



## **Trabajo Fin de Grado.**

# **Regulación de la fisiología de las células neuronales inmaduras en el cuerpo carotídeo.**

Alumno: Belén Cabello Vega.

Tutor: Ricardo Pardal Redondo.

Departamento: Fisiología Médica y Biofísica.

Grado en Bioquímica, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar, quería agradecer a mi tutor Ricardo Pardal Redondo. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio con tanta amabilidad y por confiar en mí para este trabajo de investigación. A Verónica Sobrino Cabello, por guiarme indirectamente en este trabajo y porque sin tus aportaciones previas, este Trabajo Fin de Grado no existiría. En especial, dedicarle este proyecto a Ismael y a Pablo, por estar siempre animándome para que no me rindiera a pesar de las dificultades que este trabajo ha supuesto. Sois lo mejor que me llevo del laboratorio 103.

En segundo lugar, se lo quiero dedicar a mi familia académica desde el primer día; Teresa, Jaime, Jose, Alba y a las últimas incorporaciones, aunque no menos importantes, Cris, Ángela, Cristina y Pilar. No existen las palabras para definir lo que habéis significado para mí en estos cuatro años. Gracias por estar conmigo al pie del cañón y no abandonarme nunca cuando más me hacía falta. Sin vosotros no estaría escribiendo esto. Os llevaré siempre en mí, equipo.

En tercer lugar, agradecer a “las niñas”, Alba, Olalla, Julias y Ester. Aunque para mí no son niñas sino mujeres extraordinarias. Gracias por guardar un trozo de mí en vuestros corazones y permitirme formar parte de nuestro duro pero precioso camino juntas. Os quiero tres mil.

A mi persona especial, la que mejor me conoce y saca lo mejor de mí. No son suficientes los adjetivos para definir lo que has significado para mí a nivel académico y mucho más importante, a nivel personal. Te voy a querer siempre.

A mi grupo de amigas, Cynthia, Paula, María, Ana Belén, Julia, Andrea, Noelia, Lucía, Lauri, Bea, Carmen, Mercedes y Laura. Gracias por confiar en mí más de lo que lo hago yo y por siempre sacarle el lado positivo a todo. Desde siempre y para siempre, os quiero y os debo mucho.

Por último, a mi familia: Papá, Mamá, Elena y Lily, porque, aunque se lo digo poco, son mis pilares fundamentales y mi modelo a seguir. Ojalá en un futuro sea la mitad de lo que habéis llegado a ser vosotros. Especialmente, quiero agradecer a mi hermana, por hacerme saber siempre lo orgullosa que estás de mí. La que te admira soy yo a ti.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
2.1 Anatomía y fisiología del cuerpo carotídeo.....	2
2.2 Funcionamiento del nicho.....	4
2.2.1 Células madre multipotenciales.....	4
2.2.2 Mecanismo molecular de la sinapsis quimioproliferativa.....	7
2.2.3 Neurogénesis en el cuerpo carotídeo.....	9
2.3 Embriogénesis del cuerpo carotídeo. Introducción al antígeno HNK-1...	11
2.4 Aspectos clínicos.....	12
<b>3. Objetivo</b> .....	13
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	13
4.1 Disección del cuerpo carotídeo.....	13
4.2 Dispersión del cuerpo carotídeo.....	14
4.3 Aislamiento de neuroblastos por citometría de flujo.....	14
4.4 Ensayo de diferenciación con acetilcolina.....	15
4.5 Inmunofluorescencia de TH <i>in vitro</i> .....	15
4.6 Análisis de imagen.....	16
4.7 Gráficos.....	18
4.8 Estadística.....	18
<b>5. Resultados</b> .....	18
5.1 Aislamiento de neuroblastos HNK-1 positivos.....	18
5.2 Inmunofluorescencia de TH <i>in vitro</i> .....	19
5.3 Análisis de Imagen.....	20
5.4 Gráficos.....	20
5.5 Estadística.....	21
<b>6. Discusión</b> .....	22
<b>7. Conclusiones</b> .....	24
<b>8. Bibliografía</b> .....	25

## **1. Resumen**

El cuerpo carotídeo es un órgano pequeño situado en la bifurcación de la arteria carótida. Su función principal es la de quimiorreceptor periférico de parámetros como la presión parcial de oxígeno, de CO<sub>2</sub>, la concentración de protones y de diversas hormonas.

Se ha observado que la respuesta a un estímulo de hipoxia crónica contribuye al crecimiento del cuerpo carotídeo mediante la formación de nuevas células glómicas, a través de un proceso de neurogénesis mediado por células madre multipotentes residentes en el órgano. En estudios recientes se ha observado una nueva subpoblación de células neuronales inmaduras quiescentes llamadas neuroblastos que son positivas para el antígeno HNK-1. Estos neuroblastos, insensibles a un estímulo hipóxico agudo, son capaces de diferenciarse a células glómicas ya maduras ante un estímulo de hipoxia crónica mediante un proceso denominado neurogénesis “rápida”. Se ha comprobado que neurotransmisores como la acetilcolina secretados por las células glómicas son capaces de inducir la maduración funcional de estos neuroblastos.

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado el aislamiento de estos neuroblastos a partir de cuerpo carotídeo disperso, lo que ha permitido realizar un ensayo de diferenciación con el neurotransmisor acetilcolina para observar modificaciones morfológicas características de la propia maduración funcional de los neuroblastos.

Los resultados han permitido concluir que existen diferencias significativas en las modificaciones morfológicas analizadas en los neuroblastos tratados con acetilcolina. Por tanto, se afirma que la acetilcolina promueve una maduración, tanto funcional como morfológica, de los neuroblastos prediferenciados hacia células glómicas de tipo I favoreciendo así la neurogénesis “rápida”. Por lo que un mejor conocimiento de este proceso puede ser muy importante para su aplicación en terapia celular y demás desordenes relacionados con este órgano.

## **2. Introducción.**

### **2.1 Anatomía y fisiología del cuerpo carotídeo:**

El cuerpo carotídeo es un órgano redondeado y en algunos casos bilobulado, situado en la bifurcación de la arteria carótida. Sus dimensiones son difíciles de determinar, pues se encuentra rodeado por gran cantidad de tejido adiposo y tejido conectivo. De forma aproximada podríamos decir que sus dimensiones en humanos oscilan entre los siguientes rangos: 3,3-7 mm de alto, por 3-4 mm de profundidad y 1.7-2 mm de ancho (Monge Salazar & Rodríguez Palomo, 2017) (Figura 1).

El cuerpo carotídeo se encuentra irrigado a través de redes capilares originadas por ramificaciones de la arteria carótida. Estas ramificaciones de la arteria carótida que aportan irrigación al parénquima del cuerpo carotídeo, se siguen ramificando y continúan irrigando el ganglio cervical superior (GCS) (Sobrino V., Tesis Doctoral, 2017).

Debido a su papel como órgano quimiorreceptor arterial periférico, el cuerpo carotídeo está fuertemente inervado por un gran número de fibras sensoriales aferentes que conducirán la información quimiorreceptora, a través del nervio del seno carotídeo primero y del nervio glosofaríngeo después, hasta los centros cardiorrespiratorios del tronco del encéfalo.

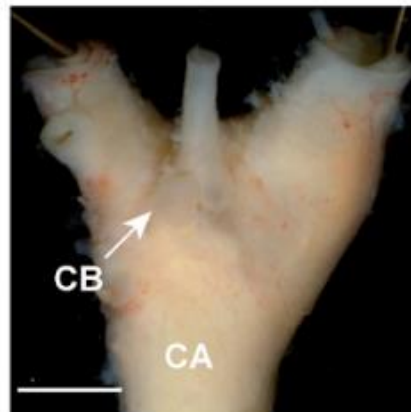
Desde un punto de vista microscópico, el parénquima del cuerpo carotídeo está organizado en grupos de células denominados glomérulos, que están en contacto con capilares y nervios. El tipo celular más abundante en estos glomérulos son las células glómicas o tipo I que son las responsables de la función quimiorreceptora del órgano (Pardal et al., 2007). Estas células muestran un fenotipo neuroendocrino, expresan marcadores de neurona catecolaminérgica, como la tirosina hidroxilasa (TH) y contienen en su citoplasma vesículas secretoras cargadas de neurotransmisores como la acetilcolina, adenosín trifosfato (ATP), dopamina, etc (Sobrino V., Tesis Doctoral, 2017). Los glomérulos de células glómicas están rodeados por otro tipo celular denominado células sustentaculares o tipo II que son células de fenotipo glial, aunque posteriormente veremos que son más que un mero sustento (López-Barneo et al., 2009).

