; 61:117-142.
139. Lavin ST, Southwell BR, Murphy R, Jenkinson KM, Furness JB. Activation of neurokinin 1 receptors on interstitial cells of Cajal of the guinea-pig small intestine by substance P. *Histochem Cell Biol.* 1998; 110:263-271.
140. Le Douarin N. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol.* 1973; 30(1):217-22.
141. Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol.* 1973; 30(1):31-48.
142. Le Douarin N. Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol.* 1980; 16:31-85. Review.
143. Le Douarin NM, Dupin E. Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13:529-536.

144. Lecoin L, Gabella G, Le Douarin N. Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development*. 1996; 122(3):725-33.
145. Lee JCF, Thuneberg L, Berezin I, and Huizinga JD. Generation of slow waves in membrane potentials is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1999; 277:G409–G423.
146. Liu HN, Ohya S, Furuzono S, Wang J, Imaizumi Y, Nakayama S. Co-contribution of IP3R and Ca²⁺ influx pathways to pacemaker Ca²⁺ activity in stomach ICC. *J Biol Rhythms*. 2005a; 20(1):15-26.
147. Liu HN, Ohya S, Wang J, Imaizumi Y, Nakayama S. Involvement of ryanodine receptors in pacemaker Ca²⁺ oscillation in murine gastric ICC. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005b; 328(2):640-6.
148. Liu MT, Kuan YH, Wang J, Hen R, Gershon MD. 5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci*. 2009; 29(31):9683-99.
149. Lo L, Anderson DJ. Postmigratory neural crest cells expressing c-ret display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron*. 1995; 15:527–539.
150. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(5):2074-7.

151. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994; 264(5162):1145-8.
152. Luckensmeyer GB, Keast JR. Projections of pelvic autonomic neurons within the lower bowel of the male rat: an anterograde labelling study. *Neuroscience*. 1998; 84:263-280.
153. Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*. 1992; 116(2):369-75.
154. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, McNiece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*. 1990; 63(1):203-11.
155. Matini, P, Mayer B, Fausone-Pellegrini MS. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res*. 1997; 288:11-23.
156. Mazet B, Raynier C. Interstitial cells of Cajal in the guinea pig gastric antrum: distribution and regional density. *Cell Tissue Res*. 2004; 316(1):23-34.
157. McCloskey KD, Gurney AM. Kit positive cells in the guinea pig bladder. *J Urol*. 2002; 168(2):832-6
158. Metzger R, Schuster T, Till H, Stehr M, Franke FE, Dietz HG. Cajal-like cells in the human upper urinary tract. *J Urol*. 2004; 172(2):769-72.

159. Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology*. 2009a; 136:2214–2225.
160. Metzger M, Bareiss PM, Danker T, Wagner S, Hennenlotter J, Guenther E, Obermayr F, Stenzl A, Koenigsrainer A, Skutella T, Just L. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. *Gastroenterology*. 2009b; 137:2063–2073.
161. Metzger M. Neurogenesis in the enteric nervous system. *Arch Ital Biol*. 2010; 148:73–83.
162. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005; 13(3):205-20.
163. Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Kanayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y. A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*. 1998; 115(5):1090-5.
164. Nakayama S, Kajioka S, Goto K, Takaki M, Liu HN. Calcium-associated mechanisms in gut pacemaker activity. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(5):958-68. Review.

165. Newgreen DF. The rostral level of origin of sympathetic neurons in the chick embryo, studied in tissue culture. *Am J Anat.* 1979; 154:557-562.
166. Nicholas JS. Experiments on developing rats. IV. The growth and differentiation of eggs and egg cylinders when transplanted under the kidney capsule. *J Exp Zool.* 1942; 90:41–64.
167. Palmer TD, Ray J, Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci.* 1995; 6(5):474-86.
168. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci.* 1999; 19(19):8487-8497
169. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000; 425(4):479-94.
170. Paton WD, Vane JR. Analysis of the responses of the isolated stomach to electrical stimulation and to drugs. *J Physiol.* 1963; 165:10-46.
171. Pauls K, Merkelbach-Bruse S, Thal D, Büttner R, Wardelmann E. PDGFRalpha- and c-kit-mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology.* 2005; 46(2):166-75.