Desde un punto de vista fisiológico, como ya se ha mencionado anteriormente, el cuerpo carotídeo funciona como un quimiorreceptor arterial principal en el sistema nervioso periférico. Esta estructura detecta cambios en distintas variables químicas sanguíneas, como los niveles de oxígeno, concentración de CO<sub>2</sub>, la glucemia o la acidosis, es decir, la concentración de protones (Gao et al., 2019). El aumento de la concentración de

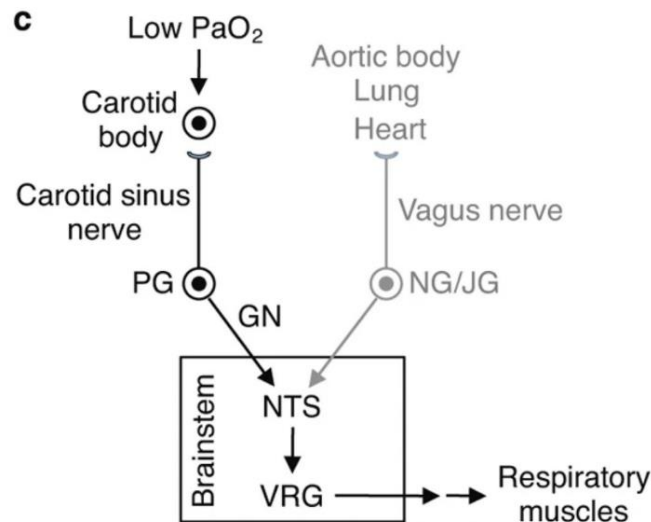
protones está muy relacionado con el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>, ya que cuando hay un aumento de este gas, gracias a la enzima anhidrasa carbónica presente en la sangre, se produce una subida de la concentración de protones, es decir, una acidificación del pH. El cuerpo carotídeo también es capaz de detectar hormonas como la leptina o la insulina (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019).

Un descenso en la presión parcial de oxígeno sanguíneo (pO<sub>2</sub>) es el principal estímulo para el órgano. Cuando esta baja del rango de 60-80 mmHg (Chang, 2017) las células tipo I se despolarizan y comunican este estímulo de hipoxia aguda a los terminales sensitivos aferentes, y estos trasladan la información al núcleo del tracto solitario (NTS) que se encuentra en el tronco del encéfalo. Desde esta localización, se transmite la señal al grupo respiratorio ventral (VRG, del inglés *Ventral Respiratory Group*) y al complejo pre-Bötzinger, que son las regiones donde se produce el ritmo respiratorio. Las neuronas del VRG envían proyecciones premotoras y motoras a los músculos respiratorios como el diafragma y a los músculos intercostales y así se modifica el ritmo respiratorio (Chang et al, 2015) (Figura 2).

### Human carotid artery bifurcation



**Fig. 1:** Bifurcación de la arteria carótida humana (CA del inglés *Carotid Artery*), donde el cuerpo carotídeo (CB, del inglés *Carotid Body*) está señalado con una flecha. Escala: 1 cm. Tomado de Gao et al., 2019.



**Fig. 2:** Circuito respiratorio de detección de oxígeno. Un descenso en la presión sanguínea de O<sub>2</sub> estimula a las células glómicas para que señalicen al nervio sinusal, una rama del nervio glossofaríngeo (GN, del inglés *Glosopharyngeal Nerve* cuyos somas neuronales se encuentran en el ganglio petroso PG (del inglés, *Petrosal Ganglion*). Los axones del GN terminan en el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus tractus solitarius*). La señal se transmite finalmente del NTS al grupo respiratorio ventral (VRG, del inglés *Ventral Respiratory Group*). Las demás siglas corresponden a ganglio nodoso (NG, del inglés *Nodose Ganglion*) y ganglio yugular (JG, del inglés *Jugular Ganglion*). Tomado de Chang et al., 2015.

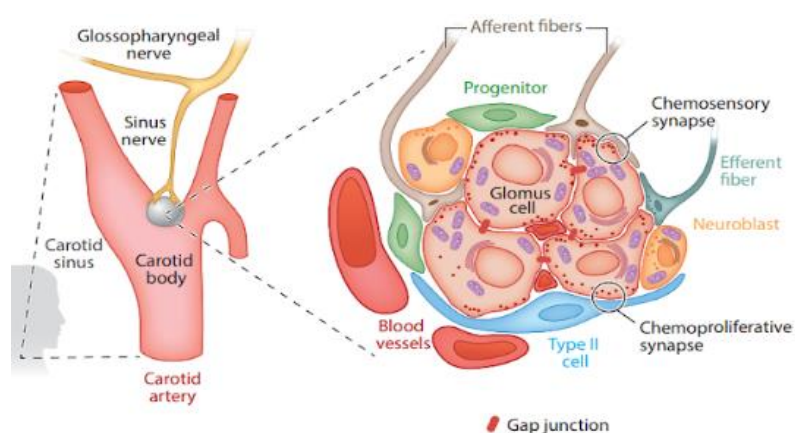
## 2.2 Funcionamiento del nicho.

### 2.2.1 Células madre multipotenciales.

Como se ha mencionado anteriormente, las células glómicas contienen abundantes vesículas sinápticas con dopamina y muchos otros neurotransmisores. Esto permite que sean identificadas con anticuerpos frente a la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de dopamina. Además, estas células glómicas están rodeadas por células de tipo glial, tipo II, o células sustentaculares que pueden identificarse con anticuerpos frente a la proteína acídica fibrilar derivada de la glía (GFAP, del inglés *Glia-derived Fibrillary Acidic Protein*). Una subpoblación de estas células tipo II han sido identificadas como células madre multipotentes en el órgano, capaces de contribuir al crecimiento del cuerpo carotídeo mediante la formación de nuevas células glómicas, en respuesta a un estímulo de hipoxia crónica. Existen otros tipos celulares que provienen de la activación de las células madre multipotentes del cuerpo carotídeo, como son las células vasculares (Annese et al., 2017), o progenitores intermedios positivos para nestina

(marcador de progenitores neurales) vistos en humanos y otras especies (Platero-Luengo et al., 2014).

Por último, estudios recientes han identificado una población de neuroblastos quiescentes que expresan marcadores catecolaminérgicos (TH+) pero todavía son incapaces de responder al estímulo agudo de la hipoxia (Sobrino et al., 2018). Estos neuroblastos inmaduros, que son más pequeños que las células glómicas y se localizan en la periferia de los glomérulos (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019), pueden experimentar divisiones mitóticas antes de la maduración final hacia células tipo I quimiorreceptoras (Sobrino et al., 2018) (Figura 3).



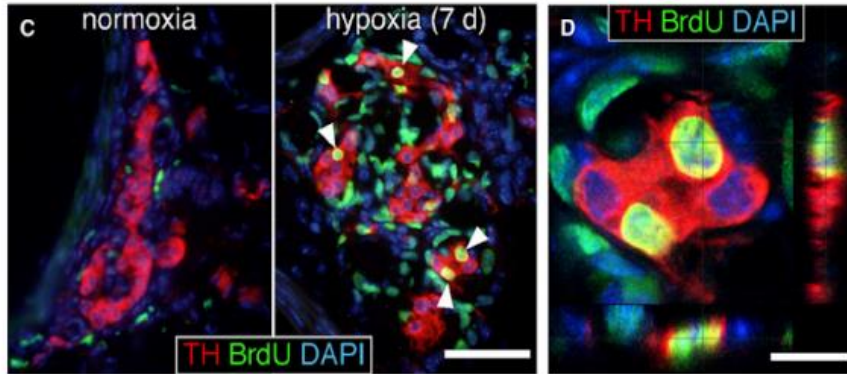
**Fig. 3:** Representación esquemática de las poblaciones celulares en el parénquima del cuerpo carotídeo. Tomado de Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019.

A diferencia de otros órganos neurales periféricos, el cuerpo carotídeo tiene una notable plasticidad estructural, ya que es capaz de crecer durante la aclimatación a un estímulo hipóxico mantenido (Sobrino et al., 2018), como ocurre en pacientes con enfermedades cardiopulmonares que cursan con hipoxemia.

Para estudiar en detalle este proceso de crecimiento del órgano, se expusieron a ratones a condiciones de hipoxia durante 21 días. Este estímulo provocó un aumento del número de vasos sanguíneos y del parénquima neural del órgano, con un incremento del número de células glómicas TH+ (Pardal et al., 2007). Posteriormente, para ver la proliferación y la formación de nuevas células glómicas, los ratones se trataron con un análogo de la timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU) que se incorpora al ADN durante la replicación, y se mantuvieron a los animales en condiciones de hipoxia. En los normóxicos, no se observaron células TH+/BrdU+. Sin embargo, en los animales hipóxicos, se observaron



numerosas células TH<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> sugiriendo la aparición de nuevas células glómicas a partir de células madre neurales proliferativas (Pardal et al., 2007) (Figura 4).



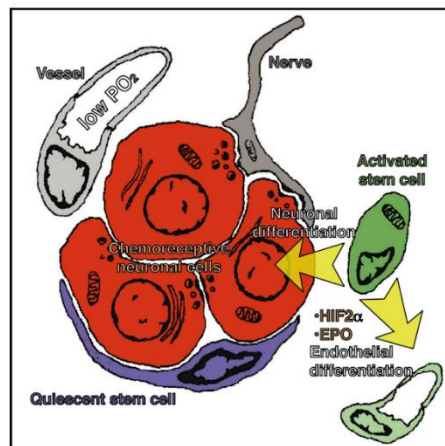
**Fig. 4:** Análisis inmunocitoquímico de cuerpos carotídeos extraídos de ratones control (normoxia) o de ratones expuestos a hipoxia crónica (10% O<sub>2</sub>) (hipoxia 7d). Se muestra el crecimiento típico de la masa celular de células glómicas TH<sup>+</sup> bajo hipoxia (7 días). La incorporación de BrdU a las células en proliferación después de 7 días en hipoxia y el posterior marcado de su progenie diferenciada (puntas de flecha blancas) se muestran en (C), con un detalle a mayor aumento en (D). Modificado de Pardal et al., 2007.

Con el objetivo de encontrar al responsable de la generación de nuevas células glómicas TH<sup>+</sup>, un indicio fue que las células sustentaculares de tipo II que expresan GFAP desaparecían poco a poco en respuesta a hipoxia, mientras el número de células proliferativas BrdU<sup>+</sup> aumentaba (Pardal et al., 2007).

La demostración final de la naturaleza de las células madre del órgano se llevó a cabo mediante experimentos de mapeo del linaje celular utilizando ratones transgénicos GFAP-Cre/floxed LacZ. Mediante esta estrategia se observó que, efectivamente, la mayoría de las células glómicas habían surgido de las células de tipo glial o sustentaculares en respuesta a las condiciones de hipoxia prolongada. Además, se aislaron estas células tipo II y se realizaron ensayos de diferenciación, *in vitro*, en placas adherentes, mostrando que, además de las células glómicas (TH<sup>+</sup>), estas células madre son capaces de diferenciarse hacia células del linaje mesenquimal como son las células del músculo liso (positivas para SMA, del inglés *Smooth Muscle Actin*) (Pardal et al., 2007).

Como estas células sustentaculares son células madre multipotentes, se ha demostrado también en el grupo que esta característica les permite participar, además de en la ya nombrada neurogénesis, en la angiogénesis que tiene lugar durante la adaptación del cuerpo carotídeo a la hipoxia. La conversión de estas células madre hacia células vasculares endoteliales se ve favorecida gracias a la exposición a factores vasculares liberados en hipoxia, como la hormona eritropoyetina (EPO), que puede ser sintetizada tanto por el riñón como por las propias células glómicas, desde donde actúa de manera paracrina (Annese et al., 2017).

Aunque es muy interesante esta capacidad de diferenciación mesenquimal en el nicho del cuerpo carotídeo, este Trabajo Fin de Grado se centra en el linaje neuronal de este nicho germinal adulto (Figura 5).



**Fig. 5:** Imagen de la diferenciación hacia los linajes neuronal o mesenquimal de una célula madre multipotente del cuerpo carotídeo. Tomado de Annese et al., 2017.

### 2.2.2 Mecanismo molecular de la sinapsis quimioproliferativa.

Como ejemplo de la importancia que tienen las comunicaciones célula-célula en el nicho germinal del cuerpo carotídeo, se comentarán a continuación los estudios que han esclarecido el mecanismo molecular implicado en la comunicación entre la célula madre o tipo II y la célula glómica o tipo I, comunicación que se ha denominado sinapsis quimioproliferativa.

En un principio se había comprobado que las células madre del nicho neurogénico estaban quiescentes bajo condiciones de normoxia y que se activaban en situación de baja tensión

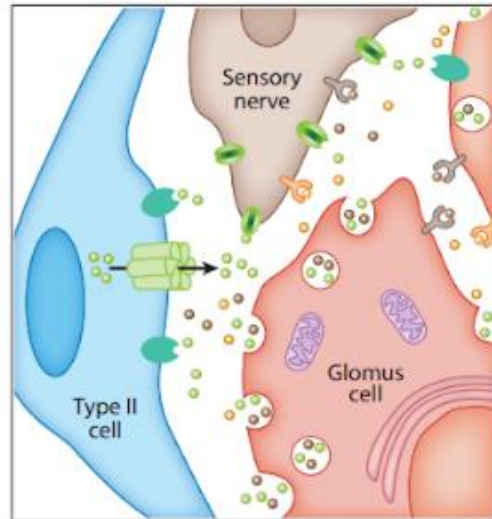
de oxígeno (hipoxia). Sin embargo, esta proliferación de las células madre en el cuerpo carotídeo hipóxico se demostró que era intrínsecamente insensible a hipoxia en un amplio rango de distintas presiones de oxígeno (Platero-Luengo et al., 2014), lo que indicó que debían existir otros factores en el nicho que informaran a las células progenitoras de la llegada del estímulo.

Por otro lado, se observó que existía una relación estructural muy cercana entre las células glómicas y las células sustentaculares GFAP+, que constituyen, como ya se ha descrito, la población de células madre quiescentes del órgano (Pardal et al., 2007). Como se demostró por estudios de microscopía electrónica (EM, del inglés *Electron Microscopy*), la mayoría de la superficie de las células tipo I en los glomérulos está envuelta por estas células sustentaculares (Platero-Luengo et al., 2014).

Sabiendo que las células glómicas actúan como elementos presinápticos (López-Barneo et al., 1999) y que en respuesta a hipoxia liberan neurotransmisores para activar a las fibras nerviosas aferentes, se llevó a cabo un análisis cuantitativo del número de vesículas sinápticas que demostró que la mayoría de estas estaban localizadas cerca de las células sustentaculares o tipo II, descubriéndose que la mayoría eran de este tipo.

Además, la membrana celular de la célula glómica se encuentra separada de la célula de tipo II por menos de 50 nm, lo que es muy similar al espacio intermembrana de un terminal sináptico (Platero-Luengo et al., 2014).

Como consecuencia de estos estudios morfológicos, se elucubró sobre el funcionamiento de la sinapsis quimioproliferativa, donde las células glómicas en respuesta a hipoxia liberarían neurotransmisores y otras sustancias, que activarían tanto las fibras nerviosas aferentes como la proliferación de las células sustentaculares o tipo II (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019) (Figura 6). Esta hipótesis sugería que la acción de las células glómicas es esencial para el desencadenamiento de la proliferación de los progenitores celulares del cuerpo carotídeo en respuesta a hipoxia (Platero-Luengo et al., 2014).



**Fig. 6:** Representación esquemática de la sinapsis tripartita en respuesta a hipoxia por las células glómicas. Modificado de Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019.

Se llevaron a cabo, experimentos para identificar el factor activador de la proliferación, de entre los muchos agentes liberados por las células glómicas que podían mediar la activación de los progenitores quiescentes. El factor que resultó más potente a la hora de activar la proliferación de los progenitores fue la endotelina-1 (ET-1), la cual era efectivamente liberada por la célula glómica. Se demostró por tanto que la ET-1 era un agente proliferativo que mediaba en la sinapsis quimioproliferativa para activar a las células sustentaculares quiescentes para su proliferación y diferenciación hacia nuevas células glómicas en respuesta al estímulo de hipoxia crónica (Platero-Luengo et al., 2014).

### 2.2.3 Neurogénesis en el cuerpo carotídeo.

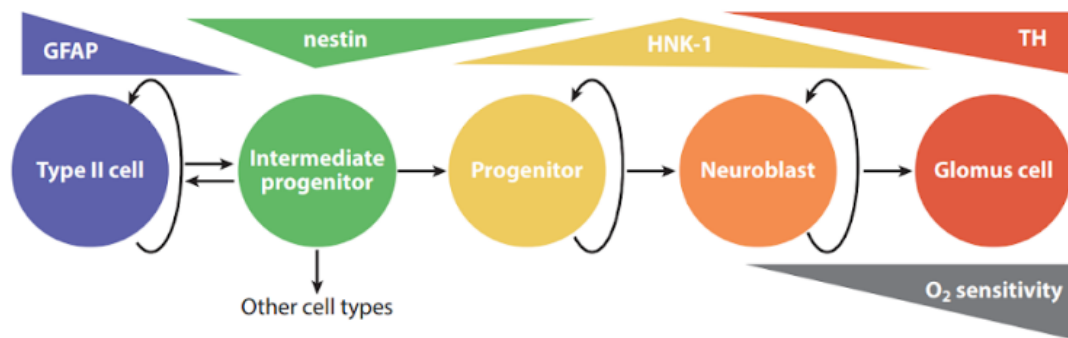
La neurogénesis, como proceso de generación de nuevas neuronas, se ha demostrado este en la zona subgranular del hipocampo y en el bulbo olfatorio de los cerebros de los mamíferos adultos, lo cual sugiere la persistencia de células madre neurales a lo largo de toda la vida. Los precursores neurales primarios se han identificado en zonas especializadas denominadas nichos neurogénicos. De manera interesante, la célula que da origen a las nuevas neuronas en el cerebro adulto expresa marcadores de células gliales. Estos nichos neurogénicos mencionados se encuentran en el sistema nervioso

central, mientras que la neurogénesis estudiada en este trabajo se encuentra en el sistema nervioso periférico (Arias-Carrión et al., 2007).