172. Pazour GJ, Witman GB. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(1):105-10. Review.
173. Pei-Lin Li. The intramural nervous system of the small intestine with special reference to the innervation of the inner subdivision of its circular muscle. *J Anat.* 1940; 74(Pt 3):348–359.
174. Pezzone MA, Watkins SC, Alber SM, King WE, de Groat WC, Chancellor MB, Fraser MO. Identification of c-kit-positive cells in the mouse ureter: the interstitial cells of Cajal of the urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284(5):F925-9.
175. Pham TD, Gershon MD, Rothman TP. Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. *J Comp Neurol.* 1991; 314(4):789-98.
176. Plotnikova OV, Pugacheva EN, Golemis EA. Primary cilia and the cell cycle. *Methods Cell Biol.* 2009; 94:137-60.
177. Pomeranz HD, Rothman TP, Chalazonitis A, Tennyson VM, Gershon MD. Neural crest-derived cells isolated from the gut by immunoselection develop neuronal and glial phenotypes when cultured on laminin. *Dev Biol.* 1993; 156:341-361.
178. Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, Ceausu M, Gherghiceanu M, Braga RI, Vasilescu F, Zagrean L, Ardeleanu C. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *J Cell Mol Med.* 2005a; 9(2):479-523.

179. Popescu LM, Hinescu ME, Ionescu N, Ciontea SM, Cretoiu D, Ardelean C. Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med.* 2005b; 9(1):169-90.
180. Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1101:139-65. Review.
181. Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(4):729-40.
182. Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, Ardelean A, Nicolescu MI, Hinescu ME, Kostin S. Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(8):2085-93.
183. Popescu LM, Manole E, Serboiu CS, Manole CG, Suciu LC, Gherghiceanu M, Popescu BO. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(6):1379-92.
184. Powley TL. Vagal input to the enteric nervous system. *Gut.* 2000; 47 Suppl 4:iv30-32.
185. Pucovský V, Moss RF, Bolton TB. Non-contractile cells with thin processes resembling interstitial cells of Cajal found in the wall of guinea-pig mesenteric arteries. *J Physiol.* 2003; 552(Pt 1):119-33.
186. Quarmby LM. Cellular deflagellation. *Int Rev Cytol.* 2004; 233:47-91.

187. Radu E, Regalia T, Ceafalan L, Andrei F, Cretoiu D, Popescu LM. Cajal-type cells from human mammary gland stroma: phenotype characteristics in cell culture. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(3):748-52.
188. Rasmussen H, Rumessen JJ, Hansen A, Smedts F, Horn T. Ultrastructure of Cajal-like interstitial cells in the human detrusor. *Cell Tissue Res.* 2009; 335(3):517-27.
189. Rauch U, Hänsgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schäfer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis.* 2006a; 21:554–559.
190. Rauch U, Klotz M, Maas-Omlor S, Wink E, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schäfer KH. Expression of intermediate filament proteins and neuronal markers in the human fetal gut. *J Histochem Cytochem.* 2006b; 54:39–46.
191. Rieder CL, Jensen CG, Jensen LC. The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *J Ultrastruct Res.* 1979; 68:173–185.
192. Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008; 363(1489):123-37.
193. Romero-Alemán MM, Monzón-Mayor M, Yanes C, Lang D. Radial glial cells, proliferating periventricular cells, and microglia might contribute to successful structural repair in the cerebral

- cortex of the lizard *Gallotia galloti*. *Exp Neurol*. 2004; 188(1):74-85.
194. Rosser AE, Tyers P, ter Borg M, Dunnett SB, Svendsen CN. Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res*. 1997; 98(2):291-5.
195. Rothman TP, Gershon MD. Phenotypic expression in the developing murine enteric nervous system. *J Neurosci*. 1982; 2:381-393.
196. Rothman TP, Nilaver G, Gershon MD. Colonization of the developing murine enteric nervous system and subsequent phenotypic expression by the precursors of peptidergic neurons. *J Comp Neurol*. 1984; 225:13-23.
197. Rumessen JJ, Thuneberg L, Mikkelsen HB. Plexus muscularis profundus and associated interstitial cells. II. Ultrastructural studies of mouse small intestine. *Anat Rec*. 1982; 203(1):129-46.
198. Rumessen JJ. Identification of interstitial cells of Cajal. Significance for studies of human small intestine and colon. *Dan Med Bull*. 1994; 41(3):275-93. Review.
199. Rumessen JJ, Vanderwinden JM. Interstitial cells in the musculature of the gastrointestinal tract: Cajal and beyond. *Int Rev Cytol*. 2003; 229:115-208.

200. Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 1996; 111(2):492-515. Review.
201. Sanders KM, Ordog T, Koh SD, and Ward SM. A novel pacemaker mechanism drives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci*. 2000; 15:291–298.
202. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68:307-43.
203. Sarna SK. Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the gut? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294(2):G372-90.
204. Schäfer K-H, Ginneken CV, Copray S. Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. *Anat Rec*. 2009; 292:1940–1952.
205. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*. 1994; 367:380-383.
206. Serbedzija GN, Burgan S, Fraser SE, Bronner-Fraser M. Vital dye labeling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development*. 1991; 111:857-866.

207. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; 21(18):7153-60.
208. Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 2004; 478(4):359-78.
209. Shafik A, El-Sibai O, Shafik AA, Shafik I. Identification of interstitial cells of Cajal in human urinary bladder: concept of vesical pacemaker. *Urology*. 2004b; 64(4):809-13.
210. Shafik A, El-Sibai O, Shafik I, Shafik AA. Immunohistochemical identification of the pacemaker cajal cells in the normal human vagina. *Arch Gynecol Obstet*. 2005; 272(1):13-6.
211. Shi H, Cui H, Alam G, Gunning WT, Nestor A, Giovannucci D, Zhang M, Ding HF. Nestin expression defines both glial and neuronal progenitors in postnatal sympathetic ganglia. *J Comp Neurol*. 2008; 508:867–878.
212. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol*, 1997; 148(2):577-586.
213. Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001; 410(6826):372-6.
214. Silva AT, Wardhaugh T, Dolatshad NF, Jones S, Saffrey MJ. Neural progenitors from isolated postnatal rat myenteric

- ganglia: expansion as neurospheres and differentiation in vitro. *Brain Res.* 2008; 1218:47–53.
215. Smith TK, Reed JB, Sanders KM. Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J Physiol.* 1987; 252(2 Pt 1):C215-24.
216. Sohal GS, Ali MM, Farooqui FA. A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int J Dev Neurosci.* 2002; 20(8):619-26.
217. Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci.* 2002; 5(5):438-45.
218. Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet.* 1998; 18:60-64.
219. Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G. Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia.* 2004; 46(1):41-52.
220. Suárez-Rodríguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle. *Stem Cells.* 2004; 22:1373–1385.
221. Suci L, Popescu LM, Gherghiceanu M. Human placenta: de visu demonstration of interstitial Cajal-like cells. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(3):590-7.

222. Suciu L, Popescu LM, Regalia T, Ardelean A, Manole CG. Epicardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC) highlighted by immunofluorescence. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(4):771-7.
223. Suciu L, Popescu LM, Gherghiceanu M, Regalia T, Nicolescu MI, Hinescu ME, Fausone-Pellegrini MS. Telocytes in human term placenta: morphology and phenotype. *Cells Tissues Organs*. 2010; 192(5):325-39.
224. Suzuki H, Ward SM, Bayguinov YR, Edwards FR, Hirst GD. Involvement of intramuscular interstitial cells in nitrergic inhibition in the mouse gastric antrum. *J Physiol*. 2003; 546(Pt 3):751-763.
225. Suzuki N, Prosser CL, Dahms V. Boundary cells between longitudinal and circular layers: essential for electrical slow waves in cat intestine. *Am J Physiol*. 1986; 250(3 Pt 1):G287-94.
226. Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1982; 71:1-130.
227. Thuneberg L. One hundred years of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech*. 1999; 47(4):223-38. Review.
228. Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec*. 2001; 262:71-78.
229. Toma H, Nakamura K, Emson PC, Kawabuchi M. Immunohistochemical distribution of c-Kit-positive cells and