A diferencia de otros órganos periféricos, el cuerpo carotídeo adulto tiene una plasticidad estructural notable, ya que se ha demostrado que, gracias a la presencia de células madre multipotentes, es capaz de crecer durante la aclimatación a condiciones de hipoxia crónica (Sobrino et al., 2018) dando lugar a nuevas células en los linajes neuronal y mesenquimal (Annese et al., 2017). Centrándonos en el linaje neuronal, y como acabamos de describir, estas células madre sustentaculares se activan para aclimatarse a hipoxia y son activadas gracias a neurotransmisores liberados por las células glómicas, como la ET-1 (Platero-Luengo et al., 2014). Posteriormente, se diferencian también en respuesta a sustancias liberadas por las células glómicas, como el ATP, o la acetilcolina (Sobrino et al., 2018). La diferenciación tiene lugar a través de un progenitor intermedio (nestina +) activado (Pardal et al., 2007). Finalmente, la célula atraviesa diversos estadios celulares inmaduros, denominados progenitores restringidos a linaje neuronal o neuroblastos, hasta convertirse en una célula glómica madura (Figura 7).

De forma muy interesante, se ha demostrado la existencia en el nicho de una subpoblación de neuroblastos inmaduros quiescentes, que expresan marcadores catecolaminérgicos, y canales iónicos dependientes de voltaje, pero son insensibles al estímulo hipóxico agudo. A diferencia de las células glómicas, estos neuroblastos pueden llevar a cabo divisiones mitóticas antes de la maduración final hacia células glómicas, inducido todo ello por hipoxia, pero también por neurotransmisores como el ATP o la acetilcolina. Es decir, estos neuroblastos tienen la capacidad de madurar también gracias a señales purinérgicas y colinérgicas provenientes de las células glómicas (Sobrino et al., 2019). Se trata de una neurogénesis “rápida” a partir de estos neuroblastos, lo cual no está tan claramente descrito en ningún otro nicho neurogénico.

Los neuroblastos del cuerpo carotídeo se marcan positivamente para HNK-1, un antígeno de membrana descrito en algunas neuronas y en células de la cresta neural y que específicamente etiqueta a este subconjunto de células TH+ con capacidad de proliferación y que será presentado de forma más extendida en el siguiente apartado (Sobrino et al., 2018) (Figura 7).



**Fig. 7:** Modelo de bolas de las distintas fases de diferenciación de la célula madre neural a lo largo del linaje neuronal. Encima se representan los marcadores expresados y debajo la sensibilidad a hipoxia. Tomado de Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019.

### 2.3 Embriogénesis del CC: La cresta neural.

Para explicar la importancia del antígeno de membrana HNK-1 (del inglés *Human Natural Killer-1*) en la fisiología del cuerpo carotídeo, debemos exponer previamente, aunque brevemente, la embriogénesis del cuerpo carotídeo.

La cresta neural es la estructura embrionaria responsable de dar todo el sistema nervioso periférico, y contiene una población de células madre migratorias específicas de vertebrados que generan una notable diversidad de tipos celulares y estructuras (Pshennikova & Voronina, 2019; Anderson, 1993)

Las células madre de la cresta neural (NCSC, del inglés *Neural Crest-derived Stem Cells*) son multipotentes y migran desde el tubo neural para dar lugar a numerosos tipos celulares como melanocitos, células de Schwann, neuronas del sistema nervioso periférico y derivados mesectodérmicos sobre todo en la zona craneal. Esta especificación celular viene determinada por mecanismos moleculares de señalización, por ejemplo, la formación de neuronas sensoriales es dependiente de Wnt. En el caso del cuerpo carotídeo, las neuronas del sistema nervioso autónomo provienen de la señalización por BMP2 (del inglés *Bone Morphogenetic Protein 2*) (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008).

Las NCSCs se dividen en dos grandes poblaciones: células de la cresta neural del cráneo y del tronco. Las primeras contribuyen a la formación de estructuras de la cabeza y el cuello, ganglios sensoriales craneales y arcos branquiales. Las NCSCs troncales dan lugar a neuronas sensoriales, simpáticas y parasimpáticas, melanocitos y células cromafines. Estas últimas, que son muy parecidas a las neuronas del cuerpo carotídeo, provienen,

como las células glómicas del cuerpo carotídeo, de progenitores simpatoadrenales que expresan el antígeno de superficie HNK-1 (Kameda, 2020).

El antígeno HNK-1 se identificó por primera vez en la superficie de las células NK (del inglés, *Natural Killer*) en 1981 (Abo & Balch, 1981) Además, el epítipo de HNK-1, también llamado CD57, se utiliza como marcador para poblaciones de células T en inmunología (Focosi et al., 2010; Kizuka & Oka, 2012).

Como se ha comentado, los progenitores simpatoadrenales expresan el antígeno HNK-1, el cual se expresa además de forma genérica en las células de la cresta neural durante la migración en el desarrollo embrionario y se ha demostrado que su presencia es fundamental para el correcto desarrollo de la migración en la cresta neural de las aves (Bronner-Fraser, 1987). La importancia de este marcador para el presente estudio radica en que se mantiene su expresión, de forma muy prominente, en los neuroblastos inmaduros del cuerpo carotídeo, hasta el punto de que será utilizado para la separación de estas células por citometría de flujo.

#### **2.4 Aspectos clínicos.**

El estudio de este órgano es muy relevante para la comprensión de diversas enfermedades asociadas a su función. La activación durante la maduración de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo aumenta la ventilación y el tono simpático, lo que resulta muy importante para la adaptación del neonato a la vida fuera del útero. Defectos en la función de este quimiorreceptor periférico en humanos son poco frecuentes y estudiados. Se piensa que pueden contribuir a algunos desórdenes respiratorios en el neonato como el síndrome de muerte súbita infantil (SIDS, del inglés *Sudden Infant Death Syndrome*). Se ha visto que existe una reducción del tamaño del parénquima y, del número de vesículas en las células glómicas, y un aumento del número de células sustentaculares o tipo II. Por tanto, hay una falta de respuesta por parte del órgano a la hipoxia, lo que puede provocar asfixia y muerte. (López-Barneo et al., 2016).

Otro ejemplo de desorden respiratorio asociado sería el síndrome de hipoventilación congénita (CCHS, del inglés *Congenital Central Hypoventilation Syndrome*). Se trata de un trastorno potencialmente mortal con una respuesta ventilatoria alterada a la hipoxia que, al igual que el SIDS, parece estar parcialmente relacionado con alteraciones en la función del cuerpo carotídeo. En pacientes de esta enfermedad, se ha observado un descenso en el número de células glómicas y en el número de vesículas y un aumento de

las células sustentaculares o tipo II. Por otro lado, la sobreactivación del cuerpo carotídeo ha sido identificado como la causa más importante de una activación simpática exagerada, característica de desórdenes como la hipertensión, insuficiencia cardíaca crónica, apnea del sueño, obesidad o síndrome metabólico (López-Barneo et al., 2016). Por último, el estudio del cuerpo carotídeo está muy relacionado con tumores infantiles como el neuroblastoma, ya que este tumor tiene origen en la cresta neural simpatoadrenal. Por tanto, puede haber similitudes relevantes entre las células madre neurales del cuerpo carotídeo y las células madre tumorales implicadas en la aparición y el desarrollo de los neuroblastomas, incluyendo la producción de neuroblastos proliferativos (Jiang et al., 2011).

### **3. Objetivo.**

Desarrollar un análisis de la neurogénesis *in vitro* de neuroblastos en cultivo mediante la cuantificación de modificaciones morfológicas tras ser tratados con acetilcolina 1 mM. El objetivo conceptual es demostrar que los neuroblastos también están regulados por la actividad de estas células glómicas neuronales, a través del neuromodulador acetilcolina.

### **4. Materiales y métodos.**

Para estudiar la diferenciación de neuroblastos mediante inductores como la acetilcolina *in vitro* se siguió el protocolo que se expone a continuación (Sobrino V., Tesis Doctoral, 2017; Pardal et al., 2007).