- nitric oxide synthase-positive nerves in the guinea-pig small intestine. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 75(2-3):93-9.
230. Torihashi S, Ward SM, Sanders KM. Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. *Gastroenterology.* 1997; 112(1):144-55.
231. Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 75(1):38-50.
232. Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem.* 2002; 277(21):19191-7.
233. Tropepe V, Craig CG, Morshead CM, van der Kooy D. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci.* 1997; 17(20):7850-7859.
234. Tucker RW, Pardee AB, Fujiwara K. Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell.* 1979; 17(3):527-35.
235. Vajda J, Fehér E. Distribution and fine structure of the interstitial cells of Cajal. *Acta Morphol Acad Sci Hung.* 1980; 28(3):251-8.
236. Van der Aa F, Roskams T, Blyweert W, De Ridder D. Interstitial cells in the human prostate: a new therapeutic target? *Prostate.* 2003; 56(4):250-5.

237. Vanderwinden JM, Gillard K, De Laet MH, Messam CA, Schiffmann SN. Distribution of the intermediate filament nestin in the muscularis propria of the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 2002; 309(2):261-8.
238. Vannucchi MG, Fausone-Pellegrini MS. Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre- and postnatal life. *Neurosci Lett.* 1996; 206:105-108.
239. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST. Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol.* 2009; 111(3):p39-53.
240. Vives V, Alonso G, Solal AC, Joubert D, Legraverend C. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol.* 2003; 457(4):404-19.
241. Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 1999; 295(2):247-56.
242. Ward SM, Harney SC, Bayguinov JR, McLaren GJ, Sanders KM. Development of electrical rhythmicity in the murine gastrointestinal tract is specifically encoded in the tunica muscularis. *J Physiol.* 1997; 505(Pt 1):241-58.
243. Ward SM. Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut.* 2000; 47 Suppl 4:iv40-3;

244. Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281(3):G602-11. Review.
245. Wheatley DN. Primary cilia in normal and pathological tissues. *Pathobiology.* 1995; 63(4):222-38.
246. Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(41):14913-8.
247. Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Szele FG. Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res.* 2004; 76(3):282-95.
248. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 1987; 6(11):3341-51.
249. Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol.* 1954; 101(2):515-41.
250. Yoneyama M, Shiba T, Hasebe S, Ogita K. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.* 2011; 115(4):425-32.

251. Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol.* 1996; 180(1):97-107.
252. Young HM, Hearn CJ, Ciampoli D, Southwell BR, Brunet F, Newgreen, DF. A single rostrocaudal colonization of the rodent intestine by enteric neuron precursors is revealed by the expression of Phox2b, Ret, and p75 and by explants grown under the kidney capsule or in organ culture. *Dev Biol.* 1998; 202:67-84.
253. Young HM, Ciampoli D, Hsuan J, Canty AJ. Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn.* 1999; 216:137- 152.
254. Young HM, Bergner AJ, Müller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol.* 2003; 456:1–11.
255. Zhang SC, Fedoroff S. Cellular localization of stem cell factor and c-kit receptor in the mouse nervous system. *J Neurosci Res.* 1997; 47(1):1-15.
256. Zheng Y, Li H, Manole CG, Sun A, Ge J, Wang X. Telocytes in trachea and lungs. *J Cell Mol Med.* 2011. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01404.x.

257. Zimmermann KW. Beiträge zur Kenntnis einiger Drüsen und Epithelien. Arch Mikr Anat. Entwicklungsmech. 1898; 52:552–706.