#### **4.1 Disección del cuerpo carotídeo.**

El experimento realizado se ha llevado a cabo con ratas Wistar, proporcionadas por el servicio de experimentación animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Los animales tenían edades comprendidas entre 20 y 30 días. Las ratas Wistar se trataron acorde a las guías aprobadas por el Comité de Investigación animal de la Universidad de Sevilla, y la autora de este trabajo ha permanecido supervisada en todo momento por miembros del Departamento para la realización de dicha tarea. Para el sacrificio de los animales, se anestesiaron dos ratas Wistar mediante una inyección intraperitoneal de una



mezcla de ketamina y xilacina en proporción 80/20. La dosis requerida de ketamina fue 80 mg/kg y de xilacina, 10 mg/kg. Se extrajeron las cuatro bifurcaciones carotídeas y de cada una los cuerpos carotídeos gracias a una lupa binocular Olympus SZX16. Finalmente, se introdujeron los cuerpos carotídeos en una solución con Tyrode pH=7,4 a 4°C.

#### **4.2 Dispersión del CC y conteo de células.**

Con el objetivo de extraer las células del cuerpo carotídeo se realizó un protocolo basado en la dispersión enzimática y mecánica (Pardal et al.,2007). Por un lado, en la digestión enzimática, se prepararon 4 mL de mezcla de dispersión compuesta por 3 mL de tampón fosfato salino (PBS), 30 µL de colagenasa, 30 µL de elastasa, 30 µL de tripsina y 30 µL de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 5 mM. En esta mezcla de dispersión se introdujeron los cuatro cuerpos carotídeos obtenidos en el punto 4.1. Para ayudar a la digestión enzimática se llevó a cabo una digestión mecánica con Eppendorf Thermomixer a una temperatura a 37 °C, durante 25 min y a 600 r.p.m y se realizó un pipeteo sutil para terminar de disgregar los cuerpos carotídeos. Se neutralizó la digestión enzimática añadiendo 7 mL de FACS buffer (buffer salino con BSA) y se transportó a un falcon de 15 mL de fondo cónico. Posteriormente, se centrifugó durante 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante para obtener el pellet con nuestras células del cuerpo carotídeo y se resuspendió en 250 µL de FACS. Por último, se cogieron 10 µL del pellet resuspendido y le añadimos otros 10 µL de Trypan Blue en una cámara Neubauer para realizar un conteo aproximado del número de células vivas en el pellet.

#### **4.3 Aislamiento de los neuroblastos por citometría de flujo.**

Con el objetivo de aislar la población celular de los neuroblastos, se utilizó la técnica de FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter). Este es un tipo especializado de citometría de flujo, que ordena una población de células en subpoblaciones utilizando etiquetados fluorescentes. Este aislamiento se llevó a cabo gracias al citómetro MoFlo Astrios de dos láseres y se realizó en función de la expresión del antígeno de membrana HNK-1 que presentan estos neuroblastos. El protocolo utilizado consistió en, una vez dispersadas las células del cuerpo carotídeo, añadirles 500 µL de solución FACS. Posteriormente se añadió el anticuerpo *anti HNK-1* (hecho en conejo con epítipo humano) conjugado con alofococianina (APC) a concentración de 1:500 y se incubó 30 min. A continuación, se lavó con FACS y se centrifugó a 4°C y 1500 rpm durante 5 min. En seguida, se añadió

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) como marcador de viabilidad, a concentración de 1:1000. Finalmente, se centrifugó en las mismas condiciones, se filtraron con un filtro de 50 µm de poro sobre los tubos definitivos y se dejaron en 500 µL de FACS. Las muestras requeridas fueron:

- Células + DAPI.
- Células + HNK-1-APC.
- Células + DAPI + HNK-1-APC: muestra teñida para la separación de las células HNK +.

Los dos primeros puntos conforman los controles negativos necesarios para evitar el solapamiento de las tinciones DAPI y del fluoróforo APC.

Finalmente, las células separadas se recogieron en un Eppendorf con 400 µL de Neural Crest Medium.

#### **4.4 Ensayo de diferenciación con acetilcolina.**

Para realizar el ensayo de diferenciación, previamente se trató una placa con cuatro pocillos. Dos de esos pocillos se usaron para el control y los restantes para el tratamiento con acetilcolina. El tratamiento se basó en añadir una mezcla de colágeno tipo I a concentración 3mg/mL, poli-D-lisina 0,5 mg/mL y ácido acético 17 mM para provocar que las células se adhieran a la placa. Posteriormente, se añadió PBS a cada pocillo y se dejó 12h a 4°C. Al día siguiente se realizaron tres lavados con agua y se añadieron 400 µL por pocillo de Neural Crest Medium y se incubó la placa a 37 °C. Tratada ya la placa, se añadieron los 400 µL (100 µL por pocillo) de células en Neural Crest Medium previamente aisladas del citómetro de flujo. A los pocillos control se añadieron 5 µL de agua y a los pocillos del tratamiento 5 µL de acetilcolina dado que la concentración del stock es 100 mM, buscando una concentración final de 1 mM y en un volumen final del pocillo de 500 µL. Finalmente, se dejó la placa durante 48 h a 37°C para ver el efecto del neurotransmisor en la diferenciación de los neuroblastos.

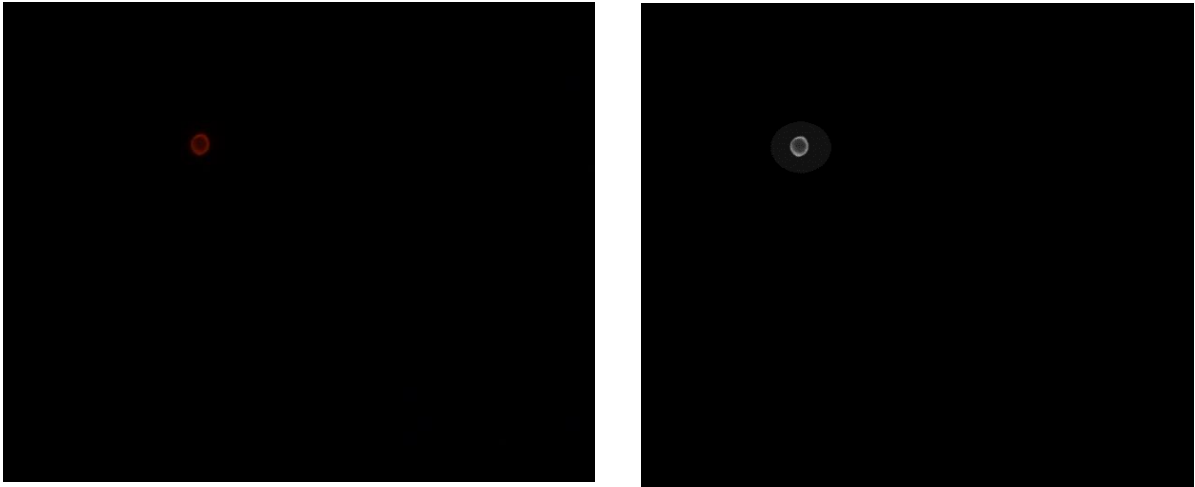
#### **4.5 Inmunofluorescencia de TH *in vitro*.**

Estas células en condiciones de adherencia se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a 25°C. A continuación, se realizó una inmunofluorescencia para el marcador citosólico de la tirosina hidroxilasa, así se observarían al microscopio de fluorescencia cambios morfológicos y estructurales del tratamiento con acetilcolina con respecto al control. El protocolo de inmunofluorescencia para el marcador tirosina hidroxilasa fue el que

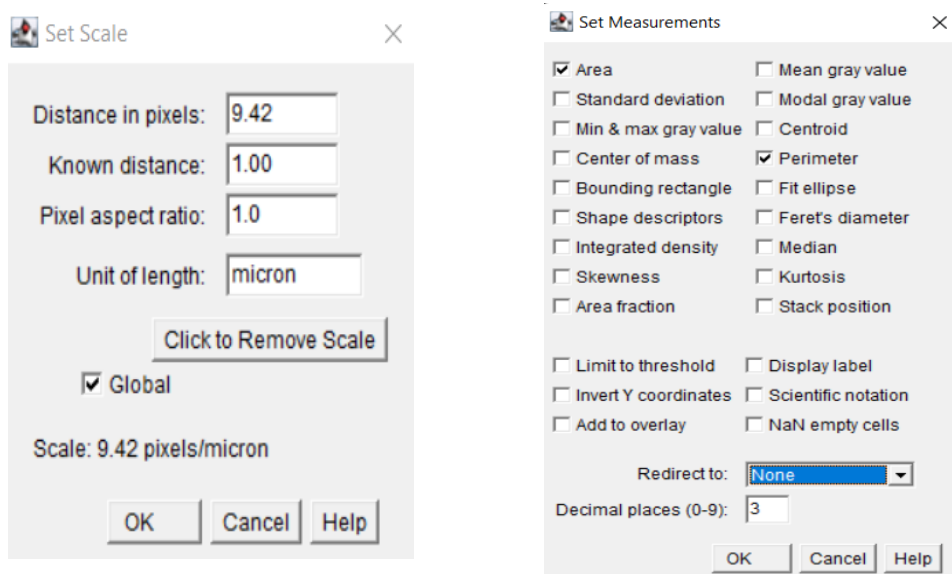
habitualmente se utiliza en el laboratorio 103 del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), donde se llevó a cabo el presente trabajo. Los distintos anticuerpos que se usaron fueron el anticuerpo primario *rabbit anti-TH* (1:1000) y el anticuerpo secundario *AlexaFluor 568 anti-rabbit* (1:800). El procedimiento comienza con tres lavados con tampón fosfato (PBS) seguido de la permeabilización de las células con solución PBTX al 0,2% (PBS con Tritón X al 20%). Posteriormente, se trataron las células con una solución de bloqueo, compuesto por PBS y BSA al 1% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. A continuación, se dejó durante 1h a temperatura ambiente y se añadió 50  $\mu$ L del anticuerpo primario *rabbit anti-TH* (1:1000) previamente diluido en 1 mL de solución de bloqueo, y se dejó la placa *over/night* a 4°C para la incubación del anticuerpo. Al día siguiente, se lavó 3 veces con tampón fosfato (PBS) y se incubaron en 50  $\mu$ L con el anticuerpo secundario *AlexaFluor 568 anti-rabbit* (1:800) previamente diluido en 1 mL de solución de bloqueo. A continuación, se le añadió DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) a concentración 1:1000 diluido también en un 1 mL de bloqueo para teñir los núcleos. Finalmente, se pasa a un medio de montaje y se deja reposar en oscuridad para el asentamiento del cubre-objetos. Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio directo de fluorescencia.

#### **4.6 Análisis de imagen**

Previo al análisis de imagen, se debe realizar un procesamiento de las mismas. Este procesamiento se realizó con la herramienta *Fiji*. Consiste en un paquete de procesamiento de imágenes, basado en *ImageJ*, que agrupa una gran cantidad de complementos que facilitan el análisis científico de imágenes. Se utilizó esta herramienta para transformar las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia que están a color (formato *JPEG*) a imágenes 8 bit en escala de grises. Además, con el plugin *Contrast/Brightness* se modificaron el contraste y el brillo de las imágenes en escala de grises. Así, se estandarizaron las imágenes para permitir un análisis efectivo de las mismas. Posteriormente se guardaron las imágenes en formato *tiff* (Fig.8) y se procedió a establecer la escala adecuada gracias al patrón que nos proporciona el microscopio directo de fluorescencia (1  $\mu$ m=9,42 px) con la herramienta *Set Scale* que se encuentra dentro del plugin *Analyze* (Fig 9). Por último, se procedió a calcular parámetros morfológicos como área y perímetro gracias a la herramienta *Set Measurements* que se encuentra también dentro del plugin *Analyze*.



**Fig. 8:** A la izquierda se representa la imagen obtenida del microscopio de fluorescencia en formato *JPEG* y a la derecha se muestra la imagen transformada a escala de grises en formato *tiff* gracias al programa informático *Fiji*.



**Fig. 9 (izquierda):** Imagen donde se muestra la escala establecida gracias al patrón que nos proporciona el microscopio directo de fluorescencia. Por lo tanto, la escala fue de 9,42 píxeles/micra.

**Fig. 10 (derecha):** Imagen donde se seleccionaron los parámetros morfológicos a medir gracias a la herramienta *Set Measurements*.

## 4.7 Gráficos.

Los gráficos obtenidos de los valores de área y perímetro de cada condición se han realizado gracias a la herramienta RStudio. Este es un software ampliamente utilizado por la comunidad científica para el análisis de datos.

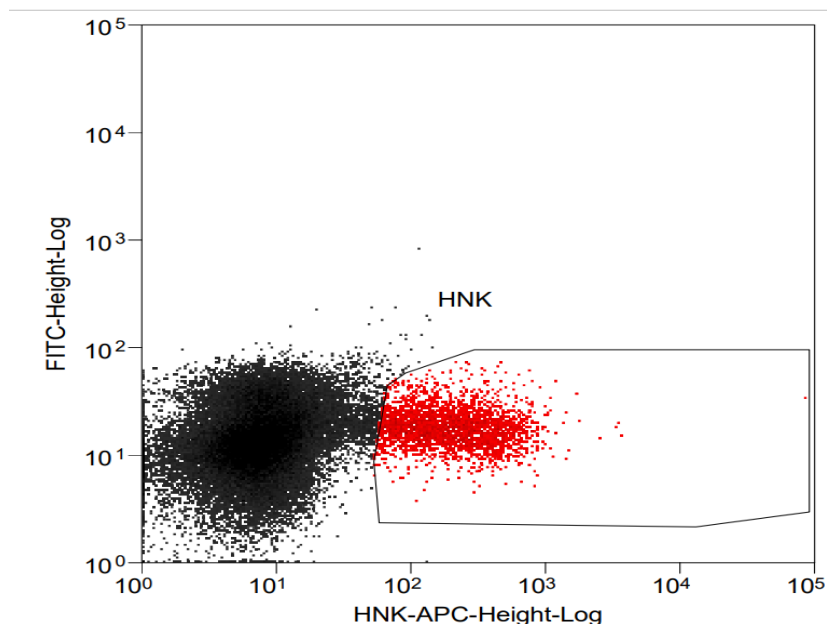
## 4.8 Estadística.

Con el objetivo de comprobar si los resultados son estadísticamente significativos, se realizó el test estadístico de Wilcoxon con el software RStudio.

## 5. Resultados.

### 5.1 Aislamiento de neuroblastos HNK-1 positivos.

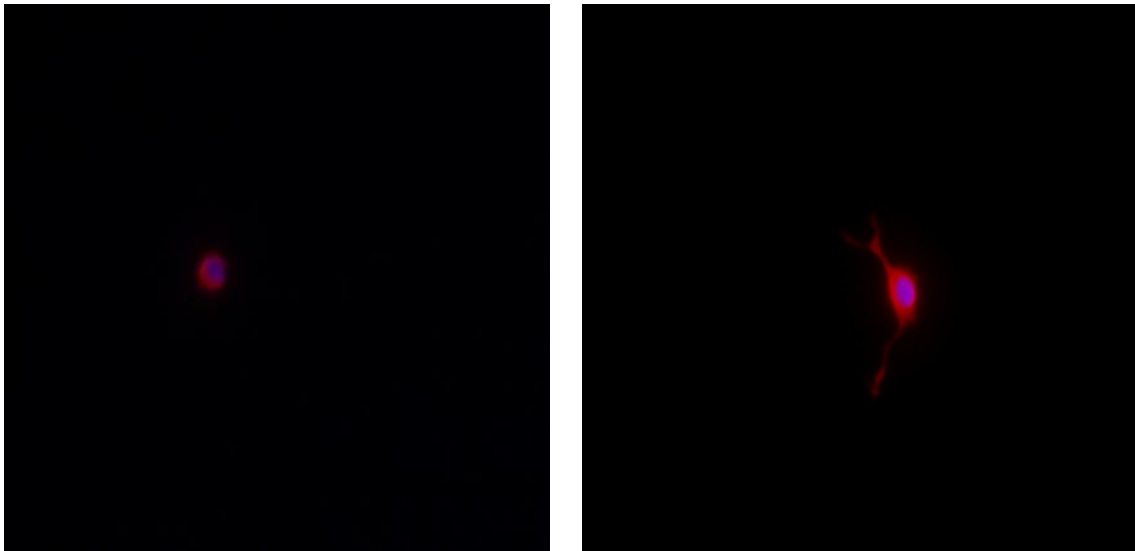
Tal y como se ha expuesto en el apartado de *Materiales y Métodos 3.1.4* las células marcadas positivamente para el antígeno de membrana HNK-1 (también llamado CD57) se aislaron con éxito gracias al citómetro MoFlo Astrias de dos láseres del servicio de citometría del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Se obtuvieron un 9 % de células positivas para el antígeno HNK-1, lo que representó un total de 2700 células HNK-1 positivas de 50000 células totales.



**Fig. 11:** Plot de citometría de células del cuerpo carotídeo marcadas con el antígeno HNK-1. Los neuroblastos etiquetados con el antígeno HNK-1 se encuentran señalados en rojo.

## 5.2 Inmunofluorescencia de TH *in vitro*.

Tras el tratamiento de 48 h con el neurotransmisor acetilcolina a concentración 1 mM, el objetivo fue observar estos neuroblastos prediferenciados al microscopio de fluorescencia. Para ello, se etiquetaron las células con el marcador citosólico tirosina hidroxilasa (TH), específico para neuronas dopaminérgicas. Además, se añadió un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN llamado DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para observar el núcleo. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado de *Materiales y Métodos 4.1.6* algunas de las imágenes obtenidas son las siguientes:



**Fig. 12 y 13:** Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. La fig. 12 (izquierda) corresponde a un neuroblasto en la situación control y la fig. 13 (derecha) a un neuroblasto tratado con acetilcolina 1 mM durante 48 h.

Como podemos observar, comparando los neuroblastos correspondientes en la situación control con el tratamiento de acetilcolina 1mM, estos últimos son de mayor tamaño, muestran largas prolongaciones y terminaciones nerviosas propias de neuronas glómicas ya maduras. Sin embargo, los neuroblastos pertenecientes al control tienen una forma más redondeada y son más pequeños. Para asegurarnos que verdaderamente hay diferencias morfológicas y de tamaño, compatibles con su diferenciación, cuantificamos el área y perímetro de cada célula para compararlas y llegar a la conclusión de si este

neurotransmisor es capaz de inducir este proceso de diferenciación, el cual, discutiremos su importancia posteriormente.

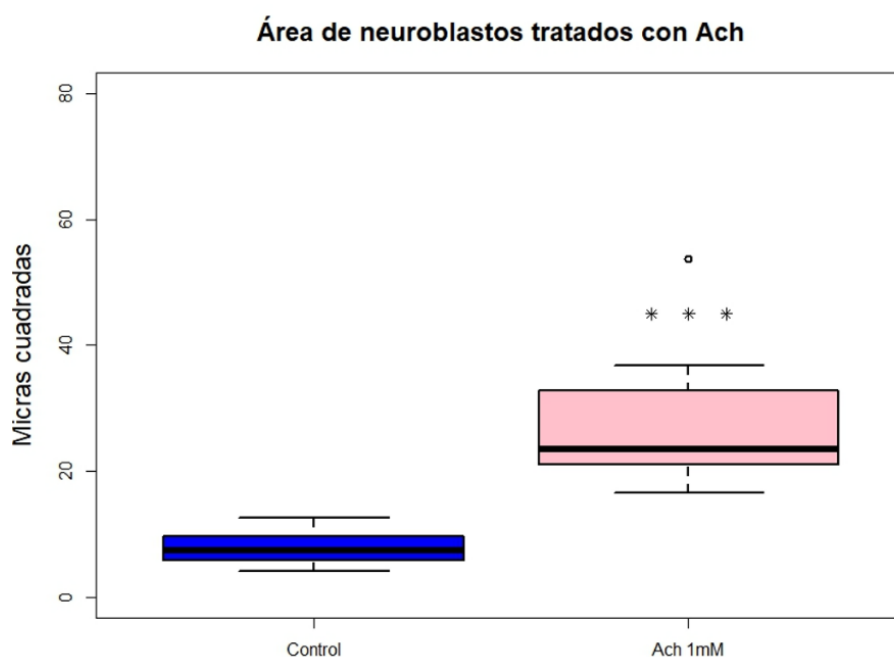
Los resultados mostrados del análisis *in vitro* se han realizado de manera preliminar (n=1) ya que para que un experimento tenga validez se requieren mínimo 3 réplicas del mismo.

### 5.3 Análisis de imagen.

Realizado el procesamiento de las imágenes descrito en el apartado de *Materiales y Métodos 4.6*, se llevó a cabo la cuantificación del área y el perímetro. Se analizaron un total de 36 imágenes, 18 por condición.

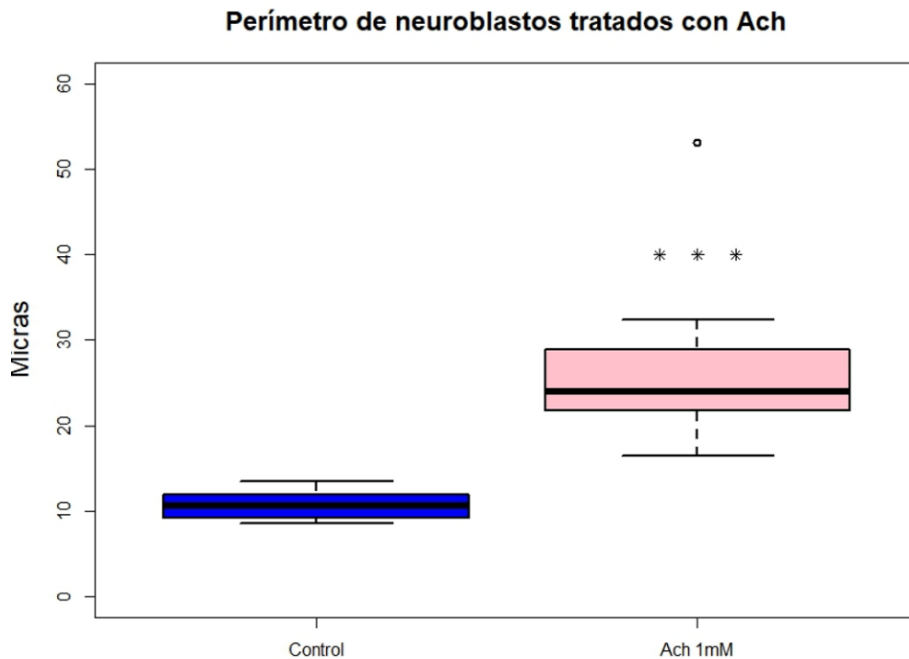
### 5.4 Gráficos.

En cuanto al área, se observa que existe un aumento significativo en los neuroblastos tratados con acetilcolina 1mM (figura 14). Este aumento del área se puede deber a un incremento en el tamaño del cuerpo celular o del número de prolongaciones y terminaciones nerviosas como hemos observado en la figura 13.



**Fig. 14:** Representación gráfica de cajas y bigotes del área de neuroblastos tratados con acetilcolina 1mM (rosa) y no tratados (azul). Se muestra un aumento significativo en el área de los neuroblastos tratados con el neurotransmisor. Las barras muestran los valores más extremos y los asteriscos la significancia estadística ( $p < 0.001$ ).

En cuanto al perímetro, se muestra un claro incremento significativo en los neuroblastos tratados con acetilcolina 1mM (figura 15). Este aumento del perímetro se puede deber, al igual que en el caso del área, a un aumento del cuerpo celular o del número de prolongaciones y terminaciones nerviosas.



**Fig. 15:** Representación gráfica de cajas y bigotes del perímetro de neuroblastos tratados con acetilcolina 1mM (rosa) y no tratados (azul). Se muestra un aumento significativo en el perímetro de los neuroblastos tratados con el neurotransmisor. Las barras muestran los valores más extremos y los asteriscos la significancia estadística ( $p < 0.001$ ).

### 5.5 Estadística.

Para comparar ambas condiciones primero se realizó un análisis de la normalidad de los datos gracias al test de Shapiro. Se comprobó que los datos no seguían una normalidad, por lo que nos decantamos por hacer un análisis estadístico atendiendo a las medianas de los grupos mediante el test de Wilcoxon. En definitiva, los neuroblastos tratados con acetilcolina 1 mM en ambos casos eran mayores y tenían mayor perímetro de manera significativa en comparación con los neuroblastos control.



## 6. Discusión.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar un análisis de la neurogénesis *in vitro* de neuroblastos en cultivo mediante la cuantificación de modificaciones morfológicas tras ser tratados con acetilcolina. Se ha demostrado la existencia en el nicho de una subpoblación de neuroblastos inmaduros quiescentes, que expresan marcadores catecolaminérgicos, y canales iónicos dependientes de voltaje, pero son insensibles al estímulo hipóxico agudo. Estos neuroblastos se marcan positivamente para HNK-1 y pueden dividirse mitóticamente antes de la maduración final hacia células glómicas. Por tanto, estos neuroblastos constituyen una subpoblación celular que responde de manera más rápida ante un estímulo hipóxico, diferenciándose en células glómicas de tipo I de manera mucho más resuelta que la propia célula madre (Sobrino et al., 2018). En estudios previos se ha dilucidado la capacidad que tienen algunos neurotransmisores, en concreto, ATP, UTP y acetilcolina (ACh) sobre la neurogénesis rápida de estos neuroblastos hacia células glómicas de tipo I. Se observó claramente el efecto de estos neurotransmisores sobre la respuesta funcional electrofisiológica de los neuroblastos midiendo el incremento de calcio intracelular en respuesta a los distintos estímulos fisiológicos. Los resultados obtenidos apoyaron esta hipótesis ya que se observó un incremento de calcio intracelular en presencia de estos neurotransmisores colinérgicos y purinérgicos al igual que lo hacen las células glómicas de tipo I frente a un estímulo hipóxico. Por tanto, se demuestra que estas moléculas provocan la maduración de los neuroblastos, ayudando a diferenciarlos a células glómicas de tipo I sensibles ya al estímulo hipóxico (Sobrino V., Tesis Doctoral, 2017).

Centrándonos en la acetilcolina, el objetivo de este Trabajo Fin de Grado ha sido confirmar el potencial diferenciador de este neurotransmisor sino también observando los cambios morfológicos que permiten a los neuroblastos llevar a cabo su función fisiológica como célula glómica o tipo I. Los resultados obtenidos en los análisis *in vitro* gracias a análisis de imagen como *Fiji* verificaron las variaciones morfológicas previamente observadas en las figuras 12 y 13. Tanto la medida del área como del perímetro fueron significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) en neuroblastos tratados con acetilcolina en comparación con los neuroblastos no tratados con este neurotransmisor. Esto se puede deber o bien a un aumento del cuerpo celular, lo cual no se observa a simple vista, o bien a un aumento del número de prolongaciones y terminaciones nerviosas que son características de la diferenciación neuronal. En consecuencia, se sostiene que la

acetilcolina promueve una maduración, tanto funcional como morfológica, de los neuroblastos quiescentes hacia células glómicas de tipo I favoreciendo así la neurogénesis “rápida” en el cuerpo carotídeo y confirmando a la célula glómica como orquestadora de la activación del órgano en respuesta a hipoxia.

Este hecho de la neurogénesis “rápida” tiene gran potencial en terapia celular ya que las células glómicas o tipo I del cuerpo carotídeo son dopaminérgicas por lo que se podría usar como terapia antiparkinsoniana (Ortega Sáenz & López-Barneo, 2019). Además, estas células glómicas de tipo I producen grandes cantidades del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, del inglés *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), que se ha descrito como un importante factor neuroprotector para las neuronas dopaminérgicas. Este factor secretado permite recuperar las neuronas dañadas, aliviando los síntomas de la enfermedad de Parkinson. El rol fisiológico de GDNF es aún desconocido, aunque se piensa que puede estar relacionado con la inducción autocrina o paracrina de enzimas de defensa antioxidante necesarias para inactivar las especies reactivas de oxígeno mitocondriales producidas en situación de hipoxia aguda en estas células (Ortega-Sáenz & López-Barneo, 2019). Todo ello reforzaría el uso del cuerpo carotídeo en terapia celular frente a la enfermedad de Parkinson. Por tanto, cuanto mejor se caractericen los mecanismos moleculares que subyacen la neurogénesis “rápida”, más cerca estaremos de la aplicación de este órgano como terapia celular antiparkinsoniana. También será útil conocer en detalle la fisiología de la neurogénesis rápida para intentar resolver la fisiopatología de enfermedades relacionadas con el funcionamiento de este órgano, como puede ser la apnea del sueño, el síndrome hipoventilatorio agudo, o incluso algunas formas de hipertensión arterial. Un mejor conocimiento de las señalizaciones moleculares implicadas en la maduración de los neuroblastos del cuerpo carotídeo puede ofrecernos nuevas herramientas farmacológicas para un tratamiento más efectivo de todas estas patologías.

## **7. Conclusiones.**

Este Trabajo Fin de Grado ha permitido confirmar que las células glómicas del cuerpo carotídeo son capaces de orquestar el proceso de activación del órgano tras la llegada del estímulo hipóxico. Concretamente, hemos demostrado que uno de los neurotransmisores secretado por las células glómicas en respuesta a hipoxia, la acetilcolina, contribuye a la maduración de los neuroblastos quiescentes del órgano hacia nuevas células glómicas, las cuales ayudarán a la adaptación del tejido a la nueva situación hipóxica. Nuestros datos muestran una clara maduración morfológica en los neuroblastos en respuesta a la acetilcolina, complementando y confirmando la maduración funcional demostrada previamente en el grupo en respuesta a este neurotransmisor. De esa forma nuestro trabajo contribuye al conocimiento del proceso molecular y celular de maduración de los neuroblastos quiescentes del cuerpo carotídeo, y, por tanto, podría tener importancia en el futuro uso de este órgano en terapia celular, y en la optimización de la farmacología frente a una importante variedad de patologías asociadas.

## Bibliografía.

- Abo, T., & Balch, M. C. (1981). A differentiation antigen of human and K cells identified monoclonal antibody (HNK-1). *The Journal of Immunology*, *127*(3), 1024–1029.
- Anderson, D. J. (1993). Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification. *Current Opinion in Neurobiology*, *3*(1), 8–13.
- Annese, V., Navarro-Guerrero, E., Rodríguez-Prieto, I., & Pardal, R. (2017). Physiological Plasticity of Neural-Crest-Derived Stem Cells in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell Reports*, *19*(3), 471–478.
- Arias-Carrión, O., Olivares Bañuelos, T., & Drucker-Colín, R. (2007). Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*, *44*(9), 541–550.
- Chang, A. J. (2017). Acute oxygen sensing by the carotid body: from mitochondria to plasma membrane. *Journal of Applied Physiology*, *123*(5), 1335–1343.
- Chang, A. J., Ortega, F. E., Riegler, J., Madison, D. v., & Krasnow, M. A. (2015). Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature*, *527*(7577), 240-244.
- Focosi, D., Bestagno, M., Burrone, O., & Petrini, M. (2010). CD57 + T lymphocytes and functional immune deficiency. *Journal of Leukocyte Biology*, *87*(1), 107-116.
- Gao, L., Ortega-Sáenz, P., & López-Barneo, J. (2019). Acute oxygen sensing—Role of metabolic specifications in peripheral chemoreceptor cells. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, *265*, 100-111.
- Jiang, M., Stanke, J., & Lahti, J. M. (2011). The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Current topics in developmental biology*, *94*, 77-127.
- Kameda, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms of the organogenesis and development of the mammalian carotid body. *Developmental Dynamics*, *249*(5), 592-609.
- Kizuka, Y., & Oka, S. (2012). Regulated expression and neural functions of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(24), 4135-4147.
- López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., González-Rodríguez, P., Fernández-Agüera, M. C., Macías, D., Pardal, R., & Gao, L. (2016). Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. *Molecular Aspects of Medicine*, *47–48*, 90-108.
- López-Barneo, J., Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Pascual, A., Piruat, J. I., Durán, R., & Gómez-Díaz, R. (2009). Oxygen sensing in the carotid body. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1177*(1), 119-131.

- López-Barneo, J., Pardal, R., Montoro, R. J., Smani, T., García-Hirschfeld, J., & Ureña, J. (1999). K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel activity and cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in oxygen-sensing tissues. *Respiration Physiology*, *115*(2), 215-227.
- Monge Salazar, M., & Rodríguez Palomo, D. (2017). Cuerpo carotídeo: un enfoque anatómico y fisiológico: un enfoque anatómico y fisiológico. *Medicina Legal de Costa Rica*, *34*(1), 218-225.
- Ortega-Sáenz, P., & López-Barneo, J. (2019). Physiology of the Carotid Body: From Molecules to Disease. *Annual Review of Physiology*, *82*, 127-149.
- Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R., & López-Barneo, J. (2007). Glia-like Stem Cells Sustain Physiologic Neurogenesis in the Adult Mammalian Carotid Body. *Cell*, *131*(2), 364-377.
- Platero-Luengo, A., González-Granero, S., Durán, R., Díaz-Castro, B., Piruat, J. I., García-Verdugo, J. M., Pardal, R., & López-Barneo, J. (2014). An O<sub>2</sub>-sensitive glomus cell-stem cell synapse induces carotid body growth in chronic hypoxia. *Cell*, *156*(1-2), 291-303.
- Pshennikova, E. S., & Voronina, A. S. (2019). Neural Crest—An Unusual Population of Embryonic Cells. *Molecular Biology*, *53*(2), 227-236.
- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), 557-568.
- Sobrinho Cabello, V. (2017). *Mecanismos neurogénicos en respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo. Presencia de neuronas inmaduras en el sistema nervioso periférico adulto* [Tesis de doctorado, Universidad de Sevilla]. <http://hdl.handle.net/11441/65274>.
- Sobrinho, V., Annese, V., & Pardal, R. (2019). Progenitor Cell Heterogeneity in the Adult Carotid Body Germinal Niche. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1123, pp. 19-38). Springer New York LLC.
- Sobrinho, V., González-Rodríguez, P., Annese, V., López-Barneo, J., & Pardal, R. (2018). Fast neurogenesis from carotid body quiescent neuroblasts accelerates adaptation to hypoxia. *EMBO Reports*, *19*(3), e44598.